

## INFORME DE AVANCE PROYECTOS DE INVESTIGACION 2013 - 2015

### 1- Datos del Proyecto - Código: J016

**Denominación:** Defensas inmunitarias y contra el daño oxidativo en la ampularia *Pomacea canaliculata*

**Director:** Maximiliano Germán GIRAUD-BILLOUD

**Resumen:** La ampularia *Pomacea canaliculata* es un gasterópodo de agua dulce que presenta diversas estrategias adaptativas para enfrentar diferentes estresores ambientales bióticos y abióticos. Las defensas inmunitarias de esta especie y su habilidad para tolerar períodos de actividad y quiescencia, se muestran como estrategias adaptativas que podrían dar cuenta de la gran capacidad invasora alrededor del mundo. *P. canaliculata* está asociada a numerosos simbioses en su rango de distribución original, aunque sólo algunos pueden estar implicados en enfermedades humanas como dermatitis (urticaria de los nadadores) y, notablemente, la meningoencefalitis eosinofílica (provocada por el nemátodo *Angiostrongylus cantonensis*). Además de las barreras físicas contra los agresores (conchilla, tegumento), este animal está dotado de un sistema inmune innato compuesto de hemocitos, los cuales no sólo se encuentran en circulación, sino que frecuentemente infiltran diversos tejidos y órganos y además, son capaces de formar aglomerados esféricos en el riñón y pulmón que participan en la defensa contra los agresores. Por otra parte, este animal es capaz de enfrentar dos ciclos de actividad-quiescencia (uno de estivación y otro de hibernación) que implican la alternancia de hipoxia y reoxigenación, y la participación de defensas antioxidantes y de chaperonas moleculares; aunque el estado de conocimiento bioquímico y proteómico de la estivación ha avanzado substancialmente, la hibernación recién ha comenzado a estudiarse (Sectyp-UNCuyo, 2011-2013). El abordaje de ambas estrategias de defensa de esta ampularia se hará a través de los siguientes objetivos específicos: (a) caracterizar las células troncales comprometidas con linaje/s hemocitario/s, (b) investigar la participación de las diferentes barreras orgánicas *in vivo* (riñón y pulmón) e *in vitro* (agregados de hemocitos en cultivo) frente al desafío de antígenos bacterianos (lipolisacárido) y parasitarios (*A. cantonensis*, en colaboración con los Dres. Alessandra Morassutti y Carlos Graeff-Teixeira, de la Pontificia Universidade de Rio Grande do Sul, PUCRS) y, (c) profundizar el estudio de las diferentes defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas durante el ciclo actividad-hibernación.

**Objetivos:**1. Defensas inmunitarias:

1.1. Investigar la presencia de células madre (progenitoras hemocitopoyéticas o mesenquimales) circulantes.

1.2. Investigar el rol de las distintas barreras orgánicas en la respuesta a antígenos (bacterianos y de *A. cantonensis*).

1.3. Investigar la formación *in vitro* de esferoides en respuesta a los antígenos precedentes.

2. Defensas contra el daño oxidativo:

2.1. Completar el estudio de la participación de defensas enzimáticas (CAT, SOD) y no enzimáticas (ácido úrico, glutatión reducido) durante el ciclo actividad-hibernación.

2.2. Estudiar la participación de chaperonas moleculares (Hsc70, 73 kDa; Hsp70, 72 kDa y Hsp90 durante el ciclo de actividad-hibernación.

