

Tesis doctoral 2021



# Estrategias reproductivas de moluscos gasterópodos



Caracterización de las  
defensas de los huevos de  
*Pomacea scalaris* y  
*Pomacea diffusa*  
(Caenogastropoda:  
Ampullaridae).

**Directores:**  
**Horacio Heras**  
**Marcos Dreon**

*Tabata R. Brola*

Tesis doctoral 2021

Estrategias reproductivas de moluscos  
gasterópodos. Caracterización de las  
defensas de los huevos de *Pomacea scalaris* y  
*Pomacea diffusa* (Caenogasteropoda:  
Ampullaridae)

Lic. Tabata R. Brola

Directores: Horacio Heras y Marcos S. Dreon

Facultad de Cs. Naturales y Museo, UNLP.

La presente tesis fue realizada  
en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas  
de La Plata, “Profesor Dr. Rodolfo. R. Brenner”  
(UNLP-CONICET)



Universidad Nacional de La Plata

*Dedicado a  
mis papas, Stells y Dani  
a mis hermanos, Chechu y Sebas  
mi compañero, Ari.*

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional de La Plata por la formación y oportunidades brindadas

Al INIBIOLP por haberme abierto las puertas durante mi formación de grado y posgrado

A mis directores, Horacio y Marcos, por haberme dado la posibilidad de crecer en mi carrera profesional, apoyarme día a día en lo personal, enseñarme y acompañarme con infinita paciencia.

A Yani, Leti, Pili, Mati y Santi por ser los mejores amigos/compañeros de trabajo de la historia. Por cada ayuda en la mesada, por cada mate, cada charla, cada palabra de aliento y por su complicidad. En especial a mi mejor amigo, Gigiglio, por estar al lado mío incansablemente.

A todos los integrantes del INIBIOLP, que he tenido la suerte de conocer, por su calidez

A Patricia Fernandez por ser una pieza fundamental en esta tesis y por su calidad humana

A mi familia, que es mi motor de todo, por apoyarme en todo lo que decido emprender

A mis amigos del alma: Nati, Mar, Flor, Mati, Vicky, Po, Lau, Lucy y Lui, por estar desde siempre y para siempre

A Ari, por elegir acompañarme contra viento y marea

## Resumen

El género *Pomacea* es el más derivado y con mayor número de especies dentro de la familia Ampullaridae. Está compuesto por caracoles nativos de América que han sido introducidos en otras partes del mundo donde, algunas de sus especies, se han convertido en una seria plaga para la agricultura. Además, representan un riesgo sanitario al ser hospedadores intermediarios de varios parásitos que pueden afectar a seres humanos. Estos caracoles dulceacuícolas tienen la particularidad de tener oviposición aérea, una adquisición que se ha reconocido clave para el éxito evolutivo del género. En esta inusual estrategia reproductiva, las hembras depositan sus huevos fuera del agua en masas calcáreas coloridas, exponiéndolos a desecación, radiación solar intensa, altas temperaturas y depredación, y sin embargo, las adaptaciones de estos huevos permiten a sus embriones desarrollarse normalmente bajo esas condiciones. Los huevos de *Pomacea* presentan un sistema de protección, tanto frente a factores ambientales como contra la depredación, probablemente el motivo de sus escasos depredadores reportados.

Al igual que la mayoría de los gasterópodos, en *Pomacea*, el embrión se encuentra rodeado por un fluido perivitelino (FPV) que contiene principalmente hidratos de carbono y proteínas (llamadas perivitelinas) a partir de los cuales se nutre el embrión. Las perivitelinas, además, cumplen el rol de protección frente a factores externos. La más abundante del FPV, llamada PV1, es una carotenoproteína no digerible (antinutritiva) que disminuye el valor nutricional de los huevos, con propiedades antioxidantes y fotoprotectoras. Además, le otorga la coloración característica a las puestas de cada especie, posiblemente una señal de advertencia o aposemática. La carotenoproteína de *Pomacea scalaris*, llamada PsSC, presenta además actividad lectina (proteínas que unen hidratos de carbono de manera específica de variadas funciones). En los huevos de animales, las lectinas generalmente se han asociado a la protección contra microorganismos y en las plantas a la defensa contra la herbivoría. Esta actividad lectina está ausente en las demás carotenoproteínas estudiadas del género. Más aún, la composición del FPV varía entre especies: *Pomacea canaliculata* y *Pomacea maculata*, incluidas en el clado canaliculata, presentan una perivitelina neurotóxica ausente en *P. scalaris* que pertenece al clado hermano bridgesii. Coincidentemente, las especies del clado canaliculata son las que han alcanzado mayor expansión e invasividad en las áreas

introducidas. Las diferencias observadas entre los huevos de los dos clados nos llevaron a cuestionarnos si existían mecanismos de defensa bioquímicos dependientes de la posición filogenética de las especies y en consecuencia a profundizar el conocimiento de las perivitelinas del clado *bridgesii*, hasta el momento pobremente estudiado. Por otra parte, se sabe que la administración oral de la fracción soluble de huevo (ESF) de *P. canaliculata* a roedores altera la morfofisiología de su tracto digestivo y disminuye la tasa de crecimiento de estos animales, pero se desconoce el efecto de su administración en otros potenciales depredadores no mamíferos, impulsándonos también a evaluar el efecto de su ingesta sobre el sistema digestivo de anfibios y aves.

Para abordar estos objetivos, iniciamos los estudios caracterizando en profundidad la lectina PsSC y su rol en la defensa contra microorganismos y depredadores. Analizamos su estructura primaria y hallamos que las secuencias de las subunidades de esta lectina no tienen homología con ninguna de las lectinas representadas en las bases de datos. Esta proteína solo presenta elevada similitud de secuencia con sus ortólogos del clado *canaliculata* aunque llamativamente estos no presenten actividad lectina. Evaluamos su especificidad de reconocimiento de hidratos de carbono mediante un microarreglo de glicanos observando que PsSC tiene elevada afinidad por dos motivos de oligosacáridos: gangliósidos y grupo ABO. También evaluamos su capacidad de aglutinar bacterias gram positivas y gram negativas observando que PsSC muestra capacidad para aglutinar estas últimas, pero carece de actividad antimicrobiana contra las cepas evaluadas. Además, evaluamos el efecto de su ingestión sobre el tracto digestivo de roedores donde observamos que afectaba la morfología de las vellosidades del intestino, así como el patrón de glicosilación y extensión de su epitelio absortivo. En conjunto, estos resultados indican que PsSC tendría una doble función ya que estaría implicada en la protección del huevo tanto contra la invasión microbiana como contra depredadores mamíferos.

Continuando con el estudio de las perivitelinas del clado *bridgesii*, se analizaron los huevos de *P. diffusa*. Se aisló y caracterizó estructural y funcionalmente su perivitelina más abundante: una carotenoproteína a la que denominamos PdPV1. Se determinó su estructura primaria y nuevamente hallamos que está compuesta por polipéptidos que presentan homología únicamente con otras secuencias del género *Pomacea*. PdPV1 presenta actividad lectina con características estructurales y funcionales similares a las de

PdSC y ausencia de homología de secuencia con otras lectinas conocidas, excepto PsSC. PdPV1 es estable estructuralmente en un amplio rango de pH y temperaturas y soporta la digestión por proteasas *in vitro* e *in vivo*, siendo capaz de atravesar el tracto digestivo de ratones inalterada, indicando que es una proteína antinutritiva. En conjunto estos avances permitieron realizar las primeras generalizaciones de las PV1s de *Pomacea* demostrando que las carotenoproteínas del clado *bridgesii* presentan una novedosa actividad lectina ausente en los ortólogos del clado *canaliculata*. Además, el FPV de *P. diffusa*, al igual que el de *P. scalaris*, no presenta neurotoxinas. En conjunto estos resultados, indican que las defensas de los caracoles del género *Pomacea* son clado-específicas.

Por último, se amplió el conocimiento sobre los posibles blancos de las defensas bioquímicas de los huevos, evaluando el efecto de la administración oral de la ESF sobre el tracto digestivo de un anfibio (la rana toro *Lithobates catesbeianus*) y un ave (la codorniz *Coturnix coturnix*). Analizamos las alteraciones en la morfometría de las vellosidades y los patrones de glicosilación intestinal, su superficie absortiva relativa y la histopatología de los tejidos luego de 24 h y 48 h de la administración. Los resultados muestran que tanto anfibios como aves se ven afectados negativamente 24 h posteriores a la ingestión del extracto de huevo. En los anfibios administrados con ESF de *P. canaliculata* se observa un ensanchamiento de las vellosidades y engrosamiento de la lámina propia, así como una leve hemorragia y presencia de células inflamatorias, mientras que en las aves administradas con ESF de una especie de cada clado, se vio afectada la morfometría de las vellosidades, la superficie absortiva relativa del intestino y se observó edema e hiperemia de las vellosidades intestinales, independientemente de la ESF del clado empleado. En las ranas, se ensayó además la letalidad de la ESF por administración intraperitoneal, donde observamos que ningún animal resultó afectado tras este ensayo. Este resultado es llamativo ya que investigaciones previas han demostrado que la ESF de *P. canaliculata* es letal tanto para roedores como para codornices. Los resultados, en conjunto, demuestran que las defensas bioquímicas de los caracoles del género *Pomacea* no solo son efectivas frente a mamíferos, sino también frente a aves y anfibios.

En síntesis, con este trabajo de Tesis Doctoral avanzamos en el conocimiento de las defensas bioquímicas de los huevos de *Pomacea* en un contexto ecológico-evolutivo. Se demuestra que estas defensas antidepredador son clado-específica y estarían relacionadas



con el potencial de invasividad de las especies. Se demuestra también que estas defensas bioquímicas complejas resultan efectivas frente a una diversidad de animales potencialmente depredadores más amplia de lo que se conocía, donde perivitelininas indigeribles que afectan el sistema digestivo juegan un papel central. Desde el punto de vista evolutivo este mecanismo de protección de los huevos, único en animales, es muy similar al que utilizan las plantas como protección contra herbívoros, un caso de convergencia evolutiva, aunque, a diferencia de las plantas, estas defensas estarían aquí advertidas por la llamativa coloración de las puestas. Este inusual conjunto de defensas explicaría la casi ausencia de depredadores reportados para los huevos del género ampliando el conocimiento de las relaciones depredador-presa a nivel molecular.

## Abstract

*Pomacea* is the most derived genus of Ampullaridae and contains the largest number of species. It includes snails native to America which have been introduced in other parts of the world where some of them became serious agricultural pests. Further, they represent a health risk as they are intermediate hosts of several human parasites. These freshwater snails are amphibious which enables them aerial oviposition, a unique and cue acquisition within Ampullaridae associated to the evolutionary success of the genus. In this unusual reproductive strategy, the females deposit colourful egg masses above the water level, exposing them to desiccation, solar radiation, high temperatures and terrestrial predation, yet their embryos develop under these hostile conditions. Even more, they have a protection system against environmental stressors and predators which might be the reasons why there are extremely few predators described for *Pomacea* eggs.

In *Pomacea*, the yolk is poorly developed and replaced by a perivitelline fluid (PVF) that surrounds the embryo, mainly composed of carbohydrates and proteins (named perivitellins) which are its major nutritious source. Perivitellins also play a protective role against biotic and abiotic factors. Indeed, the most abundant PVF perivitelline which is called PV1, is a non-digestible (antinutritive) carotenoprotein that lowers the nutritional value of the eggs, with antioxidant and photoprotective features. Besides, it gives the eggs their characteristic colouration, presumably aposematic. *Pomacea scalaris* carotenoprotein, named PsSC, also has lectin activity (multifunctional proteins that specifically bind glycans). Animal egg lectins are generally associated with the protection against microorganisms while plant lectins with the defence against herbivory. This lectin activity is not observed in PV1s of other species of the genus. Moreover, not all species have the same PVF composition: *Pomacea canaliculata* and *Pomacea maculata*, which belong to the Canaliculata clade, have a neurotoxic perivitelline that is not expressed in *P. scalaris* which belongs to the Bridgesii sister clade. Coincidentally, the Canaliculata clade is the most invasive one. The observed differences between the eggs of these two clades led us to question whether their biochemical defences were dependent on the phylogenetic position of the species. Therefore, we focused in perivitellins of the Bridgesii clade, until now poorly studied. On the other hand, it is known that the oral administration of *P. canaliculata* egg soluble fraction (ESF) to rodents alters the morphophysiology of their

digestive tracts and decreases the growth rate of these animals, but the effects of its administration in non-mammal potential predators was completely unknown, inspiring us to evaluate the effect of egg extracts ingestion on the digestive system of amphibians and birds

To address these goals, we started our studies characterizing in depth PsSC lectin and its role in the defence against microorganisms and predators. We analysed its primary structure and found that its sequences have no homology with other known lectins on the databases. This protein has high sequence similarity with the orthologues of the *Canaliculata* clade although they do not have the same functional activity. We evaluated its carbohydrate recognition specificity, showing that PsSC has high affinity for two different oligosaccharides: gangliosides and ABO group. We also evaluated its agglutinating activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria showing that PsSC agglutinates Gram-negative bacteria, although it has no antimicrobial activity. Further, we evaluated its effect upon ingestion on the digestive tract of rodents where we observed that it affects villi morphology as well as enterocytes glycosylation patterns and the relative absorptive area of the small intestine. As a whole these results indicate that PsSC might be involved in the egg protection against both, microbe invasion and mammalian predators.

Carrying on with our studies on the perivitellins of the *Bridgesii* clade, we analysed *P. diffusa* eggs, another member of the clade. We isolated and structurally and functionally characterized its major perivitelline: a carotenoprotein which we named PdPV1. We determined its primary structure and found that it is composed of 6 subunits which only have homology with other sequences of the genus *Pomacea*. PdPV1 has lectin activity with structural and functional features similar to PsSC and no sequence homology with other known lectin, except for PsSC. We analysed its structural stability and found that it is highly stable in a wide range of pH values and temperatures and that it resists proteases digestion *in vitro*. Further, if it is orally administrated it can withstand the digestive tract of mice unaltered, showing that it is an antinutritive protein. These advances in the knowledge of perivitellins let us make some evolutionary generalizations regarding the relationship between egg defences and their phylogenetic position. The results indicate that *Pomacea* snails defences are clade-specific which was supported, among other results, by the fact that carotenoproteins of the *Bridgesii* clade have a novel lectin activity which is not

observed in the orthologues of the Canaliculata clade and *P. diffusa* and *P. scalaris* have no neurotoxins in its PVF.

Finally, we turn into the study of non-mammal possible targets of the egg biochemical defences evaluating the effect of the ESF oral administration to an amphibian (the bullfrog *Lithobates catesbeianus*) and a bird (the quail *Coturnix coturnix*). We fed ESF to the animals and analysed their small intestine villi morphometry, their glycosylation patterns, the relative absorptive surface and tissue histopathology after 24 and 48 h of ESF administration. Our results showed that amphibians as well as birds intestines were largely affected 24 h after ESF ingestion. In amphibians administrated with ESF of *P. canaliculata*, an enlargement of the villi and a thickening of the lamina propria were observed, as well as a slight haemorrhage and presence of inflammatory cells. In birds orally administered with the ESF of a species from each clade, villi morphometry and relative intestinal absorptive surface were also affected, and villi hyperaemia and oedema were observed regardless the ESF ingested. In amphibians we also tested the ESF lethality by intraperitoneal injection, though we observed no dead animals in this assay. This was a striking result as previous research demonstrated that *P. canaliculata* ESF was lethal for both mice and quails with several associated neurological signs. Overall, these results provide the first evidence that the biochemical defences of *Pomacea* snails are effective not only against mammals but also against birds and amphibians.

To sum up, in this PhD thesis we move forward into the knowledge of the egg biochemical defences of *Pomacea* in an ecological and evolutionary context. We demonstrate that antipredator strategies are clade-specific and related to the species invasiveness. We also demonstrated that these complex biochemical defences are effective against a wider variety of vertebrate predators than previously acknowledged, where perivitellins play a central role. From an evolutionary point of view, this mechanism to deter egg predators is unique among animals but resembles those used by plants against herbivorous animals. This is a case of evolutive convergence although, unlike plants, these defences are warned egg colouration. These unusual set of defences might explain the almost complete lack of egg predators.

# Índice

<b>1</b>	<b>Introducción general</b>	<b>13</b>
1.1.	Aspectos generales de la familia Ampullariidae (Mollusca: Gastropoda). <i>Pomacea</i> como modelo de estudio	14
1.2.	Biología reproductiva	18
1.3.	Defensas bioquímicas de los huevos del género <i>Pomacea</i>	21
<b>2</b>	<b>Hipótesis y Objetivos</b>	<b>25</b>
2.1	Hipótesis	26
2.2	Objetivo general	26
2.3	Objetivos particulares	26
<b>3</b>	<b>Materiales y Métodos generales</b>	<b>27</b>
3.1	Animales de laboratorio	28
3.2	Muestreo y establecimiento de las colonias en el laboratorio	28
3.3	Identificación genética de <i>P. diffusa</i>	28
3.3.1	Extracción de ADN a partir de tejido	29
3.3.2	Amplificación mediante PCR	29
3.3.3	Electroforesis en gel de agarosa e identificación genética	29
3.4	Obtención de la fracción soluble de huevos (ESF)	30
3.5	Aislamiento y purificación de las PV1s	30
3.5.1	Ultracentrifugación en gradiente de densidad	30
3.5.2	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	31
3.6	Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)	32
3.6.1	PAGE-Nativo	32
3.6.2	PAGE-SDS	32
3.6.3	Detección de proteínas	32
3.7	Estimación de la concentración de proteína	33

3.7.1	Método de Lowry .....	33
3.7.2	Método de Bradford.....	33
3.8	Anticuerpos policlonales .....	33
3.9	Análisis estadístico.....	34
<b>4</b>	<b>Caracterización de la lectina PsSC de <i>Pomacea scalaris</i> y su rol en la defensa de los huevos .....</b>	<b>35</b>
4.1	Introducción.....	36
4.2	Métodos.....	38
4.2.1	Secuencia de aminoácidos de PsSC.....	38
4.2.2	Marcación Fluorescente.....	38
4.2.3	Cultivo celular.....	39
4.2.3.1	Ensayos de unión a la superficie celular .....	40
4.2.3.2	Citotoxicidad.....	40
4.2.4	Análisis de la especificidad de unión de PsSC empleando un microarreglo de glicanos ( <i>Glycan array screening</i> ).....	41
4.2.5	Actividad antimicrobiana y aglutinación de microorganismos.....	41
4.2.6	Efecto de la ESF sobre el epitelio intestinal de rata.....	42
4.2.6.1	Histología y mediciones morfológicas.....	43
4.2.6.2	Histoquímica con lectinas.....	44
4.3	Resultados.....	44
4.3.1	Estructura primaria de PsSC.....	44
4.3.2	Especificidad de unión a glicanos mediante <i>Glycan array</i> .....	47
4.3.3	Aglutinación de microorganismos.....	48
4.3.4	Interacción con la superficie celular y citotoxicidad.....	49
4.3.5	Efecto de la administración oral de la ESF sobre el epitelio digestivo .....	51
4.4	Discusión .....	53
4.5	Conclusión.....	56

<b>5. Defensas bioquímicas de los huevos de <i>Pomacea diffusa</i>: caracterización de su PV1 y relaciones filogenéticas</b> .....	<b>57</b>
5.1 Introducción.....	58
5.2 Métodos.....	60
5.2.1 Aislamiento y purificación de PdPV1.....	60
5.2.2 Estimación del peso molecular.....	60
5.2.3 Espectroscopia de absorción.....	61
5.2.4 Dispersión de rayos-X de bajo ángulo (SAXS).....	61
5.2.5 Espectroscopia de fluorescencia.....	64
5.2.6 Estabilidad estructural de PdPV1.....	65
5.2.6.1 Estabilidad térmica.....	66
5.2.6.2 Estabilidad frente a pH.....	66
5.2.6.3 Estabilidad cinética.....	67
5.2.6.4 Desnaturalización por caótopo.....	67
5.2.7 Reactividad cruzada.....	68
5.2.7.1 Western blot.....	68
5.2.7.2 Detección por quimioluminiscencia.....	69
5.2.8 Contenido de hidratos de carbono.....	69
5.2.8.1 Método de fenol-sulfúrico.....	69
5.2.8.2 Determinación del patrón de glicanos.....	70
5.2.9 Estructura primaria.....	70
5.2.9.1 Obtención de las secuencias de aminoácidos.....	70
5.2.9.2 Análisis bioinformático.....	71
5.2.10 Resistencia a la digestión por proteasas.....	71
5.2.10.1 Ensayos <i>in vitro</i> .....	71
5.2.10.2 Ensayos <i>in vivo</i> .....	72
5.2.11 Caracterización de la actividad lectina.....	72
5.2.11.1 Ensayos de hemaglutinación.....	72
5.2.11.2 Inhibición de la hemaglutinación.....	73
5.2.11.3 Especificidad de unión a glicanos.....	74
5.2.12 Neurotoxicidad en roedores.....	74

5.3	Resultados	74
5.3.1	Estructura de PdPV1	74
5.3.2	Relaciones filogenéticas	80
5.3.3	Estabilidad estructural	82
5.3.3.1	Estabilidad a diferentes pH	82
5.3.3.2	Estabilidad térmica	83
5.3.3.3	Estabilidad cinética	85
5.3.3.4	Estabilidad química	85
5.3.4	Resistencia a la digestión gastrointestinal	86
5.3.5	Actividad Lectina	87
5.3.6	Neurotoxicidad	90
5.4	Discusión	90
5.5	Conclusión	93
<b>6</b>	<b>Efecto de los huevos de <i>Pomacea</i> sobre depredadores no mamífero</b>	<b>94</b>
6.1	Introducción	95
6.2	Métodos	97
6.2.1	Obtención de muestras y animales para experimentación	97
6.2.2	Ensayos en ranas	97
6.2.2.1	Letalidad	97
6.2.2.2	Alimentación forzada y preparación del tejido	98
6.2.2.2.1	Análisis morfométrico del intestino delgado	98
6.2.2.2.2	Presencia de eosinófilos y macrófagos	99
6.2.2.2.3	Determinación de colágeno en las vellosidades intestinales	100
6.2.2.2.4	Ensayo de unión de PcPV2 a enterocitos	101
6.2.2.2.5	Histoquímica con lectinas	101
6.2.3	Ensayos en codornices	102
6.2.3.1	Alimentación forzada y preparación del tejido	102
6.2.3.1.1	Análisis morfométrico del intestino delgado	103
6.3	Resultados	103



---

6.3.1	Efecto de la ESF sobre la morfología del digestivo de ranas toro .....	103
6.3.2	Respuesta inflamatoria del intestino en ranas toro.....	105
6.3.3	Efecto de la ingesta de ESF en la glicosilación de los enterocitos de rana.....	106
6.3.4	Inyección intraperitoneal de la ESF en ranas.....	109
6.3.5	Efecto sobre la morfología del digestivo de codornices.....	109
6.3.6	Morfometría de las vellosidades intestinales de codornices.....	111
6.4	Discusión .....	112
6.5	Conclusión.....	115
<b>7</b>	<b>Conclusiones generales .....</b>	<b>117</b>
<b>8</b>	<b>Referencias.....</b>	<b>120</b>

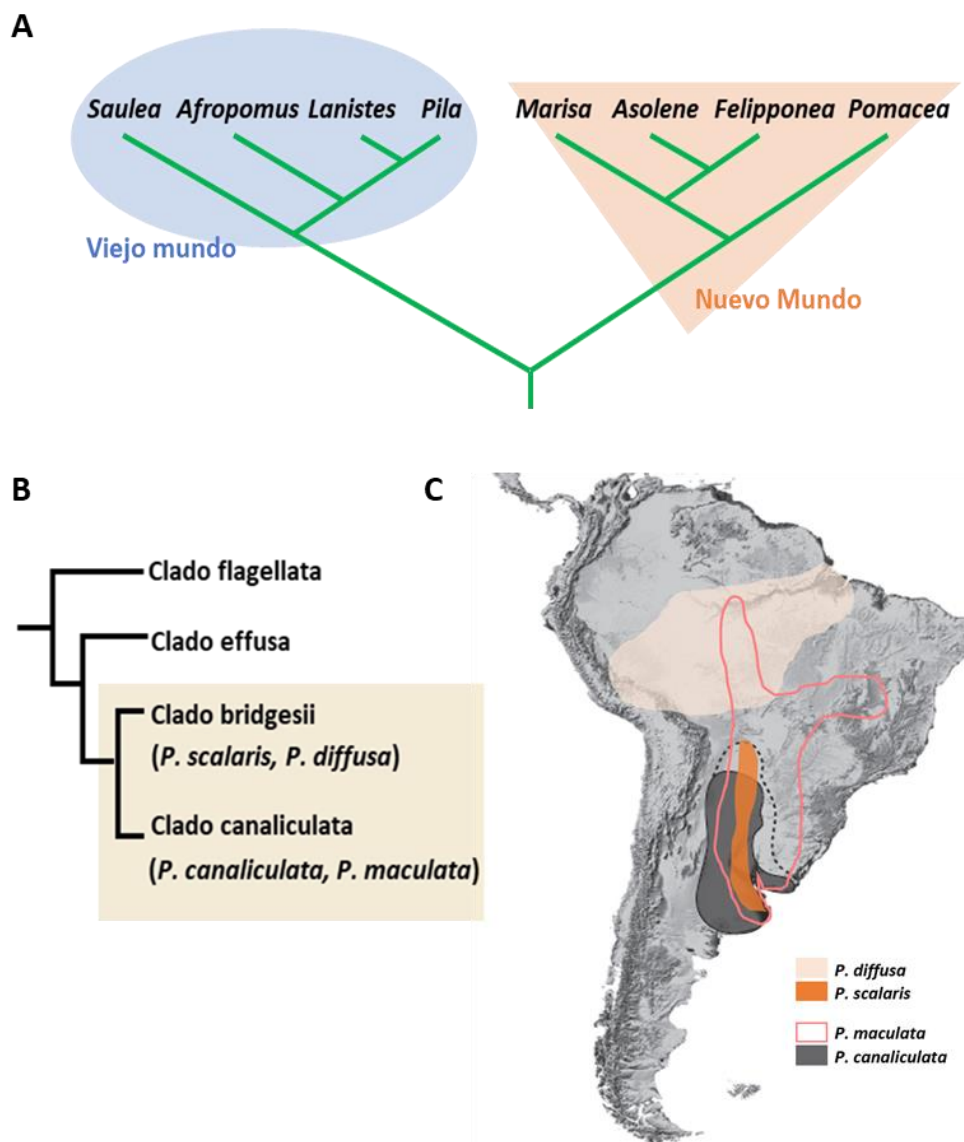
# 1 Introducción general

### 1.1 Aspectos generales de la familia Ampullariidae (Mollusca: Gastropoda). *Pomacea* como modelo de estudio.

Los ampuláridos son una familia de gasterópodos operculados de agua dulce que se distribuyen principalmente a lo largo de las regiones húmedas de los trópicos y subtrópicos de África, América y Asia. En la región de América del Sur es donde han alcanzado el mayor grado de diversificación (Hayes et al. 2009b). Estos caracoles se conocen comúnmente como “caracoles manzana” por la presencia de una concha globosa y umbilicada de la mayoría de sus especies (Hayes et al. 2015). Son componentes mayoritarios en algunos ambientes de agua dulce, algunas especies son estrictamente acuáticas y otras de hábitos anfibios, siendo un vínculo clave entre las cadenas tróficas acuáticas y terrestres. Los ampuláridos tienen la característica de presentar en su cavidad paleal una branquia y una región vascularizada y modificada que cumple la función de pulmón, permitiéndoles la respiración aérea (Rodríguez et al. 2019). La capacidad de respirar aire hace que puedan sobrevivir periodos de sequía enterrados en el barro e incluso tolerar bajas concentraciones de oxígeno (Seuffert & Martín 2008).

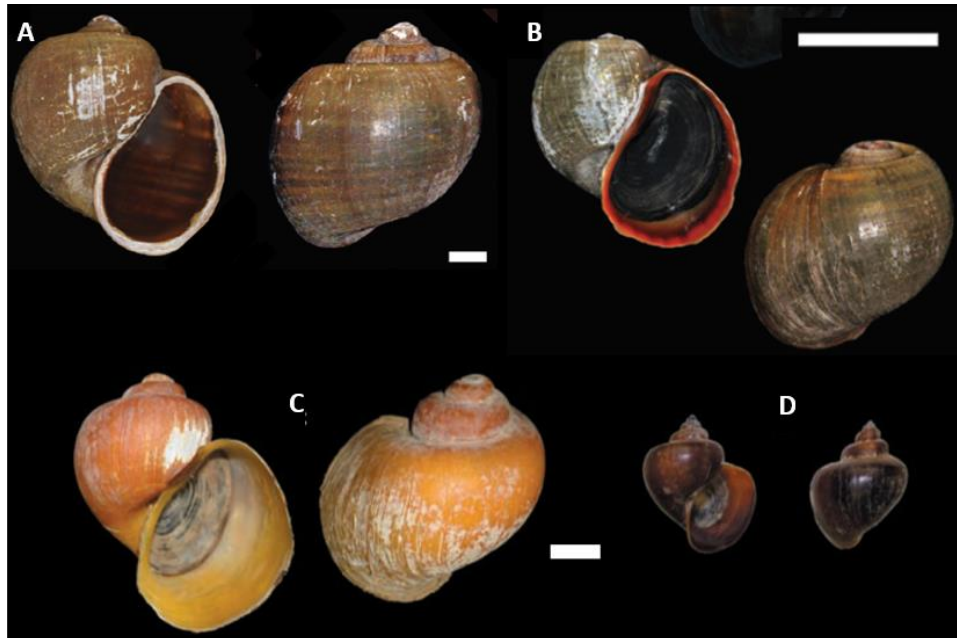
La Familia pertenece al clado Caenogastropoda, el más diverso y numeroso dentro de los gasterópodos, donde encontramos aproximadamente el 60% de las especies vivientes (Ponder et al. 2008). Comprende 186 especies distribuidas en 9 géneros, actualmente agrupados como ampuláridos del Viejo y Nuevo Mundo. Entre los ampuláridos del Viejo Mundo se encuentran: *Afropomus* (Pilsbry & Bequaert, 1927), *Saulea* (Gary, 1867) y *Lanistes* (Montfort, 1810) en África, *Pila* (Röding, 1978) en África y Asia, y *Forbespomus* (Bequaert & Clench, 1937) en Asia. Los pertenecientes al Nuevo Mundo son: *Felipponea* (Dall, 1919), *Marisa* (Gray, 1824) y *Asolene* (d’Orbigny, 1838) de América del Sur, y *Pomacea* (Perry, 1810) de América del Sur, América Central y el sur de América del Norte (Hayes et al. 2015) (Fig. 1 A). El género *Pomacea* es el más derivado y con mayor número de especies dentro de la familia Ampullariidae, así mismo tiene la distribución geográfica más amplia por lo cual es considerado el más exitoso desde el punto de vista evolutivo (Hayes et al. 2009a). Está dividido en 4 clados: clado flagellata, que incluye las especies *P. flagellata*, *P. sordida*, *P. patula* y *P. papyracea*, clado effusa con *P. glauca* y *P. guayanensis*, clado bridgesii, con las especies *P. bridgesii*, *P. diffusa*, *P. scalaris* y *P. haustum*, y clado canaliculata con *P. canaliculata*, *P. maculata*, *P. megastoma*, *P. lineata*, entre otras (Hayes

et al. 2009b) (Fig. 1 B). En cuanto a estos últimos dos clados, si bien las especies *P. diffusa*, *P. scalaris*, *P. canaliculata* y *P. maculata* son originarias de América (Fig. 1 C), han logrado establecerse fuera de su rango de distribución nativa (Hayes et al. 2008), muchas veces provocando importantes impactos económicos, ecológicos y sanitarios. Tal es el caso de *P. canaliculata* y *P. maculata* que han invadido el Sudeste de Asia, América del Norte, Hawaii



**Figura 1. Filogenia y distribución nativa de Pomacea.** **A.** Relación filogenética de los 8 géneros vivos de la familia obtenida a partir de datos moleculares. Los análisis filogenéticos reportados hasta la actualidad no incluyen al género *Forbesopomus*. **B.** Filogenia dentro del género *Pomacea*. **C.** Distribución nativa de las 4 especies en estudio. *P. diffusa*: cuenca amazónica (Brasil, Perú y Bolivia), *P. scalaris*: cuenca del Plata, desde Buenos Aires, Argentina hasta Santa Cruz de la Sierra en Bolivia y Cuiabá en Brasil, *P. canaliculata*: cuenca del Plata desde el sur de la provincia de Buenos Aires, Argentina, pasando por Uruguay y Paraguay, llegando a Bolivia y sur de Brasil, *P. maculata*: cuenca del Plata, al norte de la provincia de Buenos Aires, pasando por Paraguay, oeste de Brasil llegando a la cuenca amazónica al norte. (Tomado y modificado de Hayes 2012)

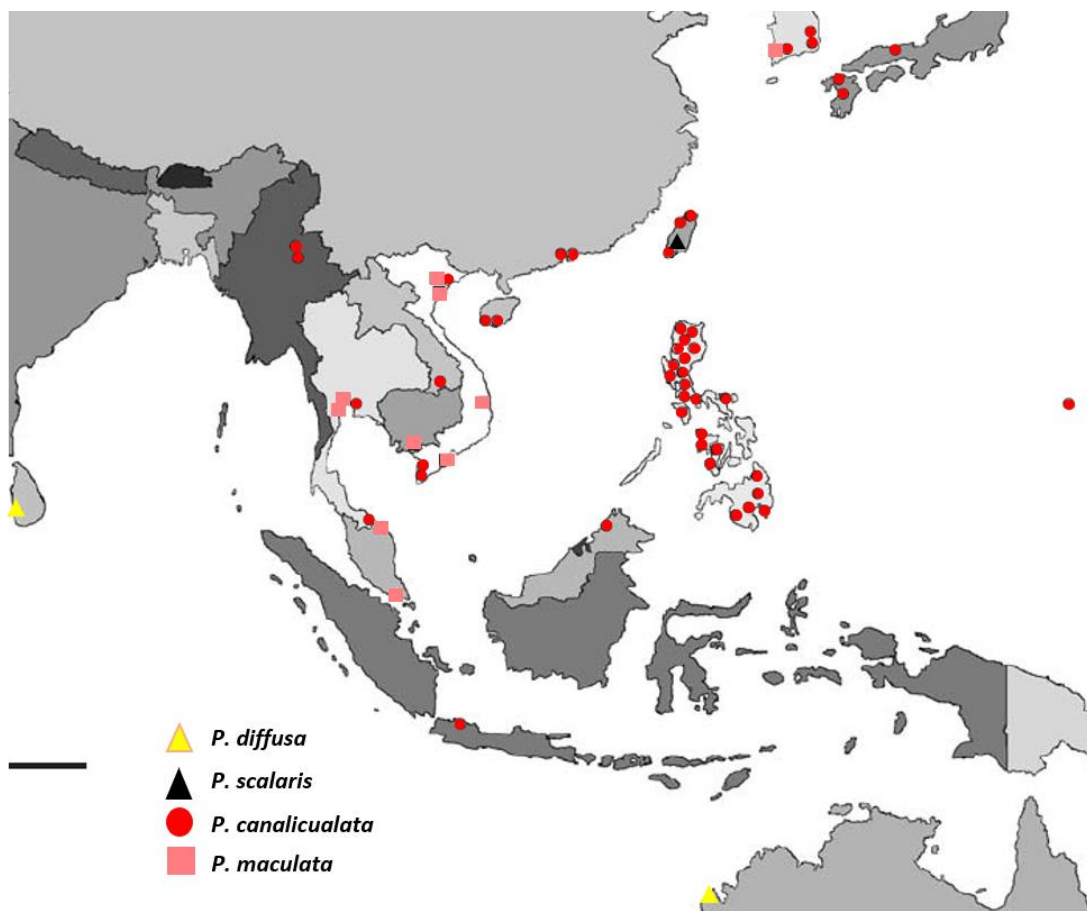
y, más recientemente, España (Cowie 2002; Cowie & Hayes 2012; Hayes et al. 2008; Joshi & Sebastian 2006; López et al. 2010; Rawlings et al. 2007), llevando a catalogar a *P. canaliculata* como una de las 100 peores plagas a nivel mundial (Lowe et al. 2000). La identificación de los ampuláridos ha sido difícil, especialmente en *Pomacea*, debido a sus



**Figura 2. Morfología de la concha de las cuatro especies en estudio. A.** neotipo de *P. canaliculata*. (barra= 1cm). **B.** *P. maculata* (barra=5cm). **C.** *P. diffusa* (barra= 1cm). **D.** *P. scalaris* (barra= 1cm) (Modificado de Hayes et al. 2012 y Cowie et al. 2006).

caracteres externos conservados y gran variabilidad intraespecífica (Cazzaniga 2002; Cowie et al. 2006; Thiengo et al. 1993) (Fig. 2), por lo que es probable que inicialmente se hayan informado erróneamente más de una especie bajo el nombre de *P. canaliculata* en Asia (Cowie 2002; Keawjam & Upatham 1990). Se cree que la primera introducción a ese continente fue desde Argentina en 1980 con propósitos comerciales, ya sea ornamental o como alimento, y posteriormente se distribuyeron en numerosos países del sur y este de Asia donde se convirtieron en plagas de arrozales y otros cultivos causando grandes pérdidas económicas (Cowie 2002; Cowie & Hayes 2012; Hayes et al. 2008; Joshi & Sebastian 2006). A partir de allí continuaron expandiéndose hacia otros territorios alterando los ecosistemas de agua dulce nativos, amenazando la integridad de los mismos y desplazando especies autóctonas (Carlsson et al. 2004; Cowie 2002; Halwart 1994). Debido a los hábitos alimentarios de estos caracoles, las macrófitas de estos ambientes se vieron drásticamente reducidas conllevando a la alteración de las comunidades locales y

el estado general de los ecosistemas (Carlsson & Lacoursiere 2005; Carlsson et al. 2004). Su dispersión en el sudeste asiático también trajo asociada la expansión de la meningoencefalitis eosinofílica humana o angiostrongiliasis, causada por el nematodo *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935), del cual son hospedadores intermediarios (Cowie 2002; Lv et al. 2009; Teem et al. 2013). Estudios moleculares mostraron que las especies de ampuláridos establecidas en Asia son cuatro (Hayes et al. 2008). De estas, *P. canaliculata* es la de mayor distribución seguida de *P. maculata*, la cual es parcialmente simpátrica con *P. canaliculata*. Por el contrario, *P. diffusa* fue hallada solamente en Australia y Sri Lanka, mientras que *P. scalaris* únicamente se encontró fuera de América en Taiwán (Fig. 3). En las áreas no nativas *P. canaliculata* se encuentra en condiciones subóptimas indicando que pueden sobrevivir en estos hábitats por algún periodo de tiempo (Kwong et al. 2008). La capacidad de estas especies de adaptarse a nuevos entornos en las áreas invadidas está relacionada a la flexibilidad trófica, amplia tolerancia



**Figura 3. Dispersión de *Pomacea* a través de Asia.** Distribución no nativa de las cuatro especies en estudio. Se observa la amplia distribución del clado canaliculata representada por los círculos rojos y cuadrados rosas. (Tomado y modificado de Hayes, 2008)

fisiológica y la plasticidad de algunos otros rasgos de su historia de vida (Cazzaniga 2002, Estebenet & Martin 2002, Hayes et al. 2015, Mu et al. 2015). Por ejemplo, la baja disponibilidad de alimento no afecta completamente a las tasas de mortalidad de estos caracoles, así como tampoco afecta el número ni tamaño de las puestas (Tamburi & Martin 2009, 2011). La fecundidad también es un factor determinante en las especies invasoras. En este sentido *P. canaliculata* exhibe una alta fecundidad siendo capaz de depositar en la época reproductiva 2 a 3 puestas por semana que contienen entre 100-300 huevos y de 1300 a 11000 huevos durante su ciclo de vida (Martin & Estebenet 2002, Winik & Castro-Vazquez 2015). El esfuerzo reproductivo también es mayor que el de otros gasterópodos con ciclos de vida similares (Estebenet & Cazzaniga 1993). La elevada capacidad reproductiva, corto desarrollo, amplio espectro trófico, rápido crecimiento, y las defensas químicas de sus huevos de *P. canaliculata* hacen que destaque como potencial organismo modelo, ya que además se cuenta con información sobre su morfología, fisiología, ecología, comportamiento, reproducción, desarrollo, alimentación y más recientemente su genoma y proteoma (Hayes et al. 2015; Sun et al. 2019). Profundizar el estudio de este género permitiría, por ejemplo, el reconocimiento de potenciales de invasión diferenciales entre especies emparentadas, encontrar características especie-específicas que ayuden a la identificación de las diferentes especies, complementando los análisis genéticos, entre otros. Así mismo, dados los serios problemas sanitarios y económicos que provocan, como fuera antes mencionado, es urgente su estudio para el desarrollo de estrategias de control que podrían aplicarse potencialmente a otras especies invasoras (Hayes et al. 2008). Por último, los ampuláridos son a su vez excelentes modelos para estudiar procesos evolutivos debido a su larga historia evolutiva, distribución global y su diversidad ecológica y morfológica (Hayes et al. 2009a) y por ser la única familia del phylum Mollusca con 27 transcriptomas de 5 géneros y 8 especies, y los genomas completos de 3 géneros y 4 especies (Ip et al. 2018a; Sun et al. 2019).