## 2 - Grado de Avance de los objetivos propuestos

Objetivo	% Avance
Objetivo 1: 1.1. Investigar la presencia de células madre (progenitoras hemocitopoyéticas o mesenquimales) circulantes.	75%
Objetivo 2: 2.1. Completar el estudio de la participación de defensas enzimáticas (CAT, SOD) y no enzimáticas (ácido úrico, glutatión reducido) durante el ciclo actividad-hibernación.	100%
Objetivo 2: 2.2. Estudiar la participación de chaperonas moleculares (Hsc70, 73 kDa; Hsp70, 72 kDa y Hsp90 durante el ciclo de actividad-hibernación.	100%
Objetivo 1: 1.2 Investigar el rol de las distintas barreras orgánicas en la respuesta a antígenos (bacterianos y de <i>A. cantonensis</i> ).	50%
Objetivo 1: 1.3. Investigar la formación in vitro de esferoides en respuesta a los antígenos precedentes	25%
<b>Porcentaje de avance general del proyecto: 70% (media de los 5 objetivos específicos propuestos).</b>	<b>70%</b>

### 3 - Resultados Preliminares

El **primer objetivo general del proyecto**, que involucra el estudio de las defensas inmunitarias de *Pomacea canaliculata* se encuentra en un porcentaje de avance del **60%**, habiéndose completado el 100% del **objetivo específico 1.1**. En este objetivo podemos resumir que en muestras de hemolinfa, mediante estudios de citometría de flujo ('cell-sorting'), microscopía óptica y electrónica, se observaron tres subpoblaciones hemocitarias, en las que predominan los hialinocitos, agranulocitos y granulocitos. Dado que mediante citometría no se pudo diferenciar una población celular que corresponda a células madre, se avanzó en el estudio del posible órgano hematopoyético mediante técnicas histológicas. Tanto el riñón como el pulmón fueron estudiados con microscopía óptica (convencional y reconstrucción tridimensional) y microscopía electrónica. Para ambos casos, las técnicas empleadas permitieron la caracterización de su estructura, irrigación y drenaje, inclusive describiéndose en el pulmón la presencia de la membrana respiratoria, conformada por (1) células epiteliales que forman cámaras hemolinfáticas terminales que conforman una "lámina respiratoria", y (2) conjuntos de células columnares ciliadas y células caliciformes dispuestas como "penachos" que generan una secreción mucosa que cubriría la superficie cavitaria del pulmón. Aunque los hallazgos sirven para tener un mejor conocimiento de nuestro modelo experimental, en ambos tejidos no pudo observarse la presencia del tejido hematopoyético. El **objetivo específico 1.2**, referida al estudio del rol de las barreras orgánicas frente a antígenos, se encuentra en un estado de avance del 50%, ya que en el estudio morfológico realizado para el desarrollo del objetivo antepuesto, se observó que el riñón de *P. canaliculata* contiene extensos islotes de hemocitos, por lo que se estudió la capacidad fagocítica diferencial de los hemocitos tanto circulantes como renales, como primer paso para dilucidar el rol funcional de cada uno de estos tipos celulares. La intensidad de autofluorescencia estudiada mediante citometría, permitió separar los hemocitos renales (que no autofluorescen) de las células epiteliales renales. La población de hemocitos renales correspondió por microscopía a agranulocitos y hialinocitos. Luego, se expuso a hemocitos circulantes (separados por 'cell sorting' y totales) y hemocitos renales a perlitas fluorescentes y se cuantificó la fluorescencia asociada a células (índice de fagocitosis) por citometría de flujo. Los hialinocitos circulantes mostraron un índice de fagocitosis significativamente más alto que el de los agranulocitos y granulocitos, pero no mostraron diferencias estadísticamente significativas con el de los hemocitos circulantes totales. De manera interesante, la exposición a las perlitas resultó en una degranulación generalizada de los granulocitos, aun cuando solo algunas de estas células mostraron actividad fagocítica. Además, las células degranuladas mostraron condensación del núcleo, lo que sugiere inducción de muerte celular. Por otra parte, los hemocitos renales mostraron, en conjunto, un índice de fagocitosis semejante al de los agranulocitos y granulocitos circulantes. Hasta el momento podemos concluir que los hialinocitos, tanto circulantes como renales, son las principales células fagocíticas en esta especie. Además, tanto los agranulocitos como los granulocitos circulantes muestran una menor actividad fagocítica. Por su parte, los granulocitos, ya sea que muestren o no actividad fagocítica, pierden sus gránulos cuando son expuestos a partículas extrañas; esta degranulación podría estar relacionada con la liberación de sustancias antimicrobianas. En cuanto al **objetivo específico 1.3**, se está avanzando en el estudio de la formación de esferoides por parte de los hemocitos (25% de avance), ya que en observaciones previas de nuestro grupo de trabajo se había observado la formación de agregados esferoidales en cultivos primarios de hemocitos de *P. canaliculata*. Por ello, se estudió la reacción de los hemocitos frente a un desafío inmunológico, inyectando levaduras en la masa visceral de machos adultos. Dado que el territorio visceral drena principalmente hacia el pulmón, se observó en este órgano la presencia de esferoides, encontrando los mismos dentro de los grandes vasos pulmonares, los que después resultaban atascados dentro de los pequeños vasos, y se expandían