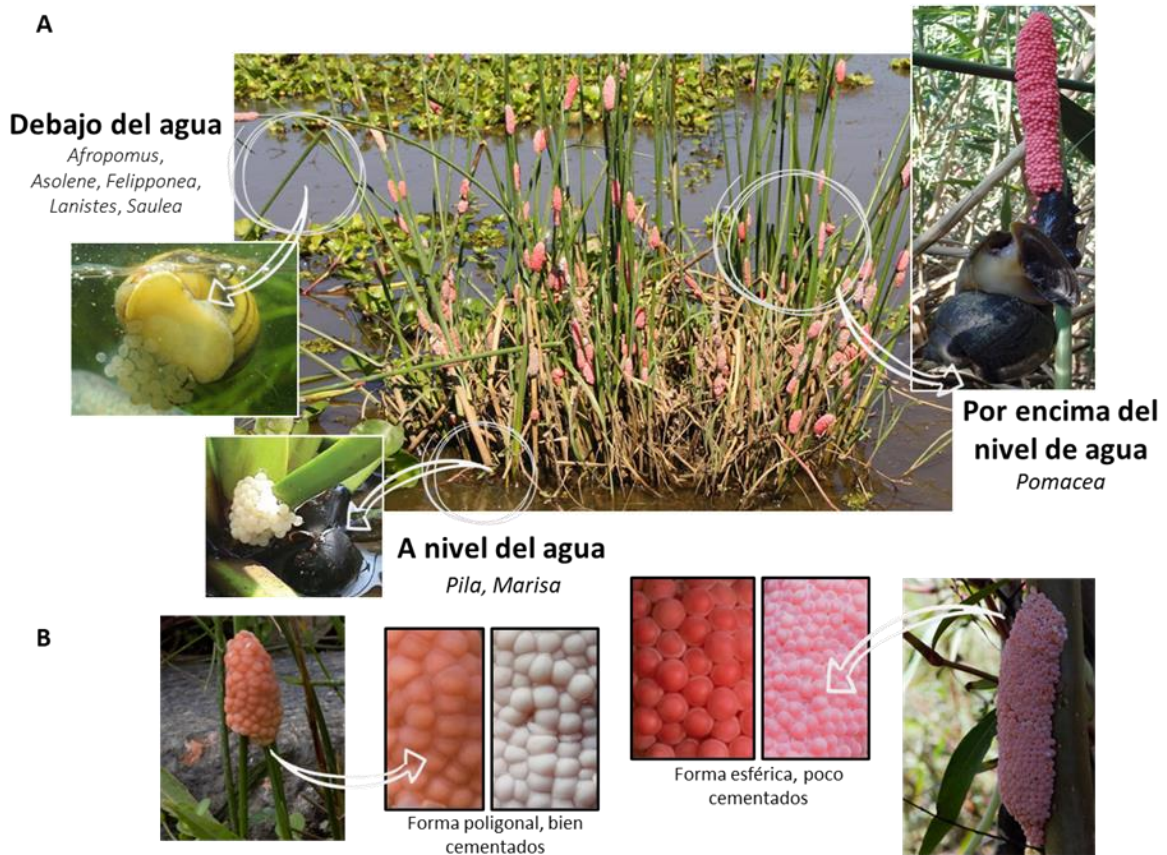
## 1.2 Biología reproductiva

El período reproductivo del género *Pomacea* está íntimamente relacionado con el ambiente donde habitan. En regiones templadas, durante el invierno, pueden permanecer varios meses inactivos (Seuffert et al. 2010) presentando 3 o 4 períodos reproductivos

(Estebenet & Cazzaniga 1993; Martin & Estebenet 2002). En las regiones tropicales con temperaturas constantes y elevadas a lo largo de todo el año, suelen reproducirse continuamente y, en estos casos, la reproducción está condicionada principalmente a la disponibilidad de agua (Hayes et al. 2015). El apareamiento involucra el cortejo del macho seguido de una cópula de duración variable que sucede debajo del agua. Las hembras pueden copular con varios machos y reservar el esperma a lo largo de varios periodos reproductivos (Albrecht et al. 1996; Burela & Martín 2011; Estebenet & Cazzaniga 1993). Los caracoles manzana son dioicos, sus oocitos se fecundan internamente, pero se desarrollan externamente dentro de huevos que se depositan en el medio circundante (Hayes et al. 2015). Una vez finalizado el desarrollo embrionario, los juveniles rompen la cáscara del huevo adelgazada y caen directamente al agua (D'Orbigny 1846; Hylton Scott 1957) ya que, a diferencia de los adultos, no pueden sobrevivir fuera de esta por un periodo prolongado de tiempo (Pizani et al. 2005). Existen dos estrategias de desove dentro de la familia Ampullariidae: *Afropomus*, *Asolene*, *Felipponea*, *Lanistes* y *Saulea* depositan masas gelatinosas debajo del agua sobre la vegetación sumergida (Fig. 4 A). Por otro lado, las especies de *Pomacea*, *Pila* y *Marisa* depositan sus huevos en masas calcáreas fuera del agua, una estrategia inusual entre los gasterópodos acuáticos (Hayes et al. 2015; Heras et al. 2007). *Pila* y *Marisa* depositan sus masas de huevos en la vegetación casi a nivel del agua o directamente sobre la tierra, mientras que *Pomacea* lo hace sobre sustratos emergentes que se encuentren bien por encima del nivel de agua (Burks et al. 2010; Cowie 2002; Hayes et al. 2009a) (Fig. 4 A). La oviposición ocurre generalmente de noche o entrada la madrugada durando varias horas (Hayes et al. 2015). Los clados más derivados de *Pomacea* muestran huevos con formas esféricas que se cementan pobremente entre ellos mientras que los clados más basales presentan formas poligonales cementadas fuertemente dentro de la masa de huevo (Hayes et al. 2009a) (Fig. 4 B). La oviposición aérea pudo haber surgido como una forma de evitar la depredación acuática y/o canibalismo, aunque esta estrategia también implicó hacer frente a los nuevos estresores ambientales a los que se ven expuestos los huevos. Estas particularidades en la reproducción de los caracoles del género *Pomacea*, junto con el hecho de que se trata del género evolutivamente más exitoso, llevó a considerar a la estrategia de oviposición aérea como



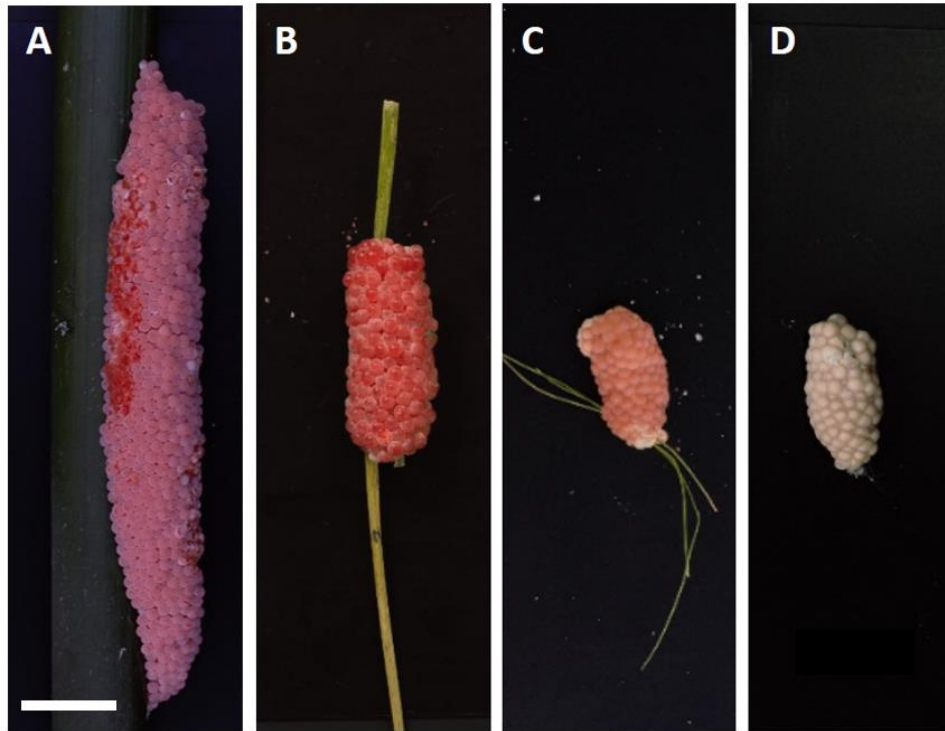
una adquisición clave en la diversificación y la dispersión de este grupo (Hayes et al. 2009a; Sun et al. 2019).



**Figura 4. Estrategias de oviposición en ampuláridos. A.** Los géneros más basales depositan sus masas de huevos por debajo del agua en masas gelatinosas. Los géneros más derivados oviponen a nivel del agua en masas gelatinosas o calcáreas, o por encima de ella en masas con cubierta calcárea. **B.** Formas de los huevos de distintos clados de *Pomacea*.

En contraste con los huevos blanquecinos o translúcidos de la mayoría de los ampuláridos, los huevos del género *Pomacea* muestran coloraciones llamativas (Heras et al. 2007). El clado *canaliculata* se caracteriza por puestas con colores que van desde el anaranjado como sucede en *P. megastoma*, rosa-anaranjado en *P. maculata*, hasta el rojo-rosado en las puestas de *P. canaliculata* (Fig. 5 A, B y C) que, en el caso de *P. canaliculata* se ha sugerido podría ser de advertencia para los depredadores (aposemática, ver más abajo). A su vez, las masas de huevos de este clado son de gran tamaño y comprenden un elevado número de huevos. En *P. canaliculata* ronda entre los 30-300 huevos (Albrecht et al. 1996; Cadierno et al. 2018) y en *P. maculata* alcanza 100-4500 huevos (Barnes et al. 2008) y un elevado éxito en la eclosión (>70.8%) (Barnes et al. 2008) poniendo en evidencia el

potencial invasor del clado canaliculata. Por el contrario, el clado hermano no invasor *bridgesii* muestra puestas de una coloración menos brillante como por ejemplo el naranja rosado en *P. scalaris* o el rosa pálido en *P. diffusa* (Fig. 5 D).



**Figura 5. Masas de huevos de las especies de *Pomacea* investigadas en esta tesis. A** Puesta correspondiente a *P. maculata* muestreada en la localidad de San Pedro, Buenos Aires, Argentina. **B** Puesta de *P. canaliculata*. muestreada en la localidad de Gonnet, Buenos Aires, Argentina. **C**. Puesta de *P. scalaris* de la localidad de Palermo, Buenos Aires, Argentina. **D**. Puesta de *P. diffusa* obtenida a partir de una colonia en nuestro laboratorio. Barra= 2.5cm

Muchas especies se comunican con los depredadores mediante características externas, por ejemplo, a través de una coloración llamativa (Cuthill et al. 2017; Ruxton et al. 2004) pudiendo ser, en el caso de los huevos de *Pomacea*, una señal para los depredadores que advierte de la presencia de compuestos tóxicos, es decir, podrían considerarse aposemáticos (Poulton 1890). Por lo anteriormente expuesto en esta sección se desprende que el conocimiento de la biología reproductiva de los ampuláridos es clave para comprender los patrones de distribución e invasividad de sus diferentes especies, así como la evolución de los hábitos anfibios y su ecología.

### 1.3 Defensas bioquímicas de los huevos del género *Pomacea*

Los ampuláridos, al igual que los de la mayoría de los gasterópodos, tienen huevos con relativamente poco vitelo y cuentan con envolturas extracelulares con componentes

nutritivos. Una glándula anexa del sistema reproductor femenino llamada glándula uterina (GA) sintetiza un fluido perivitelino (FPV) que rodea a los oocitos fecundados y contiene principalmente glúcidos y proteínas con función nutricia. El embrión utiliza como fuente de hidratos de carbono el polisacárido galactógeno, a diferencia de los adultos que utilizan glucógeno como principal polímero de reserva. Sus proteínas, llamadas perivitelinas, le siguen en importancia cuantitativa (Garin et al. 1996; Giglio et al. 2016; Heras et al. 1998) junto con el calcio (Catalán et al. 2002; De Jong-Brink et al. 1983). Externamente, el huevo está rodeado por una cubierta protectora de mucopolisacáridos, también depositada por la GA. En *Pila* y *Pomacea*, esta cápsula se calcifica constituyendo una cáscara calcárea a través de la que sólo intercambian gases con el ambiente, es decir son huevos cleidoicos (Catalán et al. 2002; Pizani et al. 2005).

La estrategia poco frecuente de oviponer fuera del agua expone a los huevos a condiciones ambientales desfavorables como la desecación, radiación solar intensa, altas temperaturas y depredación terrestre, lo cual ha determinado una serie de adaptaciones ecofisiológicas (Heras et al. 2008; Przeslawski 2004). La cubierta calcárea no es la única, las perivitelinas, además de su rol nutricional, participan en la protección y defensa del huevo y han sido el foco de múltiples estudios (Dreon et al. 2004b, 2007; Giglio et al. 2020; Heras et al. 2007, 2008; Ituarte et al. 2008; Pasquevich et al. 2014). Se destaca entre ellas la perivitelina-1 (PV1), una proteína con un cofactor carotenoide (carotenoproteína) masivamente acumulada en el huevo, oligomérica, hiper estable, presente en todas las especies de *Pomacea* estudiadas hasta el momento (Dreon et al. 2003; Ituarte et al. 2008; Pasquevich et al. 2014). Las PV1s tienen doble función: por un lado, participan en la defensa bioquímica de los huevos frente a factores abióticos, otorgándole a los embriones fotoprotección contra la radiación solar directa y antioxidantes de membrana durante su desarrollo (Dreon et al. 2004a, 2007). Por otro lado, proveen a los huevos de coloración de advertencia y protección contra factores bióticos. Estas perivitelinas son consideradas no digeribles (antinutritivas) ya que resisten la proteólisis por enzimas digestivas disminuyendo, por ende, el valor nutricional de los huevos (Dreon et al. 2010, 2014; Pasquevich et al. 2017). Aunque las PV1s comparten características estructurales y funcionales, la PV1 de *P. scalaris* (PsSC) presenta además actividad lectina (Ituarte et al. 2012) ausente en las PV1s del clado canaliculata. Las lectinas son proteínas ampliamente distribuidas en la naturaleza que

reconocen de manera específica hidratos de carbono con relativamente alta afinidad y presentan una enorme variedad de funciones. En huevos de animales, las lectinas generalmente se asocian con el sistema de defensa inmune, aglutinando bacterias u otros patógenos, y en plantas se almacenan en semillas y otras estructuras participando de la defensa contra la herbivoría (Peumans & Van Damme 1995).

Otra diferencia encontrada en el FPV de *P. scalaris* es la ausencia de la perivitelina 2 (PV2) que, por el contrario, es la segunda proteína mayoritaria de los huevos del FPV de las especies del clado canaliculata. Esta proteína es una toxina letal para ratones cuando se la inyecta intraperitonealmente y que afecta su tracto gastrointestinal cuando se la administra por vía oral (Dreon et al. 2013; Giglio et al. 2020; Heras et al. 2008). La PV2 es la primera toxina proteica reportada en huevos, con una estructura única en la naturaleza que combina una subunidad lectina de *delivery* y una subunidad formadora de poros (Dreon et al. 2013; Frassa et al. 2010; Giglio et al. 2020; Heras et al. 2008). Además, el FPV de las especies del clado canaliculata contiene en menor concentración otros componentes defensivos como inhibidores de proteasas de las familias Kunitz y Kazal, así como quitinasas, glicanasas y otras lectinas tal como se desprende de estudios bioquímicos y del análisis del proteoma del FPV de estas especies (Ituarte et al. 2019; Mu et al. 2017; Sun et al. 2012). En su conjunto, estos componentes impiden a los potenciales consumidores de los huevos la completa degradación de los nutrientes.

Este variado conjunto de defensas bioquímicas de los huevos del género *Pomacea* no ha sido encontrado en huevos de otros animales y podría explicar la ausencia de depredadores reportados para sus puestas. Solamente se le conoce un depredador, bien documentado, la hormiga de fuego *Solenopsis geminata* (Fabricius, 1804) que, si bien también es originaria de América del Sur, su comportamiento de depredación sobre huevos se reportó únicamente en el sudeste asiático donde las dos especies son invasoras (Yusa 2001) (Fig. 6 A). El resto de los trabajos donde se reportan ingestas de los huevos de *Pomacea* por otros animales constan de observaciones de campo que carecen de una comprobación formal (Hayes et al. 2015). Por otra parte, a diferencia de los huevos, los adultos de *Pomacea* exhiben una amplia variedad de depredadores entre los que se encuentran el gavián caracolero *Rostrhamus sociabilis* (Viellot, 1817), el carrao *Aramus guarauna* (Linneo, 1766) y la rata noruega *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) (Snyder

& Kale 1983; Sykes 1987; Yusa et al. 2000) (Fig. 6 B). Cabe mencionar que, a pesar de representar una parte significativa del valor energético total del caracol, estos depredadores descartan sistemáticamente la glándula uterina de *P. canaliculata* al alimentarse de caracoles hembra adultas (Cadierno et al. 2017a) (Fig. 6 C). Dicho órgano se encarga de sintetizar y almacenar los componentes del huevo (Catalán et al. 2006; Dreon et al. 2002, 2003), presentando la misma coloración que las puestas por la presencia de PV1, apoyando así la idea de que la presencia de defensas bioquímicas advertidas podrían explicar el comportamiento en los depredadores (Cadierno et al. 2018).



**Figura 6. Depredadores de *P. canaliculata*.** **A.** Hormiga de fuego (izquierda) único depredador formalmente reportado de los huevos. **B.** Algunos depredadores de adultos de *P. canaliculata*. **C.** Comportamiento de descarte de la glándula del albumen de caracoles hembra por parte de los depredadores. En las fotos, la GA se observa con su característica coloración rojiza (flechas).

## 2 Hipótesis y objetivos

## 2.1 Hipótesis

H1: La lectina PsSC de *P. scalaris* actúa en el sistema de defensa del huevo tanto contra microorganismos como contra depredadores.

H2: La estrategia de protección frente a la depredación de huevos en el clado *bridgesii* es diferente a la del clado *canaliculata*, siendo las PV1 con actividad lectina y no las toxinas PV2 las principales moléculas efectoras.

H3: Las defensas bioquímicas presentes en los huevos del género *Pomacea* afectan también el sistema digestivo de depredadores no mamíferos.

## 2.2 Objetivo general

Profundizar en el conocimiento de la biología reproductiva de moluscos gasterópodos, en particular del género *Pomacea* y contribuir al entendimiento de los mecanismos de defensa de sus embriones frente a depredadores.

## 2.3 Objetivos particulares

– Para conocer si existen mecanismos de defensa diferentes en los huevos según la posición filogenética de la especie:

- a) Caracterizar en profundidad la estructura de PsSC y su rol en la protección de los huevos contra microorganismos y depredadores.
- b) Evaluar la presencia de toxina PV2 en el FPV de *P. diffusa* y de una proteína análoga a PsSC. Caracterizar su estructura y función.

- Para determinar si las defensas también protegen a los huevos de depredadores no mamífero:

- c) Analizar el efecto de la fracción soluble de huevo (ESF) de diferentes especies de *Pomacea* sobre el intestino de potenciales depredadores no mamíferos utilizando un representante de las aves (*Coturnix coturnix*) y uno de los anfibios (*Lithobates catesbeianus*).

## 3 Materiales y métodos generales



### 3.1 Animales de laboratorio

Todos los estudios desarrollados con animales fueron llevados a cabo de acuerdo a la Guía para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (2010) y aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación de la Facultad de Ciencias Médicas, UNLP.

### 3.2 Muestreo y establecimiento de las colonias en el laboratorio

El muestreo se llevó a cabo entre noviembre y marzo, durante la época reproductiva, donde se colectaron tanto adultos como puestas frescas de caracoles. En el caso de *P. canaliculata*, se muestreo en dos sitios diferentes: en cuerpos de agua poco profundos, algunos de ellos eran charcas temporales, en Villa Castells, Gonnet, Buenos Aires, Argentina (34°52'52"S 58°00'42"O) y a orillas del Río Paraná en San Pedro, Buenos Aires, Argentina (33°39'34"S, 59°41'52"O y 33°39'28"S, 59°39'28"O). El muestreo de *P. maculata* también se llevó a cabo en dos sitios: en el lago del Paseo del bosque, La Plata, Buenos Aires, Argentina (34°54'35"S 57°56'01"O) y en cuerpos de agua relativamente poco profundos en la localidad de San Pedro, a orillas del Río Paraná. Por último, *P. scalaris* se muestreo en el Lago Regatas del parque 3 de febrero, Palermo, Buenos Aires, Argentina (34°34'24"S 58°24'53"O). Las masas de huevos fueron transportadas en conservadoras refrigeradas hasta las instalaciones del INIBIOLP en donde se almacenaron a -80 °C para su posterior análisis. Los caracoles adultos colectados fueron transportados en tanques conteniendo agua del sitio de muestreo, hasta las instalaciones del bioterio del INIBIOLP, donde fueron utilizados para establecer una colonia de cada especie en el laboratorio. Los caracoles se criaron en acuarios de 50L y se los alimentó con lechuga (*Lactuca sativa* L. 1753) y alimento para peces en gránulos (Tetra-color) ad libitum, la sala de acuario se mantuvo a 25 °C ± 2 °C, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h:12 h. Las masas de huevos depositados en estas condiciones también se colectaron de manera manual ni bien fueron depositadas y se mantuvieron a -80 °C para posteriores experimentos.

### 3.3 Identificación genética de *P. diffusa*

Debido a que *P. diffusa* no se encuentra distribuida en Argentina, los adultos fueron adquiridos en un acuario en la ciudad de La Plata y su identidad se confirmó genéticamente

por secuenciación del gen de la subunidad I de la proteína citocromo c oxidasa como se detalla a continuación (Matsukura et al. 2013).

### 3.3.1 Extracción de ADN a partir de tejido

La obtención del material genético se hizo a partir de 15 mg de músculo del pie de los caracoles, utilizando un kit de extracción de ADN (Qiagen DNeasy Bood & Tissue), siguiendo las indicaciones del fabricante. El tejido se incubó con proteinasa K a 56 °C durante aproximadamente 3 h. Posteriormente se le agregó al lisado una serie de buffers conteniendo una sal caotrópica y etanol 96%. Para el filtrado, se utilizaron columnas de 2 mL provistas por el kit, que se centrifugaron a 6000 xg durante 1 min. Durante la centrifugación, el ADN se une selectivamente a la membrana del dispositivo de filtración de las columnas mientras los contaminantes la atraviesan. Finalmente, el ADN se eluye en agua, centrifugando en las mismas condiciones descritas previamente. Una vez realizada la extracción, se controló la integridad del ADN genómico mediante gel de agarosa 0.8% (ver sección 3.3.3) y la cantidad de ADN presente en la muestra se determinó espectrofotométricamente usando un equipo NanoDrop (Thermo Scientific).

### 3.3.2 Amplificación mediante PCR

Los fragmentos de ADN de interés se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para la reacción (volumen final de 20 µL) se emplearon 1 µL de cebadores LCO 1490 y HCO 2198 10 µM (Sigma-Aldrich), 10 ng de la muestra y 10 µL de PCR Master Mix (PROMEGA) conteniendo nucleótidos 10 mM, buffer y ADN polimerasa Taq 5 U/µL. Se suplementó la reacción con 0.1 µL de ADN polimerasa Taq recombinante de Invitrogen (Nro de catálogo 10342020). Los parámetros de corrida fueron los siguientes:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94 °C	2 min	1
94 °C	45 s	40
50 °C	45 s	
72 °C	2 min	
72 °C	6 min	1

### 3.3.3 Electroforesis en gel de agarosa e identificación genética

Esta técnica se basa en propiedades físicas de las partículas que permiten su migración diferencial a lo largo de una matriz porosa cuando se aplica un campo eléctrico. En este caso los ácidos nucleicos se separan por su diferencia de tamaño a lo largo de un gel de

agararosa. Se sembraron 10  $\mu$ L del producto de PCR en un gel de agarosa 0.8%. (p/v). La corrida se llevó a cabo a voltaje constante 100 mV, durante 40 min y se utilizó bromuro de etidio para la visualización. Las bandas del tamaño esperado (650 pb), observadas en el gel, se mandaron a secuenciar a Macrogen Latinamerica S.A mediante el método de Sanger (Sanger et al. 1977). Las secuencias de nucleótidos obtenidas se compararon con las depositadas en banco de datos (NCBI) mediante BLAST para la asignación específica.

### **3.4 Obtención de la fracción soluble de huevos (ESF)**

Para la obtención de la ESF, las puestas se lavaron y se homogeneizaron en buffer Tris-HCl 20 mM, pH 7.4, utilizando un homogeneizador tipo Potter (Dragon Lab, OS40-Pro) a 1.450 rpm, manteniendo una relación buffer:muestra 3:1 v/p. El homogenato fue centrifugado a 10.000 xg durante 30 min a 4 °C en una centrífuga Avanti-JE (Beckman), utilizando un rotor de ángulo fijo JA 25.50 (Beckman), para separar las cáscaras y restos insolubles. El sobrenadante fue luego centrifugado a 100.000 xg durante 50 min a 4 °C en una ultracentrífuga Beckman L8-70 (Beckman) utilizando un rotor de ángulo fijo 70.1 Ti (Beckman). El sobrenadante así obtenido contiene todos los componentes solubles del huevo. Para finalizar, esta fracción se equilibró con buffer fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 7.4), usando un dispositivo para filtrar partículas menores a 50kDa (Millipore Corporation, MA). Cuando fue necesario, la solución se almacenó a -70 °C hasta su posterior análisis.

### **3.5 Aislamiento y purificación de las PV1s**

Para el aislamiento y la purificación de las PV1s de *P. scalaris* y *P. diffusa*, la ESF fue sometida a ultracentrifugación en un gradiente de densidad de NaBr, seguida de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

#### ***3.5.1 Ultracentrifugación en gradiente de densidad***

Para la separación de los componentes de la ESF se realizó una ultra centrifugación en gradiente de densidad de NaBr de la siguiente manera: 1.5 mL de muestra se dispensaron sobre 3 mL de una solución de NaBr ( $\delta=1.28$  g/L). En uno de los tubos se colocó Tris-HCl 20 mM en lugar de la muestra para ser utilizado luego como blanco para el cálculo de las densidades y verificar la correcta formación del gradiente. La ultracentrifugación se realizó a 207.000 xg durante 20-22 h a 4 °C en una ultracentrífuga Beckman L8-70 (Beckman) con

un rotor de ángulo variable SW 60.Ti (Beckman). Esta técnica permite separar las proteínas según su densidad de hidratación. Luego de la centrifugación, se colectaron secuencialmente alícuotas de 200  $\mu$ L desde arriba hacia el fondo del tubo. Para estimar la densidad de hidratación de cada alícuota, se midió el índice de refracción de cada una (tanto para el tubo blanco como la muestra), a 26 °C con un refractómetro (Bausch and Lomb, New York) y los valores se convirtieron a densidades usando valores tabulados (Orr et al. 1991). Para identificar aquellas alícuotas con contenido proteico, se utilizó la espectroscopia de absorción que se basa en la propiedad que tienen las proteínas de absorber en la región UV. Las mediciones se realizaron con un espectrofotómetro Agilent 8453 UV/Visible (Agilent Technologies, Inc).

### ***3.5.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)***

Las fracciones que mostraron picos de absorbancia a 280 nm se separaron y purificaron por HPLC acoplado a un detector UV (Agilent Technologies, 1260 Infinity). Primeramente, se desalaron las muestras removiéndose el NaBr con buffer Tris-HCl 20 mM, pH 7.4, utilizando concentradores Amikon Ultra-4 con un tamaño de poro de 50 kDa (Merck Millipore Ltd.), centrifugando en centrifuga Beckman Avanti JE con rotor de ángulo variable JS-5.3 a 3000 xg durante 15 min a 10 °C. El procedimiento se repitió cinco veces y se reemplazó en cada una el volumen faltante del buffer. Una vez que las muestras se encontraban desaladas, sus proteínas se separaron por cromatografía de exclusión molecular (SEC). Este tipo de cromatografía consta de una matriz que delimita una serie de poros de diversos tamaños por los cuales deben atravesar las partículas. Las de mayor tamaño pasan entre los componentes de la matriz sin poder ingresar en los poros y, debido a esto, eluyen primero de la columna cromatográfica mientras que las pequeñas son retenidas en los poros y consecuentemente eluyen posteriormente en la corrida. Finalmente, las proteínas quedan separadas en función del volumen hidrodinámico o el volumen que ocupan en solución. La columna que se utilizó fue una Superdex 200 HR 10/300 GL (GE Healthcare Bio-Sciences AB), con buffer Tris-HCl 20 mM, pH 8.5 como fase móvil. Se inyectaron 500  $\mu$ L de la muestra eluída de la columna de intercambio aniónico y el flujo de trabajo fue de 0.5 mL/min, detectándose la proteína por absorbancia a 280 nm.

### 3.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)

La pureza de las proteínas fue analizada por electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente 4-20% (p/v), tanto en condiciones nativas (PAGE-Nativo) como disociantes (PAGE- SDS). Se utilizó el sistema de buffers discontinuos de Laemmli (1970) con las modificaciones de Margolis & Wrigley (1975). Las corridas electroforéticas se realizaron a 120 V, en una cuba electroforética Mini-Protean III (BioRad, Hercules).

#### 3.6.1 PAGE-Nativo

Esta técnica se basa en la separación de las proteínas según la relación entre su carga y su masa, mientras se mueven a través de un gel poroso por la aplicación de un campo eléctrico manteniendo la estructura tridimensional de la proteína. Para el desarrollo de la electroforesis se utilizó buffer Tris 0.3% (p/v), glicina 1.4% (p/v) pH 8.3, y se aplicó un voltaje constante de 100 V durante 4 h, donde las proteínas migran hasta su poro límite. En una de las calles se sembró una mezcla de proteínas estándares de alto peso molecular (Amersham Biosciences).

#### 3.6.2 PAGE-SDS

En este caso las proteínas migran únicamente en función de su tamaño ya que se utiliza un agente desnaturizante, en este caso el dodecilsulfato sódico (SDS), haciendo que se pierda la estructura terciaria de las proteínas y confiriéndoles carga neta negativa. Para los geles en condiciones disociantes, las muestras fueron desnaturizadas antes de la corrida calentándolas a 100 °C durante 10 min en presencia de SDS 0.1% (p/v) y, alternativamente, con el agregado del agente reductor  $\beta$ -mercaptoetanol para la ruptura de los enlaces puente disulfuro. La corrida se desarrolló con un buffer Tris 0.3% (p/v), glicina 1.4% (p/v), SDS 0.1% (p/v) pH 8.3, a un voltaje constante de 100 V durante aproximadamente 1 h, tiempo en el cual el frente de corrida llegó a la base del gel. Al igual que en el caso de los PAGE-Nativos, en una calle del gel se sembró una mezcla de proteínas estándares de bajo peso molecular (Amersham Biosciences).

#### 3.6.3 Detección de proteínas

Para poder ver las bandas proteicas, los geles se fijaron en una solución de isopropanol 25% (v/v), ácido acético glacial 10% (v/v) durante 30 min, para luego ser coloreados en una solución de Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma Chemical Co.) 6‰ (p/v) en ácido acético

10%(v/v), durante 2 h. Cuando fue necesario mejorar el contraste, se destiñó el fondo de los geles con reiterados lavados en ácido acético 10% (v/v) (Echan & Speicher 2002).

### **3.7 Estimación de la concentración de proteínas**

La concentración de proteínas en las distintas muestras se determinó mediante dos técnicas colorimétricas que se describen a continuación.

#### **3.7.1 Método de Lowry**

En el método de Lowry et al. (1951) se genera un complejo entre los enlaces peptídicos e iones  $\text{Cu}^{+2}$  en condiciones alcalinas, que reacciona con el reactivo de Folin-Ciocalteau comercial (Biopack, Argentina), produciéndose un cromógeno que absorbe a una longitud de onda de 750 nm. Para determinar la concentración de la muestra se utilizó una curva estándar, realizada con diluciones de concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich). Tanto en el caso de las muestras como en el caso de la curva estándar, las mediciones se hicieron por triplicado. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro Agilent 8453 UV/Visible (Agilent Technologies, Inc).

#### **3.7.2 Método de Bradford**

La técnica de Bradford (1976) se basa en el cambio en la absorbancia (de rojo/marrón a azul) del Coomassie brilliant blue G-250 en condiciones ácidas, en las cuales se une a la proteína ensayada. En presencia de proteína se forma un complejo no-covalente entre los grupos carboxilo de ésta y el colorante, dando un color azul proporcional a cantidad de proteína en solución. El ensayo se realizó en microplaca Greiner 96 flat de plástico con una curva estándar de concentraciones conocidas de BSA. Luego de agregar el reactivo de Bradford se incubó 5 min y se leyó a 595 nm en lector de placa. Tanto las muestras como la curva estándar se midieron por triplicado.

### **3.8 Anticuerpos policlonales**

Para la inmunodetección de las perivitelininas se utilizaron anticuerpos policlonales. Los anticuerpos anti PcPV2 (Dreon et al. 2002) y anti PcOvo (Dreon et al. 2003) fueron obtenidos previamente en el laboratorio. Los anticuerpos policlonales anti-PsSC se prepararon en ratones BALB/c mediante inyección intrapritoneal de 50  $\mu\text{g}$  de PsSC purificada emulsificada con adyuvante de Freund completo (Sigma Chemical Co, St. Louis,

USA). Transcurridos 19 días se les administró una nueva dosis de 50 µg de proteína en adyuvante de Freund incompleto (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) y dos semanas más tarde se extrajo la sangre por punción cardíaca. La sangre colectada fue mantenida a 37 °C por 1 h hasta su coagulación y luego se dejó toda la noche a 4 °C; para lograr la retracción del coágulo. Luego de una centrifugación a baja velocidad, el suero obtenido fue guardado a -70 °C hasta su uso.

### **3.9 Análisis estadístico**

Salvo que se indique lo contrario, los análisis estadísticos fueron llevados a cabo utilizando el programa GraphPad Prism v. 5.03, utilizando el test pertinente para cada experimento, detallado en cada uno de ellos.

## 4 Caracterización de la lectina PsSC de *Pomacea scalaris* y su rol en la defensa de los huevos



#### 4.1 Introducción

Como se mencionó en la introducción general, el FPV de las especies de *Pomacea* está compuesto, entre otras perivitelinas, por las carotenoproteínas PV1s. Entre ellas, se encuentra la PV1 de *P. canaliculata*, llamada PcOvo, que se acumula masivamente en el huevo y provee a los huevos de una señal de advertencia hacia depredadores terrestres, presumiblemente aposemática. Esta carotenoproteína además es antinutritiva, disminuyendo el valor nutricional de los huevos y reduciendo la tasa de crecimiento de ratas al ser ingerida (Dreon et al. 2010, 2014). Se hicieron hallazgos similares en puestas de *P. maculata*, otro integrante del clado canaliculata, que presenta una PV1 denominada PmPV1, con las mismas características estructurales y funcionales que PcOvo (Pasquevich et al. 2014; 2017). Por otra parte, *P. scalaris*, una especie perteneciente al clado bridgesii, filogenéticamente cercana y simpátrica con *P. canaliculata* y *P. maculata*, también presenta en su FPV una PV1 análoga a PcOvo y PmPV1, llamada PsSC. Esta última, muestra características estructurales y funcionales similares a las PV1 del clado canaliculata pero tiene, además, una fuerte actividad lectina (Ituarte et al. 2012), ausente en las otras dos especies.

Se han identificado muchas lectinas en moluscos, mayormente en huevos y órganos involucrados en la síntesis de sus componentes. Entre los gasterópodos, probablemente la lectina de huevo mejor conocida es la aglutinina de *Helix pomatia* (Sanchez et al. 2006). En ampuláridos, se ha reportado actividad lectina en extractos de huevos de *Pila ovata* (Uhlenbruck et al. 1973) y *Pomacea urceus* (Baldo & Uhlenbruck 1974), y se ha asumido que forman parte del sistema inmune innato (Prokop et al. 1968). En líneas generales, se sabe que las lectinas juegan un papel importante en el sistema de la inmunidad innata de invertebrados reconociendo patrones moleculares asociados a patógenos (MAMPs) por lo cual generalmente se les asigna un rol protector contra la invasión de microbios (Vasta et al. 2007), sin embargo esta asunción no ha sido testada para los huevos de muchos animales. Tal es el caso de PsSC, que si bien es una de las pocas lectinas de ampuláridos aislada y parcialmente caracterizada, aún se desconoce su participación en el sistema inmune innato de estos caracoles.

Por otro lado, está bien documentada la toxicidad de las lectinas vegetales sobre animales como una estrategia contra la depredación (Peumans & Van Damme 1995), adquiriendo

un rol fisiológico relacionado con la defensa no solo contra microorganismos (inmune), sino además contra animales herbívoros (Vasconcelos & Oliveira 2004). Este sistema de defensa suele estar reforzado por la presencia de inhibidores de proteasas digestivas (Duffey & Stout 1996; Van Damme 2008) que, conjuntamente, afectan el tracto digestivo de los consumidores, alterando su función digestiva y la capacidad de absorber nutrientes. Estas proteínas defensivas se acumulan en semillas y órganos de almacenamiento, en donde se necesita mayor protección ya que son especialmente susceptibles a ataques por carecer de defensas activas y contener grandes cantidades de nutrientes (Peumans & Van Damme 1995; Van Damme 2008), de la misma manera que sucede en las puestas de *Pomacea*. De hecho, PsSC se acumula masivamente en el huevo, representando más del 64% del total de la fracción proteica, actuando como proteína de reserva (Ituarte et al. 2012). Mas aún, esta proteína es altamente estable en un amplio rango de valores de pH, incluyendo aquellos hallados en el tracto digestivo de potenciales depredadores (Ituarte et al. 2008; Sun et al. 2012; Zhu-Salzman et al. 2008). A su vez, PsSC es resistente a la digestión gastrointestinal simulada, por lo que es capaz de alcanzar el sistema digestivo en una conformación biológicamente activa (Dreon et al. 2010, 2013). Aunque está bien documentado en plantas, la acumulación de lectinas antinutritivas en una estructura tan vulnerable, formando parte de un sistema de defensa anti-depredador, no había sido descrito hasta el momento en animales. Si bien aún se desconocen los efectos que produce PsSC junto a otros componentes del FPV al ser ingeridos por potenciales consumidores, por lo antes expuesto, podemos hipotetizar que esta lectina podría estar involucrada en un sistema de defensa contra la depredación del huevo mediante un mecanismo similar al estudiado en plantas.

En este capítulo avanzamos en el conocimiento de la estructura y rol que juega PsSC en la defensa de los huevos de *P. scalaris*. Para ello, en primer lugar determinamos su estructura primaria y caracterizamos su especificidad por diferentes glicanos. Evaluamos luego su actividad antimicrobiana y exploramos el efecto de la administración oral de una dieta conteniendo PsSC sobre el tracto digestivo de roedores. Se investigó, además, la interacción específica de PsSC con la superficie del epitelio digestivo y su efecto citotóxico en líneas celulares de enterocitos.

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 *Secuencia de aminoácidos de PsSC*

Para la obtención de las secuencias aminoacídicas completas de PsSC, primero se obtuvieron péptidos por digestión trípica de la proteína purificada como se indicó en la sección 3.5 que fueron luego analizados por espectrometría de masas. Las secuencias parciales obtenidas junto con las secuencias N-terminales previamente determinadas (Ituarte et al. 2012), se usaron para recuperar las secuencias completas de cDNA en el transcriptoma de la glándula del albumen de *P. scalaris* en la base de datos *on line* AmpuBase (<https://www.comp.hkbu.edu.hk/~db/AmpuBase/#&panel1-2>) (Ip et al. 2018). Se predijo la presencia y el sitio de clivaje de los péptidos señal de las secuencias aminoacídicas traducidas usando el servidor SignalP 4.1 (Petersen et al. 2011). Se estimó la masa molecular teórica y el punto isoeléctrico de la secuencia correspondiente a cada subunidad madura usando el servidor ProtParam tool-Expasy (Gasteiger et al. 2005). Finalmente, los potenciales sitios de fosforilación y glicosilación se predijeron usando los servidores DISPHOS 1.3 y NetNGlyc 1.0, respectivamente (Diella et al. 2004; Iakoucheva et al. 2004). Las subunidades putativas de PsSC se determinaron usando BLAST (NationalLibrary of Medicine). Las secuencias se alinearon usando MUSCLE (Edgard 2004).

### 4.2.2 *Marcación Fluorescente*

Se marcó fluorescentemente PsSC usando el kit Alexa fluor 488 (Invitrogen, Life Technologies-Molecular Probes). Este compuesto reacciona con los grupos amino primarios no protonado de la proteína formando un conjugado que fluoresce color verde pudiendo ser visualizado por microscopía de fluorescencia (ver sección 5.2.5.). Presenta un máximo de absorción y emisión de 495 nm y 519 nm, respectivamente. Para realizar los ensayos se siguieron las instrucciones del fabricante, brevemente: Se mantuvo la concentración de proteína aproximadamente en 10 mg/mL. El marcador se disolvió en DMSO (dimetil sulfoxido) inmediatamente antes de la reacción con la proteína. A la proteína en agitación, se le agregó 1 mg de marcador y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Luego de la marcación, se separó la proteína marcada de aquella que no reaccionó con el marcador por SEC. Para ello se utilizó una columna de 10 × 300 mm conteniendo BioGel P-30 (Bio Rad) equilibrada con buffer fosfato salino (PBS: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

1.5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.1 mM, NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, pH 7.4). En estas condiciones el conjugado fue el primero en eluir, seguido por el fluoróforo no unido libre. La concentración de proteína y eficiencia de marcado se determinó espectrofotométricamente como se detalla abajo.

$$M = (A_{280nm} - A_{495nm} \cdot 0.11) * \text{factor de dilución } 203000$$

Donde M es la concentración de proteína corregida, A<sub>280nm</sub> es la absorbancia del conjugado de la proteína con el marcador y A<sub>495nm</sub> es el máximo de absorción del marcador

$$EM = \frac{A_{495nm} * MW}{M * 71000}$$

Donde EM es la eficiencia de marcado y MW es el peso molecular de la proteína

#### 4.2.3 Cultivo celular

Para estos ensayos se emplearon dos tipos de enterocitos: células de la cripta del intestino delgado de ratas (IEC-6) y células de adenocarcinoma colorectal humano (Caco-2), ambas obtenidas de la Colección de Cultivos tipo de América o ATCC (Cedarlane Inc., Burlington, ON). Las células Caco-2 crecen en adherencia y, cuando llegan a confluencia, se diferencian en una monocapa de células cilíndricas que expresan varias de las características morfológicas y bioquímicas de los enterocitos, volviéndolas un buen modelo para estudios toxicológicos y fisiológicos *in vitro* del intestino (Pinto et al. 1983; Sambuy et al. 2005).

Se cultivaron en botellas de 25 cm<sup>2</sup> o en placas de Petri de plástico de 35 mm de diámetro en Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (4.5 g/L Dglucosa) suplementado con 10% (v/v) suero fetal bovino (SFB), penicilina (10 U/mL) y estreptomina (10 µg/mL), aminoácidos y vitaminas (Life Technologies- Invitrogen). Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad relativa. El medio de cultivo se reemplazó cada dos días y se subcultivó por tripsinización cuando las células llegaban al 95% de confluencia. Para la tripsinización, las células fueron lavadas dos veces con PBS por 1 min a temperatura ambiente y tripsinizadas usando una solución de Tripsina 0.25 % (p/v), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.9 mM, D-glucosa 5.55 mM, rojo de fenol 1‰ (p/v) en PBS (Gibco-BRL Life Technologies).