hacia el tejido conectivo circundante. En el riñón, que normalmente contiene islotes de hemocitos entre sus criptas, también se observó la formación de agregados esferoidales 96 horas después de la inyección. Por estos resultados preliminares hipotetizamos que la formación de esferoides es un componente clave durante la respuesta de defensa en esta especie y el desafío contra otros agentes patógenos podrá evidenciar el rol de este mecanismo de defensa.

El **segundo objetivo general del proyecto**, que involucra el estudio de las defensas contra el estrés oxidativo durante la hibernación en *P. canaliculata* se encuentra en un porcentaje de avance del **100%**, habiéndose cumplimentado los dos objetivos específicos propuestos. Brevemente, se trabajó con el modelo de hipometabolismo inducido por hibernación que se había caracterizado en nuestro anterior proyecto de la SECTyP-UNCuyo, estableciéndose cuatro grupos experimentales: 1) Control, 2) Hibernación, 3) Arousal 30 min y 4) Arousal 24 h. En el riñón la determinación de TBARs mostraron que aunque el estrés oxidativo sufrido por este órgano durante la hibernación es no significativo, con respecto al nivel observado en el grupo control, el nivel de peroxidación lipídica disminuye durante la reactivación del animal. Esto último se corresponde con el aumento de las defensas antioxidantes observado durante el arousal temprano y el principal antioxidante que actuaría durante el arousal del animal es la actividad de la SOD que aumenta significativamente durante el arousal tardío y el ácido úrico, que disminuye su concentración en forma significativa durante todo el arousal. En el hepatopáncreas hay un aumento significativo de los TBARs durante la hibernación, momento en el cual se observa que las defensas antioxidantes se mantienen estables y evidentemente no serían suficientes para limitar el daño por estrés oxidativo. Durante la reperfusión acontecida en el arousal, este órgano cuenta con mecanismos de defensa más eficientes como la actividad de la CAT y el glutatión, que le permiten disminuir el estrés oxidativo producido en la hibernación. Finalmente, en el músculo del pie pudimos observar que es el órgano más desprovisto de una defensa antioxidante eficiente, dado que los productos de peroxidación se acumulan tanto en la hibernación como en el arousal temprano y en el arousal tardío el sistema parece volver a lograr la homeostasis, gracias a un aumento de las defensas antioxidantes. En este órgano, los mecanismos de defensa que participan equilibrando nuevamente el sistema parecen ser la actividad de la CAT y el glutatión. El ácido úrico puede ser un mecanismo importante de defensa durante la hibernación, ya que es consumido en este período. En cuanto al segundo objetivo específico pudimos observar que los niveles de Hsc70 y Hsp70 en el riñón permanecieron estables durante el ciclo de actividad-hibernación, mientras que la expresión de Hsp90 se incrementó durante la hibernación. La expresión de Hsp70 y Hsp90 se incrementó durante la hibernación en el músculo del pie. En ambos tejidos, estos incrementos volvieron a los observados en el grupo control durante el arousal. Lo realizado hasta aquí, nos ha permitido observar que esta especie puede tolerar períodos prolongados de baja temperatura, entrando en quiescencia y durante esta situación hipometabólica existen adaptaciones fisiológicas que le permiten al animal sobrellevar los cambios acontecidos durante el ciclo de actividad-hibernación. En particular hemos podido complementar el estudio del perfil de mecanismos de defensa antioxidante y el estudio de las proteínas del golpe de calor (Hsp70 y Hsp90) que participarían en la protección celular y molecular, resultados que esperamos sean próximamente publicados.