El conteo de células viables se realizó por exclusión de azul de tripán (Mishell et al. 1980), incubando las células en una solución de azul de tripán 0.4 % (p/v) en PBS por 30 s. Las células viables son impermeables al colorante, mientras que las células muertas quedan coloreadas de azul. La contabilización de las células viables se realizó utilizando una cámara de Neubauer en microscopio de campo claro.

#### **4.2.3.1 Ensayos de unión a la superficie celular**

Para los experimentos se utilizaron los pasajes 60 al 65 y 16 al 20, para Caco-2 y IEC-6 respectivamente. Para testear la unión de PsSC a la superficie de estas células, se sembraron en placas de 24 pocillos (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgium) a densidades que aseguraban alcanzar aproximadamente el 80% de confluencia en los controles al finalizar el segundo día experimental. Se reemplazó el medio de cultivo diariamente y luego de 48 h las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con PsSC junto con PsSC marcada con Alexa-488 en PBS (400 µg/mL) durante 1 h a 37 °C. Las células se observaron en un microscopio de fluorescencia invertido (Olympus IX-71). Los pocillos correspondientes al control negativo se incubaron con BSA marcada con Alexa-488 en PBS. Todas las preparaciones proteicas usadas en cultivos celulares fueron esterilizadas por filtración (0.22 µm).

#### **4.2.3.2 Citotoxicidad**

Se evaluó la citotoxicidad de PsSC en células Caco-2 e IEC-6 mediante ensayos de proliferación celular usando 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Denizot F 1986). Este ensayo se basa en la reducción metabólica del MTT, un compuesto amarillento soluble en agua, por parte de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa para dar formazán, un compuesto insoluble de color azul. Este ensayo permite detectar la funcionalidad mitocondrial de las células y, a partir de ello, estimar la supervivencia y proliferación celular.

Para ello, las células se sembraron en 200 µL de medio de cultivo en placas de 48 pocillos a densidades que aseguraran el 90% de confluencia después de 24 h. Una vez los cultivos celulares hubieran alcanzado la confluencia deseada, se les agregó 50 µL/pocillo de una dilución seriada en base 2 de PsSC (3.4 mg/mL) en PBS e incubadas durante 24 h a 37 °C. Los pocillos control se prepararon con 50 µL/pocillo de PBS. Después del tratamiento, se removió el medio de cultivo y las células se incubaron con DMEM fresco conteniendo 0.5

g/L de MTT a 37 °C durante 1 h. Las placas se centrifugaron a 500 xg durante 10 min utilizando una centrífuga Avanti J-E utilizando un rotor de ángulo variable JA25-50 (Beckman Coulter, Inc.). Luego se descartó el sobrenadante y las células se lavaron 3 veces con PBS. Finalmente, se agregaron 200 µL/well de DMSO para solubilizar los cristales de formazán y se registró la absorbancia de cada well a 540 nm, con sustracción de fondo a los 640 nm, en un lector de microplaca DTX-880 Multimode Detector (Beckman Coulter). La viabilidad celular se expresó como un porcentaje del control:

$$\%Viabilidad = \frac{DO \text{ células tratadas}}{DO \text{ células control}} * 100$$

#### **4.2.4 Análisis de la especificidad de unión de PsSC empleando un microarreglo de glicanos (Glycan array screening)**

La especificidad de unión de PsSC a diferentes glicanos se determinó en el Core H del Consorcio de glicómica funcional (<http://www.functionalglycomics.org>, Emory University, Atlanta, GA, USA). Para poder detectar la unión, se marcó PsSC con Alexa fluor 488 (ver sección 4.2.2.). La proteína marcada fluorescentemente se ensayó sobre un arreglo de 610 glicanos de mamíferos (*glycan array*, versión 5.1), tanto naturales como sintéticos, adheridos a un portaobjetos de vidrio con N-hidroxisuccinimida (NHS)-activada. Los datos se analizaron como describe Smith et al. 2010. Para eliminar falsos positivos, de los valores obtenidos para cada glicano se removieron el punto más alto y el más bajo de un total de 6 ensayos, y los cuatro valores restantes se emplearon en el análisis.

#### **4.2.5 Actividad antimicrobiana y aglutinación de microorganismos**

Se evaluó la actividad antimicrobiana de PsSC en cultivos sólidos y líquidos de *Escherichia coli* (BL-21) y *Staphylococcus pseudointermedius*. En cada placa, se esparcieron 50 µL del cultivo sobre agar/LB (o caldo de lisogenia, un medio nutricionalmente rico que promueve el crecimiento de las bacterias) por triplicado, 20 min después se agregaron gotas de 10 µL conteniendo 20, 10 y 2 µg de PsSC. Se utilizó PBS en condiciones estériles como control negativo. Las placas se incubaron por 18 h a 37 °C y se observó la formación de halos de inhibición.

Para los ensayos en medio líquido, se diluyeron 500  $\mu$ L del cultivo en LB por triplicado y se le agregó PsSC hasta alcanzar una concentración final de 0.2 g/L, usando PBS estéril como control. El crecimiento se siguió determinando la densidad óptica a 600 nm.

También se evaluó la actividad aglutinante de microorganismos de PsSC. En estos ensayos se incubó durante toda la noche, a temperatura ambiente, 40  $\mu$ L de *E. coli* en PBS ( $OD_{600} = 1.2$ ) en placas de 96 pocillos con 10  $\mu$ L de diluciones seriadas de PsSC.

La actividad Lectina se confirmó por competición con 20 mM GalNAc y 20 mM GlcNH<sub>2</sub> (concentración final), estos monosacáridos se preincubaron con PsSC previamente a la incorporación al pocillo. Después de la incubación, las placas se inclinaron por 30 min y se las observó al microscopio óptico para confirmar la aglutinación.

#### 4.2.6 Efecto de la ESF sobre el epitelio intestinal de rata

Se evaluó el efecto de la administración oral de PsSC sobre el epitelio del intestino delgado de ratas Wistar macho (línea WKAH/Hok, Hokkaido University, Japan), siguiendo el protocolo empleado para PcOvo (Dreon et al. 2010). Nueve animales jóvenes (de 5 a 7 semanas de edad) cuyo peso rondaba los 150 g fueron asignados al azar a los grupos control, tratado 48 h o tratado 72 h (N=3 por grupo). Los animales se mantuvieron en una sala acondicionada con un ciclo de 12:12 h de luz:oscuridad, a  $22 \pm 1$  °C y 45-60% de humedad relativa. Los animales tratados fueron sondeados diariamente durante 48 y 72 h usando una aguja especial para alimentación forzada N°22 (Popper and Sons, Inc), con 1 mL de la ESF de *P. scolaris* que contenía 8 mg de proteína total (~5 mg de PsSC) en buffer fosfato 50 mM, pH 7.4. Al grupo control se le administró el mismo volumen de buffer. Después de ser tratados, los animales se sacrificaron por inhalación de CO<sub>2</sub> en una cámara cerrada y se les removió la primera porción del intestino delgado. Los fragmentos se lavaron 6 veces con PBS para eliminar completamente su contenido y se fijaron en formalina fosfato 4%, pH 7.0, con una relación fijador:muestra de 40:1 (v/p), para ser luego examinados histológicamente. A continuación, las muestras fueron deshidratadas mediante pasaje secuencial en mezclas de alcoholes crecientes de 35, 45, 55, 75, 96 y 100 %. Seguidamente, se incluyeron en Histoplast® y se cortaron en secciones transversal de 5-7  $\mu$ m de espesor usando un microtomo manual. Los análisis se hicieron usando un microscopio Olympus BX51. Las imágenes digitales se obtuvieron usando una video cámara

Olympus DP-70 y analizadas con el software Image ProPlus v.6.3 (Media Cybernetics, USA). Los análisis estadísticos se hicieron por un test no paramétrico de Kruskal-Wallis y la evaluación de diferencias entre tratamientos se hizo mediante un test de comparación múltiple de Dunn ( $P < 0.1$ ).

#### 4.2.6.1 Histología y mediciones morfológicas

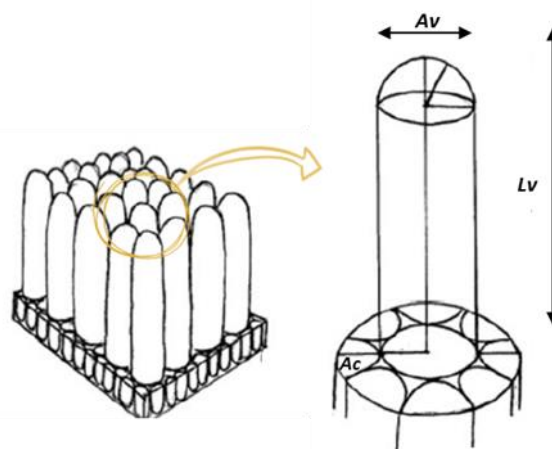
Se tiñeron cuatro secciones de tejido de cada animal con hematoxilina y eosina para poder examinar su morfología general y con ácido periódico de Schiff (PAS) para resaltar la distribución de los hidratos de carbono en las células caliciformes.

Se calculó el área de superficie absorbente de la mucosa para 17 vellosidades y criptas escogidas al azar del duodeno por animal siguiendo el método de Kisielinski et al. (2002). Este método asume que toda la mucosa está constituida por repeticiones de una unidad geométrica: una vellosidad cilíndrica con la punta redondeada rodeada de criptas cilíndricas (Fig. 7).

A partir de ello estima el índice de amplificación de la superficie ( $M$ ) según:

$$M = \frac{(Av * Lv) + \left(\frac{Av}{2} + \frac{Ac}{2}\right)^2 - \left(\frac{Av}{2}\right)^2}{\left(\left(\frac{Av}{2}\right) + \left(\frac{Ac}{2}\right)\right)^2}$$

donde  $Av$  y  $Lv$  son el ancho y el largo de la vellosidad, respectivamente, y  $Ac$  es el ancho de la cripta. Las medidas  $Av$ ,  $Lv$  y  $Ac$  se obtuvieron usando el software Image ProPlus v. 6.3.



**Figura 7. Esquema del epitelio intestinal. Unidad geométrica considerada en el cálculo de la superficie absorbente (Modificado de Kisielinski, 2002). Av: ancho de vellosidad, Lv: largo de vellosidad, Ac: ancho de cripta.**



#### 4.2.6.2 Histoquímica con lectinas

Para poder ver si se produjeron cambios en el patrón de glicosilación de los enterocitos de rata tras la administración de extracto de huevo, se examinaron cuatro secciones de intestino delgado de cada animal usando un kit de 7 lectinas biotiniladas (Tabla 1) ((Lectin Biotinylated BK1000 Kit, Vector Laboratories Inc., Carpinteria, CA, USA) a saber: Con A (*Concanavalina ensiformis*), DBA (*Dolichos biflorus*), SBA (*Glycine max*), PNA (*Arachis hypogaea*), RCA-I (*Ricinus communis-I*), UEA-I (*Ulex europaeus-I*) and WGA (*Triticum vulgare*). Los cortes fueron deparafinados con xileno, deshidratados con Alcohol 100% durante 10 min dos veces. Para inhibir la actividad peroxidasa endógena se incubó 5 min con peróxido de hidrogeno en metanol 0.3-3.0%. Luego se hidrataron, se lavaron con PBS y se incubaron con las lectinas durante toda la noche. Al otro día, se volvieron a lavar con PBS seguido de una incubación de 10 min con estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) en PBS (Vector Labs. Inc., USA). Finalmente, las lectinas unidas al tejido se visualizaron incubando durante 4-10 min con una solución buffer Tris-HCl (0.05 M, pH 6.0) conteniendo 0.02% 3.3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro (DAB) y 0.05% peróxido de hidrógeno (Dako, Carpinteria, USA). Las células positivamente marcadas se mostraron de una coloración marrón oscuro a dorada. Las secciones se contrastaron con hematoxilina de Mayer.

**Tabla 1. Especificidad de las lectinas empleadas en el ensayo de histoquímica**

Lectina	Acronimo	Especificidad
Concanavalina ensiformis	ConA	$\alpha$ -D-Man; $\alpha$ -D-Glc
Dolichos biflorus	DBA	$\alpha$ -D-GalNAc
Glycine maximus	SBA	$\alpha$ $\pm$ D-GalNAc; $\beta$ $\pm$ D-GalNAc
Arachis hypogaea	PNA	$\beta$ -D-Gal ( $\beta$ 1 $\pm$ 3) D-GalNAc
Ricinus communis-I	RCA-I	$\beta$ -Gal
Ulex europaeus-I	UEA-I	$\alpha$ -L-Fuc
Triticum vulgare	WGA	$\beta$ -D-GlcNAc; NeuNAc

### 4.3 Resultados

#### 4.3.1 Estructura primaria de PsSC

Las secuencias de aminoácidos de PsSC obtenidas por espectrometría de masas nos permitieron recuperar 6 secuencias de cDNA completas de sus subunidades a partir del

transcriptoma de la glándula del albumen de *P. scalaris*. Las secuencias nucleotídicas se depositaron en la base de datos de Genbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)) con los números de acceso: MG243358, MG243359, MG243360, MG243361, MG243362 y MG243363. Las secuencias traducidas de las subunidades de PsSC (PsSC-1-6) se muestran en la Fig. 8. Todas ellas contienen péptido señal y sus masas moleculares teóricas rondan los 21 kDa, a excepción de PsSC-2 cuyo peso molecular es de 28 kDa (Fig. 8). Estos valores concuerdan con los valores de peso molecular reportados previamente para las subunidades de PsSC deglicosilada (Ituarte et al. 2010). Las seis subunidades presentan sitios potenciales de N-glicosilación, siendo PsSC-5 la de mayor número con 3 sitios putativos. Respecto de la presencia de sitios de fosforilación, PsSC-1 presentó 3 Tyr asociadas a fosforilación; 4 Tyr, 1 Ser y 2 Thr en PsSC-2; 1 Tyr y 3 Ser en PsSC-3; 1 Tyr y 1 Ser en PsSC-4; 1 Ser y 1 Thr en PsSC-5; y 1 Tyr y 3 Thr en PsSC-6 (Fig. 8). El alineamiento múltiple de sus secuencias mostró un pequeño fragmento conservado, **G/N-G-P-G/K**, ubicado en el extremo C-terminal de cada una de las 6 subunidades (Figs. 8 y 9 A).

**PsSC-1** (MG243358)

MFVATSLLLALATLVANVASKDEYLIMEINPPKKVSEHEILNMLSPLKHKFRVTGTTKLWIVIKLDPLGYMKLDDITVPG  
KVSVTPAEDMVDTMEKFGVIWPRVLLTDVNITLFQSHSYLTDVTKDQLTAMMVGYGEHMIETLKSHPYQFYRATGAT  
 PHKHFFVSSAREEVEVIGREGVDIWGGPGEYHIKPEYLTRI

AA: 180 MW: 20665.9 PI: 5.74

**PsSC-2** (MG243359)

MAEHRIAVFLFLVVVAASSLAQMLPHQKYIIEVKDSEKSPQIEIRGEMKDTTEVLYSFKALGAPSYHIVVEVTSRNLRLKE  
EVELKGKTKMVPVIDMYDLAKTFGVTWRYCGEHLSDTNLTLVERTLPLEGLTTQQSRAHLKAFMEEIKDRFQKYNRA  
 FYTNGSSPPKMYIYINIPLGEVDDFASKGTNLFGGPGALYTSVSFLSSFPK

AA: 246 MW: 27861.1 PI: 8.73

**PsSC-3** (MG243360)

MYALAIALLAFSTFVSNAIARQEYLLLDIIDASTEEINTALRDIEIELKFKTKGTSRHLIVVKQNDLNLEKLARIDIPGKSKPSP  
LQDMADLMEEIGVGWPKRELTNVNVTLFERTLNLEDRTMEQYMSEKREYQQLISPLSSYTYRAFKANGAYPPKVYFFI  
 NIPRQNLDDASNTGIDVLLGGPGNARTIVQYLTKLS

AA: 178 MW: 20268.1 PI: 5.33

**PsSC-4** (MG243361)

MAATLALLAMSILLPSGADMGAEDLVFLEVDSGTSDEKLIFEDLINITKQLFVKELGTSKFSMVLKESELAKLTLKDVDEV  
 LPVEVFDYTCEKLNLSWSPHPDISNHTLTLFKFLPSLKGQTFQQFEALKYDIRTIGPLLTNNPHRVYISKGYMPPRGYLF  
 NTLDDGTRVLGGIQDIFGGPKLNGVEVSYVHILHHAM

AA: 181 MW: 20476.5 PI: 5.19

**PsSC-5** (MG243362)

MAATLALLAMFIVLPSGAEMGVHDLVVVEWDTCTSGEKLPPILTNRTLIPSGLFMKEVGTSTRYLAVVREPFLTRFNFS  
 VVEVNPVEDVNDVMKLEISVPPSKDISNKTLLTIKIPSLKGGQTLKQYDSELKRVGKCLNTALKDYPKRVYISSGFPPKYY  
 YFLEIPLELIEFSFAALDVFGGPGSTKNKISFVQILRLLEN

AA: 184 MW: 20815.1 PI: 7.95

**PsSC-6** (MG243363)

MLVATLILVALSAVFTNVYASCQYIILDVNKVKSKSVEDYKDMLKEVDLVYSFKVVGSSRLLFVVRLNESSFEKFSKINLPG  
 DAISIAVGDLSDKLRVTGVDWKKWDELDPANLTLFERTLKFEGEPTGAVSHLQAYGEKIPIVESFPNKGFFPLGRTPF  
 KAYFIFLSFRCHQVGVGSAFALNYLNGPGDSTTKVEFLTKV

AA: 183 MW: 20560.6 PI: 7.88

**Figura 8. Secuencias de aminoácidos deducidas de PsSC.** Se subraya la secuencia del péptido señal estimada *in silico*. Los potenciales sitios de fosforilación se encuentran subrayados y marcados en verde (Tyr), en rojo (Ser) y en azul (Thr). Los potenciales sitios de N-glicosilación se marcan subrayados y en negrita. El dominio conservado se resalta en negrita y rojo. Para cada secuencia madura se muestra el número de aminoácidos (AA), el peso molecular (MW) y el punto isoeléctrico (pI) teórico.

Las 6 secuencias aminoacídicas obtenidas de PsSC mostraron una elevada similitud con las secuencias ortólogas de las subunidades de PcOvo (40.56 a 68.78%) al igual que con los ortólogos de PmPV1 (42.78 a 70.86%). Llamativamente, la similitud de secuencia entre las

6 subunidades de PsSC fue menor que con los ortólogos (16.96 a 41.67%), como se había observado previamente en PcOvo (Ituarte et al. 2019; Sun et al. 2012) y PmPV1 (Pasquevich et al. 2017). El alineamiento de secuencias de las subunidades de PsSC con sus homólogos mostró unos pocos sitios conservados para las 18 secuencias. Particularmente, el sitio del extremo C-terminal **GGPG** previamente reportado para PcPV1 y PmPV1.

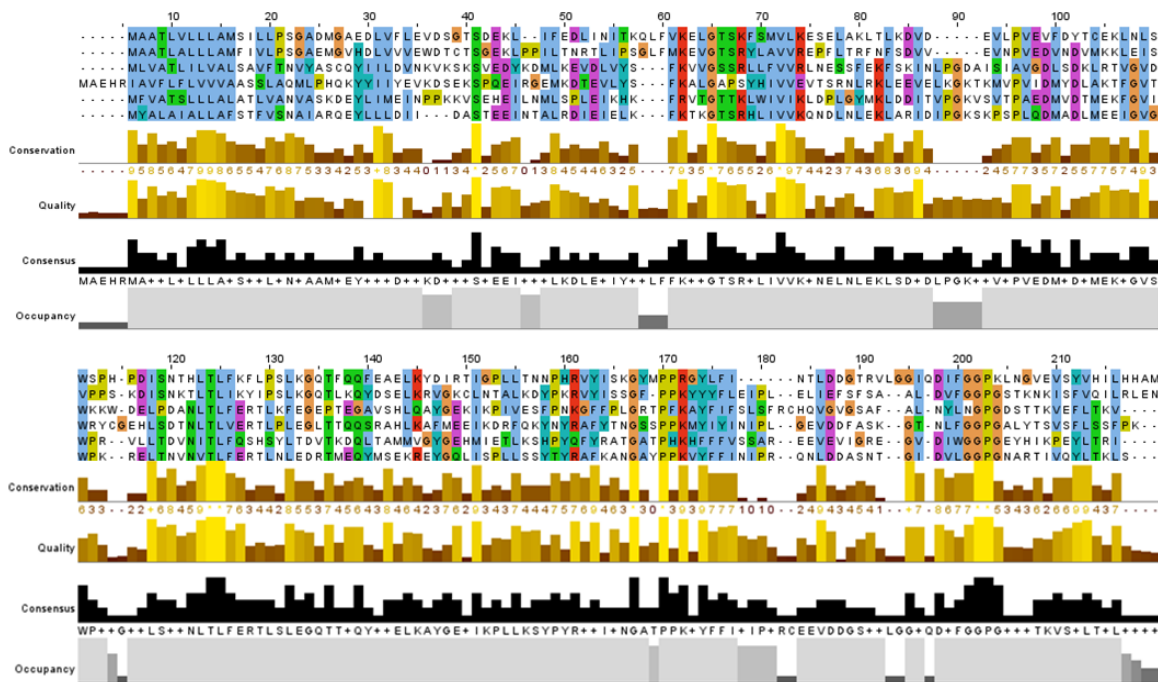


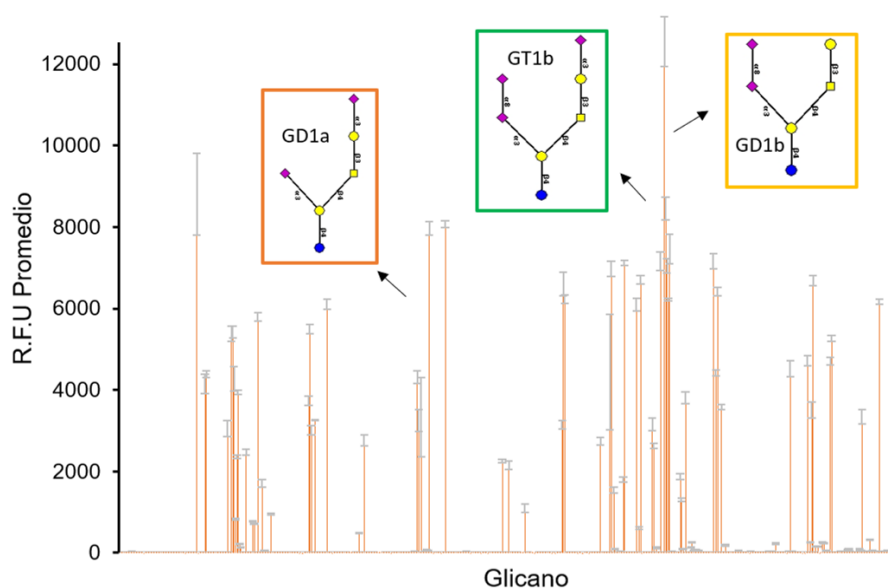
Figura 9. A. Alineamiento múltiple de las secuencias de las subunidades de PsSC.

### 4.3.2 Especificidad de unión a glicanos por Glycan array

El ensayo se llevó a cabo usando 3 concentraciones de proteína diferentes (2, 20 y 200 µg/mL) los cuales dieron resultados similares. La Tabla 2 muestra los 10 oligosacáridos reconocidos con mayor afinidad por PsSC. Entre ellos, se destacan dos grupos mayoritarios de oligosacáridos no relacionados entre sí: glicoesfingolípidos y antígenos del grupo ABO. Las estructuras relacionadas a gangliósidos fueron las reconocidas con mayor afinidad por PsSC (GD1b>GT1b>GD1a) (Fig. 10) mientras que para los antígenos del grupo ABO, se halló especificidad sobre todo por los tipos 2B y 2A.

**Tabla 2. Principales oligosacáridos reconocidos por PsSC.** Las estructuras se encuentran ordenadas en orden decreciente de afinidad de reconocimiento. En amarillo, verde y naranja se resaltan los gangliósidos GD1b, GT1b y GD1a, respectivamente. En rojo antígeno del grupo ABO tipo 2B

Orden	Oligosacárido	RFU Promedio	%CV
1	Galb1-3GalNAcb1-4(Neu5Aca2-8Neu5Aca2-3)Galb1-4GlcB-Sp0	12556 ± 1216	10
2	Fuca1-2Galb1-3GalNAcb1-3Gala1-4Galb1-4GlcB-Sp9	8812 ± 2007	23
3	Neu5Aca2-3Galb1-3GalNAcb1-4(Neu5Aca2-8Neu5Aca2-3)Galb1-4GlcB-Sp0	8452 ± 558	7
4	Neu5Aca2-3Galb1-3GalNAcb1-3Gala1-4Galb1-4GlcB-Sp0	8067 ± 159	2
5	Neu5Aca2-3Galb1-3GalNAcb1-4(Neu5Aca2-3)Galb1-4GlcB-Sp0	7969 ± 326	4
6	GalNAca1-3GalNAcb1-3Gala1-4Galb1-4GlcB-Sp0	7468 ± 722	10
7	GalNAcb1-3Gala1-6Galb1-4GlcB-Sp8	7162 ± 450	6
8	Galb1-4GlcNAcb1-2Mana-Sp0	7157 ± 369	5
9	Galb1-3GalNAca1-3(Fuca1-2)Galb1-4GlcNAc-Sp0	7116 ± 136	2
10	Gala1-3(Fuca1-2)Galb1-4GlcNAcb1-3GalNAca-Sp14	7047 ± 346	5

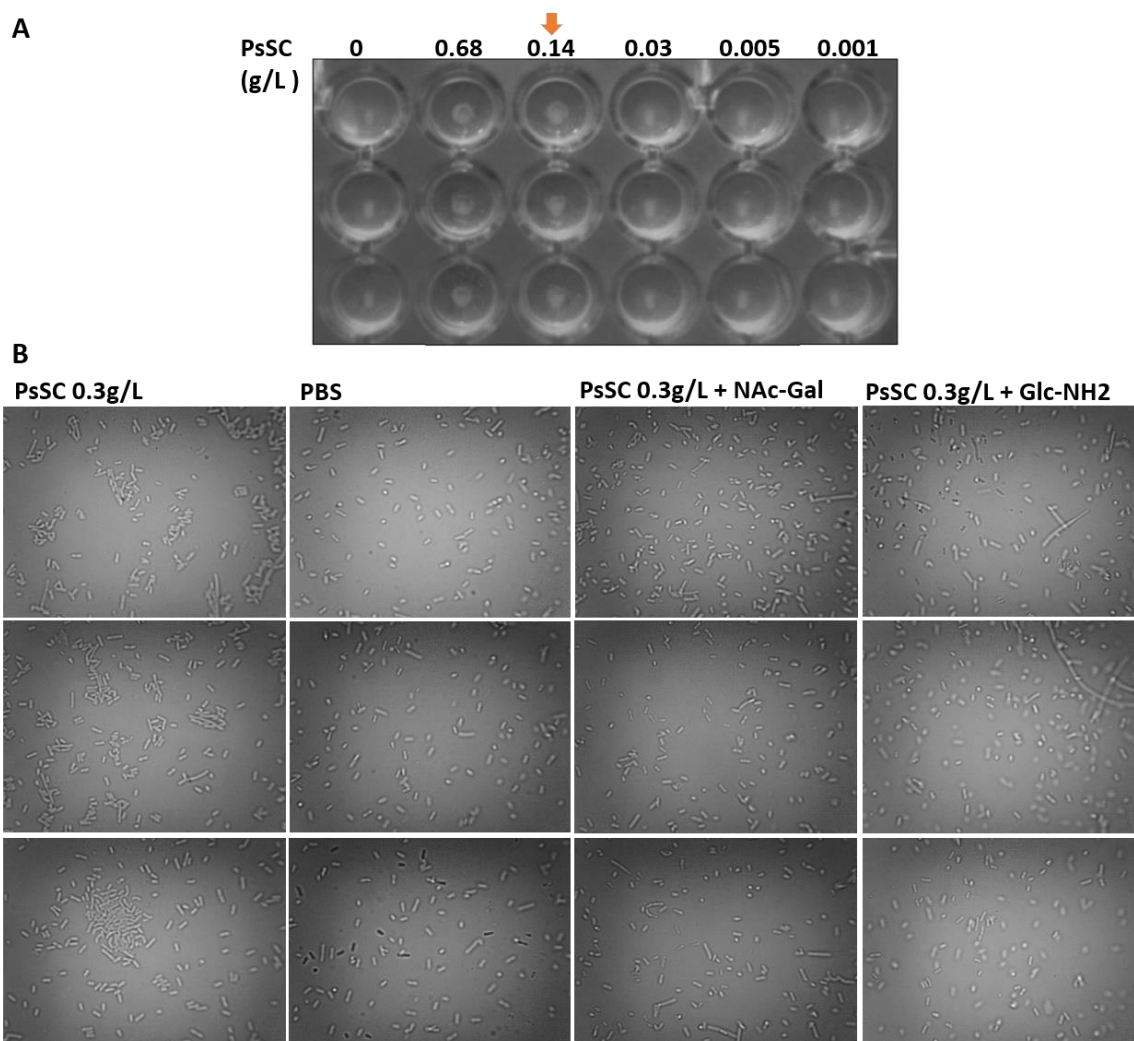


**Figura 10. Gráfico de RFU correspondiente a cada glicano ensayado.** Los recuadros muestran las estructuras de los tres gangliósidos con mayor RFU y sus colores se corresponden con los de la tabla 2.

### 4.3.3 Aglutinación de microorganismos

Se exploró la actividad antimicrobiana de PsSC en bacterias gram-negativas (*Escherichia coli*) y gram-positivas (*Staphylococcus pseudointermedius*). Los resultados no mostraron actividad antibacteriana en medio líquido ni medio sólido, al menos bajo las condiciones experimentales empleadas. Sin embargo, PsSC mostró actividad aglutinante dependiente

de la dosis hasta 0.14 g/L de proteína contra *E. coli* (Fig. 11 A). Esta actividad aglutinante se vio inhibida por la presencia de los monosacáridos GlcNH<sub>2</sub> and GalNAc (Fig. 11 B).

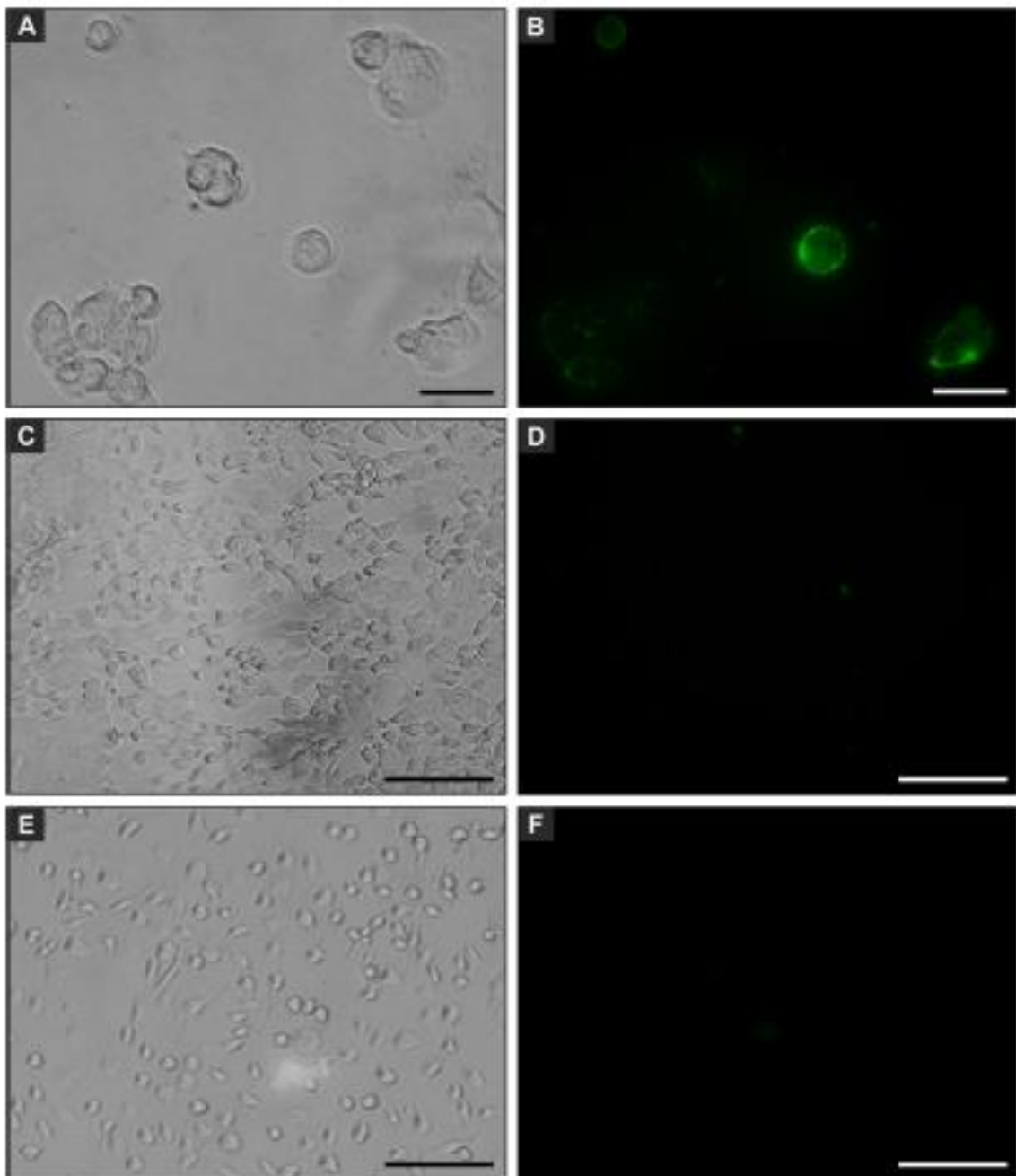


**Figura 11. Capacidad aglutinante de PsSC sobre la cepa BL21 de *E. coli*.** **A.** Alicuotas de *E. coli* incubadas con diferentes concentraciones de PsSC. La flecha naranja marca la última concentración a la cual aglutina microorganismos. **B.** Efecto inhibitorio de NAcGal y GlcNH<sub>2</sub> sobre la capacidad aglutinante de PsSC. La aglutinación de *E. coli* se observa como cúmulos de bacterias mientras que la ausencia de estos indica inhibición de la actividad.

#### 4.3.4 Interacción con la superficie celular y citotoxicidad

Los ensayos de localización de la proteína usando PsSC marcada con Alexa 488 mostraron una señal de fluorescencia débil pero detectable en la superficie de células Caco-2 (Fig. 12 A y 12 B). Para descartar la posibilidad de interacciones no específicas, las células Caco-2 se incubaron con BSA marcada con Alexa 488 (Fig. 12 C y 12 D), la cual mostró una interacción insignificante. Asumiendo que la unión a BSA representa la interacción

inespecífica máxima entre Caco-2 y proteínas (Gabor et al. 1998), este ensayo indica unión específica de PsSC a la superficie celular de las Caco-2. Los experimentos también se llevaron a cabo usando células IEC-6 pero en este caso la proteína no se unió a la superficie celular (Fig. 12 E y 12 F). Aunque los experimentos indican una interacción específica de PsSC con la membrana plasmática de células Caco-2, no se observó efecto citotóxico en ninguno de los tipos celulares ensayados.



**Figura 12. Unión de PsSC a la membrana de células en cultivo.** Cultivo de Caco-2 incubado durante 1 h con PsSC marcada con Alexa 488 observado por (A) microscopía de contraste de fases (B) microscopía de fluorescencia. Barra= 50  $\mu$ m. C y D idem A y B pero empleando BSA marcada con Alexa 488. Barra= 100  $\mu$ m. E y F idem A y B pero empleando la línea celular IEC-6.

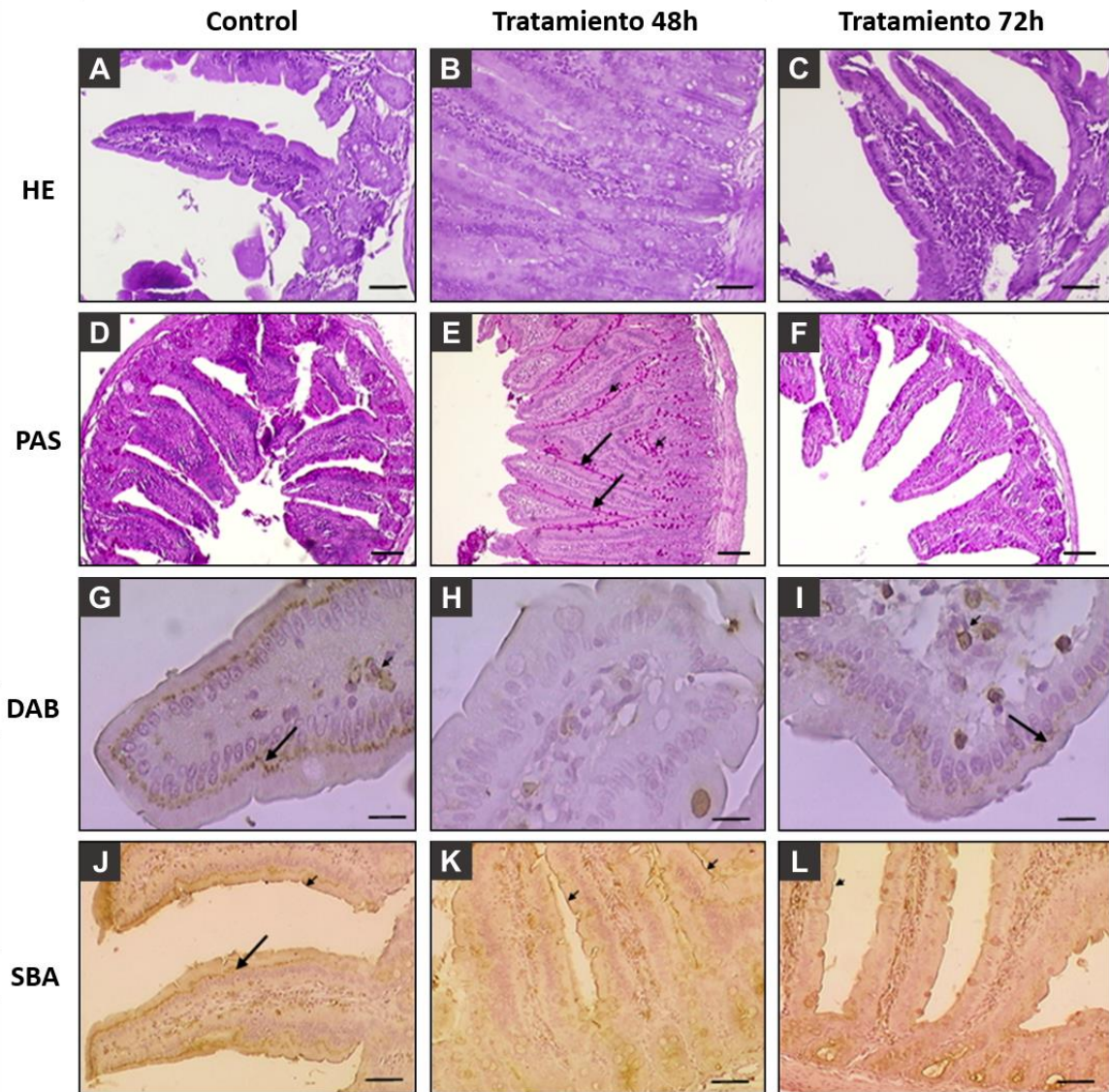
#### 4.3.5 Efecto de la administración oral de ESF sobre el epitelio digestivo

Para conocer si la ESF de *P. scalaris* tiene algún efecto sobre el sistema digestivo, se les administró oralmente a las ratas ESF cada 24 h. Los intestinos delgados de los animales tratados por 48 h mostraron vellosidades significativamente más altas (Media  $513 \pm 6.73$ ), tortuosas y sinuosas respecto de las vellosidades control (Media  $340.3 \pm 3.44$ ). Los animales tratados por 72 h mostraron criptas con dimensiones normales al igual que en la morfología general del intestino (Fig. 13 A, 13 B y 13 C). La tinción con PAS en el glicocáliz de las vellosidades y criptas en los animales tratados 48 h fue más intensa que en los controles, mientras que en los animales tratados 72 h la tinción fue menos intensa o moderada. Las mucinas de las células caliciformes mostraron una fuerte tinción con PAS en todos los grupos, observándose en los animales tratados un incremento en el número de estas células que no fue cuantificado (Fig. 13 D, 13 E y 13 F).

Entre las siete lectinas ensayadas, DBA y SBA mostraron las mayores diferencias entre tratamientos (Fig. 13 G a L). DBA mostró una fuerte marcación en la zona supranuclear de los enterocitos y en el corion de algunas las células de los animales control, mientras que en los animales tratados 48 h no se observó unión en esas regiones. En los animales tratados 72 h el patrón fue similar al control, aunque con menor intensidad en la tinción (Fig. 13 G, 13 H y 13 I flechas). La unión de SBA a los enterocitos en animales control fue moderada a intensa en la región supranuclear y moderada en la región del glicocáliz (Fig. 13 J), mientras que en los animales tratados 48 h la mayor intensidad de marcado se limitó al glicocáliz (Fig. 13 K flechas), los animales tratados 72 h mostraron un patrón de marcación más débil (Fig. 13 L). Estos resultados indican que los glicanos que unen las lectinas DBA y SBA se encuentran diferencialmente expresados en los enterocitos expuestos a PsSC por 48 h.

Se observó un incremento significativo en la superficie absortiva del intestino delgado de las ratas tratadas 48 h cuando se las comparó con los controles, mientras que los animales del grupo tratado 72 h revierten a la condición normal de superficie absortiva (Tabla 3).