#### 4 - Dificultades Encontradas

Hemos tenido algunas dificultades especialmente en el desarrollo del primer objetivo general del proyecto, ya que la preparación de muestras de hemocitos para microscopía electrónica permite interpretar estructuras para su caracterización, pero a nuestro criterio no tienen la calidad necesaria para su publicación. Asimismo, hemos tenido algunas dificultades para conseguir los agentes patógenos propuestos para el estudio de la respuesta inmune de *P. canaliculata*, que esperamos poder conseguir o reemplazar en la segunda etapa del proyecto.

## 5 - Director

### 5.1 - Conocimiento de Idiomas

Idioma Nivel de conocimiento

Inglés Lee, Habla y Escribe (Intermediate High, Instituto New England)

### 5.2 - Estudios de Posgrado

#### Títulos de posgrado obtenidos

Título	Fecha	Universidad
Doctor en Medicina	2009-03-17	Universidad Nacional de Cuyo (Facultad de Ciencias Médicas)
Doctor en Ciencias Biológicas (Orientación en fisiología)	2011-03-17	Universidad Nacional de Cuyo (PROBIOL)
Especialista en Docencia Universitaria	2012-03-23	Universidad Nacional de Cuyo (Facultad de Filosofía y Letras)

### 5.3 - Formación de Recursos Humanos

#### Becarios

Nombre y Apellido	Título	Organismo
Pablo Miguel Giuffrida	Rol de proteínas de golpe de calor y antioxidantes en un modelo de hibernación. Setiembre 2013 – Setiembre 2014.	Becas Estímulo a las Vocaciones Científicas, Consejo Interuniversitario Nacional
Pablo Miguel Giuffrida	Mecanismos de defensa puestos en juego ante el hipometabolismo inducido por hibernación. Noviembre 2012 – Noviembre 2013.	Beca para Promoción de la Investigación para Alumnos, Secretaría de Ciencia, Técnica y Posgrado de la Universidad Nacional de Cuyo

### 5.4 - Actividad desarrollada durante el primer año

## Descripción de la actividad desarrollada

---

Mi desempeño ha sido participando activamente en la realización de los experimentos que involucran especialmente el objetivo 2 del proyecto, habiendo logrado la concreción del 100% del plan de trabajo propuesto para ese objetivo. Asimismo he participado en el planeamiento general de los experimentos; guía y apoyo de los becarios del proyecto; análisis de resultados; escritura de informes de becas, resúmenes para congresos y publicaciones.

## A - Codirector

Nombre y Apellido	Estado	Satisfactorio	No Satisfactorio	¿Envió Informe de Avance?
<b>Israel Anibal Vega</b>	Activo			<b>Enviado!</b>

**B - De los integrantes del equipo de trabajo**

Integrante	Estado	Satisfactorio	No Satisfactorio	¿Envió Informe de Avance?
<b>Cristian Rodriguez</b>	Activo	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<b>Enviado!</b>
<b>Pablo Miguel Giuffrida</b>	Baja: 2015-05-13	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<b>No Enviado</b>