**Figura 13. Efecto de la administración oral de ESF de sobre la morfología del intestino delgado de ratas.** Los animales fueron administrados con ESF conteniendo 8 mg de proteína (~5 mg de PsSC), Los controles recibieron únicamente buffer fosfato. Se les removió la primera porción del intestino 48 h y 72 h posteriores a la administración. **A,D,G,J:** Control; **B,E,H,K:** sacrificados 48 h; **C,F,I,L:** sacrificados 72 h. **A,B,C:** Cortes teñidos con HE. Las vellosidades de los animales tratados 48 h se mostraron más altas, tortuosas y sinuosas que el control. **D,E,F:** cortes teñidos con PAS resaltando el glicocalix (flechas) y células caliciformes (puntas de flecha) que se vieron incrementadas luego de 48 h de la administración. **G,H,I:** histoquímica con DBA. Flechas: zona supranuclear de los enterocitos con marcación, puntas de flecha: células del corion de la vellosidad. **J,K,L:** histoquímica con SBA. Flechas: zona supranuclear con marcación positiva, puntas de flecha: glicocálix con marcación positiva. A,B,C,J,K,L, Barra= 50  $\mu$ m; D,E,F Barra= 100  $\mu$ m; G,H,I: Barra= 10  $\mu$ m.

**Tabla 3. Superficie absorbente de la mucosa del intestino delgado de ratas**

	48h	72h
Tratados	7.37 $\pm$ 0.1*	5.83 $\pm$ 0.02
Control	5.49 $\pm$ 0.26	5.49 $\pm$ 0.26

Los valores representan la media  $\pm$  SD de 3 ratas (n = 17 secciones transversales/animal).

\*p<0.1.

#### 4.4 Discusión

En este capítulo profundizamos el conocimiento sobre la carotenoproteína PsSC, la proteína más abundante en los huevos de *P. scalaris* (Ituarte et al. 2008). Al igual que las carotenoproteínas ortologas PcOvo y PmPV1 (Ituarte et al. 2019; Pasquevich et al. 2014), demostramos que el oligómero PsSC está compuesto por 6 polipéptidos, con poca similitud de secuencia entre ellos, reforzando la hipótesis de que el evento de duplicación genética tuvo lugar tempranamente en la historia del género *Pomacea* (Sun et al. 2012). El análisis de las secuencias de las carotenoproteínas de las diferentes especies mostró poca divergencia entre los ortólogos lo que podría indicar que después del evento de duplicación, cada parálogo adquirió una función específica que dificultó variaciones adicionales, o bien que hubo un beneficio en tener múltiples copias del mismo gen de manera tal que la síntesis de carotenoproteínas pudo ser potenciada (Zhang 2003). En el caso de las perivitelininas de *Pomacea*, el segundo escenario pareciera ser el más plausible ya que estas carotenoproteínas deben ser sintetizadas en grandes cantidades y a una tasa de síntesis elevada durante el periodo de producción de los huevos, que son ovipuestos por las hembras semanalmente durante todo el período reproductivo (Cadierno et al. 2017b, 2018).

Aunque la función biológica de una proteína puede, en ciertas circunstancias, ser predicha en base a su estructura primaria, en el caso de PsSC las 6 secuencias de aminoácidos deducidas no muestran similitud de secuencia con ninguna lectina conocida. Esto podría deberse, por un lado, a la pobre representación de lectinas de invertebrados en las bases de datos en comparación a las lectinas de vertebrados que representan el 78% de las lectinas del NCBI. Por el otro, aunque las familias de lectinas han sido descritas en base a la secuencia aminoacídica de su dominio de reconocimiento de hidratos de carbono, muchas lectinas aisladas de diferentes fuentes con baja similitud de secuencia aminoacídica tienen la misma estructura terciaria (Chickalovets et al. 2016). Este bien podría ser el caso de PsSC de la que aún se desconoce su plegamiento. La ausencia de homología de secuencia se ha observado también en lectinas de otros moluscos, como por ejemplo la aglutinina de la hemolinfa de *Octopus maya* (Alpuche et al. 2010) y más recientemente se describió una lectina en el mejillón *Mytilus trossulus* (Chickalovets et al. 2016).

En este capítulo, también caracterizamos en profundidad la actividad lectina de PsSC. Es destacable que los cinco oligosacáridos reconocidos con mayor afinidad contengan Gal $\beta$ 1-3GalNAc, un disacárido presente en la estructura de los principales esfingolípidos de vertebrados (subfamilias Lacto, Ganglio y Globo). Esta especificidad se vio también mediante ensayos de inhibición de la hemaglutinación por competencia con monosacáridos realizados previamente en los que la PsSC se vio fuertemente inhibida por GalNAc y GalNH<sub>2</sub> (Ituarte et al. 2012). Llamativamente, PsSC reconoció dos estructuras oligosacárido no relacionadas: el grupo ABO de la sangre humana y los gangliósidos. Esta amplia especificidad sugiere la presencia de dos o tal vez más sitios de reconocimiento de alta afinidad en PsSC, uno para cada uno de estos grupos, o que esta lectina reconoce el disacárido Gal $\beta$ 1-3GalNAc que se encuentra presente en la estructura de ambos grupos: los gangliósidos y grupo ABO de tipo 2. Esta especificidad de reconocimiento fue confirmada experimentalmente por la unión de PsSC a la superficie de células Caco-2 que presenta este tipo de estructuras oligosacáridos en su superficie celular (Arndt et al. 2011). Está bien establecido que las lectinas de muchos moluscos forman parte del sistema inmune innato en el reconocimiento de MAMPs (Malham et al. 2002). Es más, las lectinas de moluscos, como las de *Crenomytilus grayanus* (CGL), están involucradas no solo en el reconocimiento sino además en el ataque a microbios invasores (Belogortseva et al. 1998; Kovalchuk et al. 2013). Aunque las implicancias fisiológicas de la presencia de lectinas dentro de un huevo puedan tener diferentes interpretaciones teóricas, la demostración experimental de que PsSC tiene capacidad tanto para aglutinar microorganismos, así como para interactuar de manera específica con la superficie celular, sugiere la participación de PsSC en el reconocimiento de agentes invasores, probablemente como parte de la respuesta inmune innata.

Por otra parte, la administración oral de la ESF de *P. scalaris* en ratas provocó alteraciones en el tracto digestivo, afectando reversiblemente la superficie absortiva, morfología de las vellosidades y de los enterocitos al inducir la remodelación del glicocáliz. Los cambios en el patrón de glicosilación de los enterocitos fueron principalmente detectados a través de cambios en la unión de DBA y SBA que tienen especificidad por oligosacáridos que contienen GalNAc, uno de los monosacáridos reconocidos por PsSC. Es interesante que estos cambios en la morfología del digestivo y en su glicosilación tienden a volver a los

niveles normales después de 72 h de tratamiento lo cual indica que las ratas adaptan en pocas horas su sistema digestivo a los efectos de PsSC. Respuestas adaptativas similares se han observado para lectinas de plantas (Bardocz et al. 1995) que comparten varias características con PsSC. Todas son proteínas de reserva, altamente estables en un amplio rango de temperatura y pH y ambas son no digeribles, lo cual les permite llegar al intestino activas. Ambas, además, son capaces de unir el epitelio intestinal provocando diferentes efectos (Vasconcelos & Oliveira 2004). Muchas de ellas alteran la normal digestión al modificar la flora intestinal de los consumidores uniéndose tanto a enterocitos como a la superficie de estos microorganismos actuando como red para unirlos. De hecho, se ha observado un incremento en el crecimiento de *E. coli* y de otras bacterias en ratas y aves tras la administración de lectinas de plantas (Nathan & Halina 2007). Este bien podría ser el caso de PsSC ya que es capaz de aglutinar este tipo de microorganismos. La unión de lectinas al epitelio también puede alterar la actividad de enzimas presentes en la superficie de los enterocitos, así como alterar su permeabilidad de membrana impidiendo la correcta absorción de nutrientes (Kik et al. 2014). También se ha demostrado que las lectinas pueden interferir con la normal absorción de los nutrientes al unirse a las microvellosidades o internalizándose, muchas veces provocando efectos deletéreos (Nathan & Halina 2007). Se ha descrito también que las lectinas producen modificaciones en la morfología de las vellosidades como las observadas para PsSC (Otte et al. 2001). Más aún, se han reportado síntomas de mal-estar, vómitos y diarrea en los consumidores, provocando el rechazo del alimento (Nathan & Halina 2007).

Teniendo en cuenta estos resultados y apoyándonos en toda esta variada información recabada sobre el efecto de lectinas sobre el digestivo de depredadores (herbivoría), podemos postular que PsSC formaría parte de las defensas del huevo contra la depredación mediante un efecto antinutritivo: el consumo del huevo provocaría un efecto agudo alterando el mecanismo digestivo que, sumado al bajo valor nutricional de los huevos induciría el comportamiento de evasión del alimento, disuadiendo así del consumo a los depredadores. El mecanismo antinutritivo presente en los huevos de estos caracoles pareciera ser una evolución convergente con el de muchas semillas de plantas, compartiendo ambos efectos similares sobre los consumidores (Oliveira et al. 2004; Peumans & Van Damme 1995; Ripoll et al. 2003).

#### 4.5 Conclusión

En este capítulo aportamos evidencias de un potencial mecanismo de defensa del embrión en el género *Pomacea* que involucra la actividad lectina de la proteína más abundante del huevo de *P. scalaris*: la carotenoproteína PsSC. Llamativamente, la estructura primaria de PsSC no permite clasificarla dentro de ninguna familia de lectinas conocidas. La presencia de una novedosa actividad biológica en PsSC entre un grupo de carotenoproteínas con relación estructura-función conservada expande nuestro conocimiento respecto de las defensas de los huevos de estos caracoles dulceacuícolas en particular, y sobre su biología reproductiva en general. Profundizar el estudio de las otras proteínas del FPV de esta especie, así como sobre un mayor número de las carotenoproteínas de distintas especies de *Pomacea*, ayudará a lograr una mejor interpretación de la relación estructura-función de esta lectina y de los mecanismos asociados con las alteraciones provocadas en el sistema digestivo de potenciales depredadores de huevos.

**5** Defensas bioquímicas de los huevos de *Pomacea diffusa*: caracterización de su PV1 y relaciones filogenéticas.

## 5.1 Introducción

Los pigmentos carotenoides son comunes entre los invertebrados formando complejos no covalentes con las proteínas, otorgándole a los tejidos una gran variedad de colores. Se encuentran principalmente en huevos y estructuras reproductivas (Cheesman et al. 1967), en donde frecuentemente se asocian a glúcidos y lípidos formando glico-lipo-carotenoproteínas (Zagalsky 1985). Entre las perivitelinas, las carotenoproteínas están siempre presentes en aquellos ampuláridos que depositan sus huevos en sustratos emergentes, en especial en el género *Pomacea*. Las carotenoproteínas de los huevos de diferentes especies de *Pomacea*, llamadas colectivamente PV1s, son las más abundantes del FPV de los huevos. El clado canaliculata ha sido el más ampliamente estudiado incluyendo varios trabajos sobre PcOvo (también llamada Ovorrubina) y PmPV1 (Cheesman 1958; Dreon et al. 2004b, 2007, 2008; Garin et al. 1996; Pasquevich et al. 2014, 2017). Por el contrario, las carotenoproteínas del clado hermano bridgesii han sido poco estudiadas, conociéndose únicamente la carotenoproteína PsSC de *P. scalaris* (Ituarte et al. 2008, 2010, 2012). Independientemente de su origen, todas las PV1s estudiadas hasta el momento presentan varias características en común. Todas ellas son carotenoproteínas de alto peso molecular que se acumulan masivamente en el huevo representando más del 60% de la proteína soluble del FPV (Dreon et al. 2003, 2008; Ituarte et al. 2008; Pasquevich et al. 2014). Presentan unidos no covalentemente carotenoides (Cheesman 1958; Dreon et al. 2004b; Garin et al. 1996; Heras & Pollero 2002; Pasquevich et al. 2014) cuya composición varía entre especies, otorgando diferente coloración en sus puestas. Además, estos carotenoides son potentes antioxidantes de membrana, y participan en la fotoprotección del embrión frente a la radiación solar (Dreon et al. 2004b; Ituarte et al. 2008; Pasquevich et al. 2014). Las PV1s tienen en común, además, un elevado grado de glicosilación que, junto con la presencia del polisacárido galactógeno del FPV, actuarían previniendo la desecación dada su capacidad de retención de agua (Heras et al. 2007). Esta glicosilación también puede conferirles alta estabilidad térmica, resistencia a la degradación y estabilidad en la estructura cuaternaria (Jayaprakash & Surolia 2017). Esto pareciera ser así en las PV1s ya que han demostrado ser altamente estables frente a amplios rangos de pH (entre 4.0 y 12.0) y de temperatura (hasta 85 °C), al mismo tiempo que son capaces de tolerar la digestión por pepsina, tripsina y varias otras proteasas

halladas en el tracto digestivo (Dreon et al. 2010, 2013; Ituarte et al. 2012; Pasquevich et al. 2014, 2017). Otra característica llamativa de las PV1s es que parecen haber evolucionado una llamativa estabilidad cinética, necesaria cuando las proteínas están sometidas a condiciones extracelulares adversas (Xia et al. 2016), permitiéndoles soportar, por ejemplo, el agresivo ambiente digestivo. Por todas estas razones, se le ha asignado a las PV1s una función antinutritiva en el sistema de defensa del huevo aparte de su clásico rol como proteínas de reserva empleadas en la nutrición del embrión.

Sin embargo, se ha observado una diferencia funcional fundamental entre las carotenoproteínas del género. Mientras que PsSC de *P. scalaris* es una lectina con una fuerte actividad hemaglutinante (Ituarte et al. 2012), sus ortólogos del clado canaliculata carecen de esta actividad, hecho que resulta sorprendente dado que las 3 especies muestran elevada similitud entre secuencias ortólogas (capítulo 4). Mas aún, *P. canaliculata* y *P. maculata* presentan en su FPV la toxina PV2, capaz de formar poros sobre las membranas celulares, que no se expresa en *P. scalaris* (Dreon et al. 2013; Giglio et al. 2016, 2020; Heras et al. 2008). Esto nos impulsó a estudiar la posible existencia de diferentes roles defensivos de las perivitelinas contra la depredación asociados a su filogenia. Además, la presencia de una PV1, con actividad lectina en los huevos de *Pomacea*, carente de homología de secuencia con otras lectinas conocidas (Cap. 4), fue un hallazgo inesperado mostrando que, dentro del género, las carotenoproteínas exhiben divergencia estructural y/o funcional, aunque esta hipótesis necesita de un mayor sustento comparativo. Para comprender mejor los roles que juegan las carotenoproteínas en la defensa de los huevos y comenzar a distinguir las tendencias evolutivas, en este capítulo estudiamos el FPV de *P. diffusa*, una especie filogenéticamente cercana a *P. scalaris*, perteneciente al clado bridgesii. Investigamos las características generales de su FPV, en particular la presencia de proteínas neurotóxicas, aislamos y caracterizamos su principal carotenoproteína a la que denominamos PdPV1, determinamos su estructura y estudiamos su estabilidad estructural, así como también realizamos una caracterización funcional.



## 5.2 Métodos

### 5.2.1 *Aislamiento y purificación de PdPV1*

La purificación de PdPV1 se realizó de manera similar a lo expuesto en la sección 3.4 y 3.5.1 de la metodología general, pero con algunas modificaciones. Brevemente, el homogenato de huevo se preparó en Tris-HCl 20 mM, pH 7.4 con una relación buffer:muestra de 3:1 (v/p). El homogenato luego se centrifugó secuencialmente a 10.000 xg por 20 min y a 10.000 xg durante 45 min a 10 °C. Ambos pellets fueron descartados y el sobrenadante se centrifugó a 207.000 xg por 22 h a 10 °C sobre una solución de NaBr  $\delta=1.28$  g/mL. Luego de la centrifugación, se colectaron alícuotas de 200  $\mu$ L secuencialmente desde arriba hacia el fondo del tubo para calcular las densidades de hidratación e identificar las fracciones que contenían proteína de la misma manera que se explicó en la sección 3.5.1. Las fracciones que mostraron picos de absorbancia a 280 nm se separaron y purificaron por cromatografía de exclusión mediante HPLC como se indicó en la sección 3.5.2. La pureza de la proteína obtenida se controló por PAGE en condiciones nativas y desnaturizantes como se describió en la sección 3.6. La cantidad de proteína se determinó siguiendo el método colorimétrico de Lowry et al. (1951) (sección 3.7.1).

### 5.2.2 *Estimación del peso molecular*

El peso molecular de PdPV1 se estimó por PAGE-Nativo 4-20% usando una mezcla de proteínas estándares de alto peso molecular (Amersham Biosciences). Se siguió el mismo procedimiento descrito en la sección 3.6.1. con la siguiente salvedad. Dado que la separación por PAGE-Nativo no depende exclusivamente de la masa de las proteínas, esta técnica no es la más adecuada para la determinación del peso molecular de estas macromoléculas. Sin embargo, con el uso de geles en gradiente y de tiempos de corrida muy extensos, cada proteína alcanza su poro límite (poro tal que, debido a su tamaño, la molécula no puede continuar desplazándose en el gel), permitiendo una estimación del peso molecular a partir de la comparación con la movilidad de las proteínas estándar (Margolis & Wrigley 1975).

El peso molecular de la partícula también se estimó mediante SEC calculando el Radio de Stokes ( $R_s$ ). Esta técnica considera que la proteína se comporta en solución como una esfera con propiedades hidrodinámicas equivalentes y con un radio definido. Por tanto,

este último parámetro puede utilizarse para determinar el tamaño que presenta una proteína globular en solución. Para ello utilizamos una columna Superdex 200 HR 10/300 GL equilibrada y eluida con  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4, acoplada a un sistema de HPLC (sección 3.5.2). El peso molecular aparente se calculó utilizando una curva de calibración con estándares de proteínas globulares: tiroglobulina, ferritina, catalasa, aldolasa y ovoalbumina (Amersham, Princeton, NJ). Se obtuvo el  $\log R_s$  de cada proteína de calibración según la siguiente ecuación:

$$\log R_s = 0.369 (\log MW) - 0.254$$

Se graficaron los  $\log R_s$  en función del volumen de elución (tiempo de retención multiplicado por el volumen de flujo) y se hizo un ajuste lineal. Con esta recta fue posible estimar el peso molecular de PdPV1.

### **5.2.3 Espectroscopia de absorción**

Además de presentar absorción a los 280 nm, las proteínas pueden absorber por encima de los 400 nm en caso de poseer grupos prostéticos que absorban la radiación en la región visible, como sucede con PdPV1. Se midió el espectro de absorción UV-Visible de muestras de PdPV1 entre los 250-800 nm usando un espectrofotómetro con arreglo de diodos Agilent 8453 UV-visible (Agilent Technologies, Inc.) empleando una resolución espectral de 1nm, y a temperatura ambiente. Se promediaron 3 espectros para cada muestra y se sustrajo la contribución del buffer ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.0). Para las mediciones se utilizaron cubetas de cuarzo de 150  $\mu\text{L}$  de capacidad y 1 cm de paso óptico.

### **5.2.4 Dispersión de rayos-X de bajo ángulo**

La dispersión de rayos-X de bajo ángulo (SAXS) se basa en la determinación del comportamiento de dispersión elástica de los rayos X a bajo ángulo (típicamente 1-2  $\text{\AA}$ ) cuando interactúan con una partícula, en nuestro caso una proteína en solución. A partir de este patrón de dispersión es posible obtener información estructural de macromoléculas en solución como su forma y tamaño, pudiendo incluso, obtener modelos tridimensionales de baja resolución de la molécula de interés.

En líneas generales, cuando un haz de rayos X incide sobre una solución de partículas homogénea y monodispersa, algunos rayos son dispersados al chocar con la muestra e inciden sobre un detector. En nuestro caso, la fuente de rayos X con la cual se irradió la muestra fue radiación electromagnética producida por electrones que se mueven a alta velocidad en un campo magnético (radiación sincrotrón). Los fotones dispersados por la muestra se registran en función de su ángulo de dispersión respecto del haz incidente, formando así el “diagrama de dispersión SAXS” (Jacques & Trewhella 2010; Mertens & Svergun 2010). Por conveniencia matemática, el patrón de dispersión se describe como la intensidad ( $I$ ) en función de la amplitud del vector de dispersión o momento de transferencia ( $q$ ) (Jacques & Trewhella 2010):

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta$$

donde  $\lambda$  es la longitud de onda fija del haz incidente y  $\theta$  es la mitad del ángulo entre el haz incidente y la radiación dispersada.

El análisis de los datos comienza entonces reduciendo los datos de dispersión a valores de  $I(q)$  versus  $q$  y la sustracción de la contribución del solvente. Se pueden obtener varios parámetros invariantes respecto de la forma y el peso general de la partícula directamente de las curvas graficadas, permitiendo una caracterización rápida de la muestra. A partir del perfil de difracción hay dos parámetros que pueden calcularse con precisión: Intensidad de dispersión hacia adelante  $I(0)$  y el radio de giro  $Rg$ , que aportan información respecto del peso y la forma.  $I(0)$  es la intensidad de la radiación dispersada a ángulo cero ( $2\theta = 0^\circ$ ) que no puede ser medida directamente y se determina por extrapolación. Está relacionado con el número de partículas dispersantes por unidad de volumen y el volumen de la partícula al cuadrado. El  $Rg$  representa el promedio de las distancias de cada átomo de la partícula al centro de masa de la misma. El  $Rg$  e  $I(0)$  pueden ser estimados usando la aproximación de Guinier de 1939 a valores lo suficientemente pequeños de  $q$ :

$$I(q) = I(0)e^{\frac{-q^2 Rg^2}{3}}$$

Si se hace un ajuste lineal ( $\ln I(q)$ ) versus  $q^2$  se puede obtener directamente de la pendiente el valor del  $R_g$  y de la intersección con el eje y el valor de  $I(0)$ , proporcional al peso molecular y a la concentración de la proteína. El análisis de los gráficos de Guinier ( $I(q)$  vs  $q$  y  $\ln I(q)$  vs  $q^2$ ) aporta información respecto del estado de la muestra, por ejemplo, es sensible a la agregación y a la interferencia entre partículas viéndose reflejado en pendientes más pronunciadas o poco pronunciadas respectivamente.