## 6 - Transferencias Realizadas

### **Publicaciones:**

- Cueto JA\*, Rodriguez C\*, Vega IA & Castro-Vazquez A. "Immune Defenses of the Invasive Apple Snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae): Phagocytic Hemocytes in the Circulation and the Kidney". *Plos One*. 10: e0123964
- Hayes, K.A., Burks, R., Castro-Vazquez, A., Darby, P.C., Heras, H., Martín, P.R., Qiu, J.-W., Thiengo, S.C., Vega, I.A., Wada, T., Yusa, Y., Burela, S., Cadierno, M.P., Cueto, J.A., Dellagnola, F.A., Dreon, M., Frassa, V.M., Giraud-Billoud, M., Godoy, M.S., Ituarte, S., Koch, E., Matsukura, K., Pasquevich, M.Y., Rodriguez, C., Saveanu, L., Seuffert, M.E., Strong E.M, Sun, J., Tamburi, N.E., Tiecher, M.J., Turner, R.L., Valentine-Darby, P., Cowie, R.H. "Insights from an integrated view of the biology of apple snails (Caenogastropoda: Ampullariidae)". *Malacologia*. En Prensa, 2015.
- Giraud-Billoud M, Vega IA, Giuffrida PM, Castro-Vazquez A. "Differential antioxidant and heat shock protein responses to hibernation-induced hypometabolism and arousal in *Pomacea canaliculata*". En redacción.

### **Comunicaciones a congresos:**

- Rodriguez C, Cueto JA, Vega IA & Castro-Vazquez A. "Differential phagocytic ability of circulating hemocyte subpopulations in the apple snail *Pomacea canaliculata*". XXXII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Cuyo, San Luis, Argentina. Diciembre 2014.
- Giuffrida PM, Vega IA, Castro-Vazquez, A, Giraud-Billoud M. "Ciclo de actividad-hibernación en *Pomacea canaliculata* como modelo de estudio del fenómeno de preparación para el estrés oxidativo: I. Caracterización del modelo y rol de proteínas del golpe de calor (HSP)". XIII Jornadas de Investigación de la Facultad de Ciencias Médicas, UNCuyo. Mendoza, Argentina. Noviembre 2014.
- Giuffrida PM, Vega IA, Castro-Vazquez, A, Giraud-Billoud M. "Ciclo de actividad-hibernación en *Pomacea canaliculata* como modelo de estudio del fenómeno de preparación para el estrés oxidativo: II. Rol de las defensas antioxidantes en la tolerancia de *Pomacea canaliculata* a la hibernación". XIII Jornadas de Investigación de la Facultad de Ciencias Médicas, UNCuyo. Mendoza, Argentina. Noviembre 2014.
- Giuffrida, PM; Giraud-Billoud, M; Vega, IA; Castro-Vazquez, A. "Differential Heat Shock Protein Responses to Hibernation-Induced Hypometabolism and Arousal". 1<sup>st</sup> Pan American Congress of Physiological Science: "Physiology without Borders", Foz do Iguazú, Brasil. Agosto de 2014.
- Rodriguez C, Cueto JA, Vega IA, Castro-Vazquez A. "Flow cytometric analysis of circulating hemocytes in the apple snail *Pomacea canaliculata*". XXXI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Cuyo, Mendoza, Argentina. Diciembre 2013.
- Rodriguez C, Vega IA & Castro-Vazquez A. Pulmón e islotes hemocitarios renales en la ampullaria *Pomacea canaliculata*: relación estructura/función. 5to Taller Biología de Ampullariidae, Monte Hermoso, Argentina. Diciembre 2013.
- Giuffrida PM, Vega IA, Giraud-Billoud M. "Antioxidant defenses involved in the tolerance to hibernation of a freshwater snail" Comunicación libre. VIII Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine-South American Group (VIII SFRBM-SAG). Buenos Aires, Argentina. Octubre 2013.

## 7 - Financiamiento

**Destino:** Gastos varios del proyecto

**Institución:** CONICET

**Monto acordado:** 5500