Debido a las limitaciones de la aproximación de Guinier,  $R_g$  y  $I(0)$  suelen obtenerse también a partir de la transformada de Fourier de la intensidad de dispersión, a partir de la que se obtiene la función de distribuciones de distancia interatómica,  $P(r)$ , de la partícula dispersante. También se la suele llamar función de distribución de pares de distancia.  $P(r)$  describe la probabilidad de frecuencia de pares de distancias interatómicas ( $r$ ) en una proteína. El perfil que muestra el gráfico  $P(r)$  depende de la simetría de la partícula, así como de la estructura de los dominios por lo tanto aporta información respecto de la forma y el volumen ocupado por una partícula.  $P(r)$  es igual a cero cuando  $r=0$  y por encima de la dimensión máxima,  $D_{m\acute{a}x}$ . Por lo tanto, esta función nos aporta información de la distancia máxima y mínima en una proteína. En particular, las partículas globulares compactas tienen una función  $P(r)$  con forma de "campana" simétrica a  $D_{max}/2$ , mientras que las partículas multidominio presentan curvas con hombros y oscilaciones que se relacionan también con las distancias entre subunidades. Además, estos gráficos también aportan información respecto del estado de la muestra. Se espera que las distancias máximas de la partícula se aproximen a cero ( $D_{max}$ ) de manera cóncava sobre el eje horizontal. Si  $D_{max}$  llega a cero abruptamente entonces es un valor artificial, indicador de interferencia entre partículas. Muestras agregadas muestran una cola extendida en la curva a valores altos de  $r$  lo cual hace muy difícil determinar  $D_{max}$  o nunca se aproximan a cero.

Por último, el plegamiento de la proteína también puede estudiarse gráficamente a partir de los gráficos de Kratky  $I(q)*q^2$  vs.  $q$ . Proteínas plegadas globularmente presentan un pico a bajo  $q$ , típicamente la curva tiene forma acampanada, mientras que proteínas desplegadas muestran que el pico se "achata", con un continuo incremento  $I(q)*q^2$  con respecto a  $q$ .

Los ensayos para determinar la forma global de PdPV1 se hicieron en la línea D02A-SAXS2, en el laboratorio Nacional de Luz Síncrotron, Campinas (SP, Brazil). El patrón de dispersión

se detectó usando dispositivo MARCCD de carga bidimensional asistido por el software Fit2d (Hammersley 2016). Los experimentos se llevaron a cabo usando una longitud de onda de 1.448 Å. La distancia entre la muestra y el detector fue de 1044 mm, permitiendo un rango de Q entre 0.012 and 0.25 Å<sup>-1</sup> ( $D_{max}$  = 260 Å). La temperatura fue controlada usando un baño circulante que se mantuvo a 25 °C. Cada corrida se corrigió por la absorción de la muestra, el flujo de fotones, la dispersión del buffer y la homogeneidad del detector. Se colectaron 3 curvas independientes para cada experimento y se promediaron, luego se sustrajo la dispersión del buffer. Para descartar el efecto que pudiera causar la concentración de proteína, los experimentos se hicieron utilizando diferentes concentraciones de proteína, entre 3.0–0.2 mg/mL. El análisis de los datos se llevó a cabo usando el paquete ATSAS 2.6.0 (Petoukhov 2012). El modelo a baja resolución de PdPV1 se obtuvo promediando los 10 modelos que mejor se ajustaban a los datos experimentales utilizando los programas DAMMIN and DAMMIF (Svergun 1999). Los datos crudos de los experimentos fueron depositados en el banco de datos biológicos de dispersión a bajo ángulo SASBDB.

### 5.2.5 Espectroscopía de fluorescencia

La emisión de fluorescencia se observa cuando, después de la excitación, los electrones del estado excitado revierten al estado basal. Una de las características de la fluorescencia es que la longitud de onda a la que se excita el fluoróforo nunca es la misma a la que emite y por tanto los espectros de absorción y emisión nunca se solapan. Esto se debe a que durante la desexcitación parte de la energía se pierde y la emisión se da a longitudes de ondas mayores (menor energía).

La fluorescencia ocurre típicamente en moléculas aromáticas y, en las proteínas, está dada por la presencia de los residuos aromáticos. La emisión de fenilalanina (282 nm) es muy pequeña y puede ser despreciada. La emisión de la tirosina (304 nm) suele verse atenuada por transferencia de energía al triptófano. Por lo tanto, la fluorescencia de las proteínas depende típicamente del triptófano y suele considerarse para el estudio únicamente la contribución de este residuo que se excita a 295 nm y emite a 355 nm (Schmid 1989).

La fluorescencia depende sensiblemente del microambiente donde se encuentra el cromóforo y el análisis del espectro de fluorescencia nos permite, entonces, caracterizar

el entorno de los residuos aromáticos en las proteínas (Lakowicz 1999). Cuando los fluoróforos se encuentran en el estado excitado pueden sufrir varios procesos que interfieren con la señal de fluorescencia. Uno de ellos es la interacción con el solvente. Un solvente polar puede reorientar sus dipolos en función del fluoróforo excitado, esto lo estabiliza y por ende disminuye la energía del estado excitado, lo que se traduce en un corrimiento en el espectro hacia longitudes de onda mayores (*red shift*). Por tanto, el Trp puede utilizarse para monitorear cambios en la conformación de las proteínas observando los corrimientos hacia el rojo de la proteína desplegada. Otro fenómeno que ocurre es la atenuación de la intensidad de fluorescencia (*quenching*). Esto puede darse por contacto físico entre el fluoróforo y el quencher al cual se le transfiere la energía y no se observa fluorescencia. En el caso de las proteínas, el Trp se encuentra en el núcleo hidrofóbico de la proteína, pero cuando esta se desnaturaliza expone los triptófanos al solvente y por tanto al proceso de quenching. También puede haber quenching por la formación de complejos no fluorescentes. Otro de los procesos por los cuales se altera la señal de fluorescencia es debido a la transferencia de energía de resonancia (RET). Ocurre cuando el espectro de emisión de una molécula se solapa con el de absorción de otra. Cuando un fluoróforo es excitado y se encuentra cercano a una molécula a la cual puede transferirle su energía sin generación de luz se reduce la intensidad de la emisión por parte del donador. Los espectros de fluorescencia se obtuvieron en un espectrofluorómetro Varian Cary Eclipse. La longitud de onda de excitación fue de 295 nm y la emisión fue registrada entre 300 y 420 nm, con una apertura de 8 mm tanto para excitación como emisión y utilizando cubetas de cuarzo de 5 mm de paso óptico. Se registraron series de tres espectros independientes para cada muestra y el blanco. Los espectros individuales fueron promediados y corregidos por el blanco.

### **5.2.6 Estabilidad estructural de PdPV1**

El correcto plegamiento de la proteína es indispensable para su actividad ya que la función biológica está íntimamente relacionada a la estructura de la proteína. La estabilidad estructural de la PdPV1 se evaluó frente a los cambios de temperatura, de pH, GnHCl y presencia de SDS. Los cambios estructurales fueron analizados por alguna o una combinación de las siguientes técnicas: siguiendo la exposición del Trp al solvente

(fluorescencia), el cambio en el radio de giro  $R_g$  (SAXS), cambios en el espectro de absorbancia UV-Vis y su cuarta derivada y SDS-PAGE.

#### 5.2.6.1 Estabilidad térmica

Para los ensayos de estabilidad térmica se utilizaron 300  $\mu\text{L}$  de PdPV1 (0.28 g/L) en buffer  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM, NaCl 150mM, pH 7.0. La muestra fue sometida a incrementos discretos de temperatura desde los 25 °C hasta los 85 °C usando un baño termostático con un sistema de circulación de agua conectado al porta muestra. Los incrementos fueron de 5 °C y una vez alcanzada la temperatura deseada se las incubó durante 5 min antes de realizar las mediciones. La estructura de PdPV1 se monitoreo por espectroscopia de absorbancia (ver sección 5.2.4.) calculando la cuarta derivada del espectro y siguiendo las variaciones en el centro de masa (CM) con espectroscopia de fluorescencia (ver sección 5.2.6). El CM se calculó como:

$$CM = \frac{\sum(\lambda + F(\lambda))}{\sum F(\lambda)}$$

Los experimentos de SAXS se llevaron a cabo como en la sección 5.2.5. la temperatura del porta-muestra fue controlada usando un baño termostático de la misma manera como se describió más arriba. Por último, se ensayaron temperaturas extremas hirviendo a la proteína durante 15 min y evaluando la integridad del oligómero mediante PAGE-Nativo en condiciones nativas (sección 3.6.1.) y el espectro de absorción en la región UV-Visible de la muestra (sección 4.2.4.).

#### 5.2.6.2 Estabilidad frente a pH

Para los análisis de estabilidad conformacional de PdPV1 frente a distintos valores de pH, la PdPV1 (0.28 g/L) fue incubada durante una noche con soluciones buffer a distintos valores de pH, en un rango de pH de entre 2.0 y 12.0. Las soluciones a distinto pH fueron preparadas utilizando buffers de sales de fosfato de sodio y ácido cítrico (Deutscher 1990), cuyas composiciones se detallan a continuación:

- *Buffer* pH 2.0:  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0.1 M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.1 M.
- *Buffer* pH 4.0: Ácido cítrico 0.1 M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.1M.
- *Buffer* pH 6.0:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.1 M, NaOH hasta ajustar a pH 6.0.

- *Buffer* pH 8.0: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 M, NaOH hasta ajustar a pH 8.0.
- *Buffer* pH 10.0: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 M, NaOH hasta ajustar a pH 10.0.
- *Buffer* pH 12.0: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 M, NaOH hasta ajustar a pH 12.0.

La estructura terciaria de la proteína se monitorea por espectroscopia de absorción (ver sección 5.2.4) calculando la cuarta derivada del espectro y siguiendo el CM con espectroscopia de fluorescencia (ver sección 5.2.6). Los experimentos de SAXS se llevaron a cabo como en la sección 5.2.5. Todas las mediciones fueron realizadas a 25 °C.

### **5.2.6.3 Estabilidad cinética**

La desnaturalización inducida por SDS se utiliza para identificar proteínas cuya conformación nativa está atrapada cinéticamente en una conformación específica, debido a una inusualmente elevada barrera de desplegamiento, que resulta en tasas de desplegamiento muy lentas (Jayaprakash & Surolia 2017). Para testear la resistencia de PdPV1 a la desnaturalización por SDS, se llevó a cabo un experimento siguiendo el procedimiento de Manning & Colón (2004). La proteína en buffer Laemmli (pH 6.8) conteniendo 1% SDS se evaluó en dos formas: sin calentar o hervida por 10 min. Luego las muestras fueron analizadas por PAGE 4-20% y visualizadas usando Coomassie Brilliant Blue.

### **5.2.6.4 Desnaturalización por caótopo**

El proceso inverso del plegado es la desnaturalización, mediante el cual la proteína se despliega y queda limitada a una cadena lineal de aminoácidos sin estructura ni función. Se estudió la desnaturalización química de la proteína PdPV1 utilizando cloruro de guanidinio (GdnHCl) siguiendo la fluorescencia intrínseca del triptófano. Concentraciones crecientes de GdnHCl (0–6.5 M) en buffer Tris-HCl 20 mM se incubaron con las muestras (concentración final 0.15 g/L), pH 7.4. En este caso, las mediciones se hicieron con un espectrofluorómetro Fluorolog 3 Horiba a 25 °C. La fracción proteica plegada ( $f_u$ ) se calculó usando la intensidad de fluorescencia a 327.9 nm y asumiendo un proceso de desplegamiento de dos estados. En los modelos de dos estados, las proteínas pasan del estado nativo al desnaturalizado sin formar un intermediario y describen una curva sigmoidea. Se considera que la intensidad de señal a concentraciones bajas de caótopo se corresponde con la proteína en su estado nativo y se identifica como estado de pretransición, correspondiéndose con la primera meseta observada en el gráfico de intensidad en función



de la concentración de caótopo. Con los puntos de la meseta de pretransición se ajusta una recta. A medida que avanza el proceso de desnaturalización se llega a la zona de postransición que corresponde con la segunda meseta del gráfico y donde se considera que la proteína se encuentra completamente desnaturalizada. Nuevamente, con los puntos de la región de postransición se ajusta una recta. Estas rectas se utilizan ahora para calcular la fracción desnaturalizada  $f(u)$  a cada concentración de desnaturalizante como sigue. Considerando que  $f(n) + f(u)=1$ , para cada punto:

$$f(u) = \frac{Y_n - Y}{Y_n - Y_u}$$

Donde  $Y$  corresponde a la intensidad de señal, en este caso a 327.9 nm;  $Y_n$  es la intensidad de señal calculada a cada concentración de caótopo a partir de la recta de regresión trazada en la pretransición;  $Y_u$  es la intensidad de señal calculada a cada concentración de caótopo a partir de la recta de regresión trazada en la postransición.

El equilibrio alcanzado en cada concentración de GndHCl nos permitió calcular una constante de equilibrio  $K=f_u/(1-f_u)$  y la energía libre de Gibbs para la reacción de desplegado ( $\Delta G^0 = -RT \ln K$ ). La dependencia de  $\Delta G^0$  en función de la concentración de GndHCl se puede aproximar por la ecuación lineal  $\Delta G^0 = \Delta G^0_{H_2O} - m[GndHCl]$ , donde la energía libre de desplegado en ausencia de desnaturalizante ( $\Delta G^0_{H_2O}$ ) representa la estabilidad conformacional de la proteína. La concentración de GndHCl a la que la mitad de la proteína se encuentra desplegada ( $C_m$ ) se estimó como una función de la concentración de desnaturalizante usando el método de extrapolación de la función lineal.

## 5.2.7 Reactividad cruzada

### 5.2.7.1 Western blot

Se analizó la reactividad cruzada de PdPV1 con anticuerpos policlonales anti-PcOvo y anti-PsSC mediante Western Blot (WB). Los anticuerpos se prepararon según sección 3.8. Se corrieron tanto muestras de PdPV1 como de PcOvo y PsSC en PAGE-SDS 4-20%. Las proteínas separadas en los geles fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham Protran) usando un buffer Tris-HCl 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20% (v/v), pH 8.3 (Towbin et al.1977), utilizando un dispositivo para transferencia (Mini Transblot Cell,

Bio Rad Laboratories, Inc.) a 100 V durante 1 h. De esta manera se transfieren las proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa conservando el mismo patrón de separación. Para poder evaluar la eficiencia de transferencia se empleó un marcador de peso molecular coloreado *Precision Plus Dual Color Standards* (BioRad).

Luego de la transferencia, se bloqueó la membrana con Caseína 5% (p/v) durante una noche a 4 °C disuelta en PBS con Tween-20 5 ‰ (v/v) (PBST) de manera de evitar la unión inespecífica del anticuerpo primario a la membrana. Luego, la membrana se incubó con el anticuerpo policlonal correspondiente diluido en Caseína 3% (p/v) en PBST por 2 h. Finalmente, se preparó una solución del anticuerpo secundario comercial de cabra contra conejo conjugado con una peroxidasa de rabano picante (HRP) (BioRad Laboratories, Inc.) en caseína 3% (p/v) en PBST. Este se incubó durante 1 h con las membranas y la reacción fue revelada con luminol-cumárico (Sigma-Aldrich) (ver sección 5.2.7.2). Entre cada uno de los pasos se realizaron 3 lavados con PBST de 3 min cada uno y con agitación.

#### **5.2.7.2 Detección por quimioluminiscencia**

Se basa en la detección de la emisión de luz cuando una peroxidasa oxida un sustrato. En nuestro caso el sustrato utilizado fue el luminol (Sigma) diluido en DMSO. Para la preparación de la solución de revelado, se parte de las dos soluciones detalladas a continuación: Solución A: 50 µL de luminol 4.4 % (p/v) en DMSO, 22 µL de ácido p-cumárico 1.5 % (p/v) en DMSO, 333 µL de buffer Tris-HCl 1.5 M pH 8.5 y 4.595 µL de H<sub>2</sub>O bidestilada. Solución B: 3,2 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 333 µL de buffer Tris-HCl 1,5 M pH 8,5 y 4.665 µL de H<sub>2</sub>O bidestilada. En un cuarto oscuro se agregó el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de la solución B justo antes de su utilización, de inmediato se mezclaron las soluciones A y B en relación 1:1 (v/v) y se la incubó por 1 min con la membrana de nitrocelulosa. Posteriormente se secó la membrana, se la colocó en un *cassette* de exposición Mr Detail (AGFA Healthcare) y se expuso una placa radiográfica para rayos-X (AGFA Healthcare) entre 30 seg y 3 min, la cual fue luego revelada mediante procedimientos estándar.

### **5.2.8 Contenido de hidratos de carbono**

#### **5.2.8.1 Método de fenol-sulfúrico**

El contenido de glúcidos de PdPV1 se determinó siguiendo el método de fenol/sulfúrico descrito por (Dubois et al. 1956) usando D-glucosa (Sigma) como estándar. Las muestras

se diluyeron a una concentración final de 50 µg/mL (volumen final 150 µL). Todas las muestras fueron tratadas con una solución de fenol 5% y ácido sulfúrico concentrado. Después de 30 min a 37 °C se midió su absorbancia (ver sección 5.2.4) a 485 nm para poder determinar el contenido de hexosas y pentosas.

#### **5.2.8.2 Determinación del patrón de glicanos**

Como una primera aproximación para conocer el patrón de glicosilación de PdPV1 realizamos un ensayo de dot-blot con lectinas (*lectin dot blot*). Se utilizó un set de 13 lectinas biotiniladas, a saber: WGA, PSA, PNA, JAC, RCA 1, SBA, DBA, UEA, PVL, LCA, ECL y BSL 1 (Vector Labs,). Las lectinas fueron reconstituidas en buffer Hepes 10 mM, Cl<sub>2</sub>Ca 0.1 mM y después diluidas en BSA 3% (w/v) en PBS. Se incubaron 3 µg de PdPV1 con pipeta durante 30 min a temperatura ambiente sobre tiras de membrana de nitrocelulosa (Amersham Protran, GE Healthcare). Luego las membranas se bloquearon con BSA 3% (p/v) en PBS durante toda la noche a 4 °C e incubadas por 1.30 h con 0.02 mg de la lectina. Posteriormente, se incubaron durante 20 min a 25 °C con HRP conjugada con estreptavidina (Vector Labs) diluida 1:3 en agua. Entre medio de cada paso, las tiras de membrana se lavaron 5 veces con Tween 0.1% en PBS durante 3 min. Las reacciones positivas se visualizaron por electro-quimio-luminiscencia (ver sección 5.2.8.2) usando un sistema ABC (Vector Labs) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **5.2.9 Estructura primaria**

#### **5.2.9.1 Obtención de las secuencias de aminoácidos**

Se obtuvieron secuencias internas de aminoácidos de PdPV1 por espectrometría de masas en el CEQUIBIEM (UBA-CONICET, Argentina) como se describió en la sección 4.2.1. Las secuencias N-terminales de las subunidades se determinaron por degradación de Edman en el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios en Péptidos y Proteínas (LANAIS-PRO, UBA-CONICET, Argentina). Estas secuencias se usaron para buscar las secuencias aminoacídicas completas de las subunidades de la proteína a partir de secuencias traducidas de cDNA en el transcriptoma de la glándula del albumen de *P. diffusa* disponible en AmpuBase (<http://www.comp.hkbu.edu.hk/~db/AmpuBase/#&panel1-3>).

### 5.2.9.2 Análisis bioinformático

El alineamiento de las secuencias se llevó a cabo usando MUSCLE (Edgard 2004). Las secuencias de PdPV1 se analizaron usando PsiBlast, el servidor FFAS (Jaroszewski et al. 2005) y Hhpred (Söding et al. 2005). Se realizó una búsqueda en el sitio PROSITE en búsqueda de dominios conservados. Para hallar regiones de baja complejidad se usó el servidor SEG. Los sitios de clivaje del péptido señal en las secuencias aminoacídicas se predijeron usando el servidor SignalP 4.1. La masa molecular teórica y el punto isoeléctrico de cada subunidad madura se estimaron usando la herramienta ProtParam del servidor ExPASy. Los potenciales sitios de fosforilación y glicosilación se predijeron con los servidores DISPHOS 1.3 (Iakoucheva et al. 2004b) y NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>) and NetOGlyc 4.0 (Steentoft 2013) respectivamente. Las secuencias de las subunidades de PdPV1, PsSC, PcOvo y PmPV1 se sometieron a análisis filogenético usando el método de verosimilitud máxima usando MEGA X (Kumar 2018).

### 5.2.10 Resistencia a la digestión por proteasas

#### 5.2.10.1 Ensayos *in vitro*

Se simuló el ambiente del tracto digestivo *in vitro* para evaluar la resistencia de la proteína a la degradación por proteasas digestivas siguiendo la metodología descrita por Moreno et al. (2005). Se sometió a la PdPV1 purificada (105 µg) en buffer fosfato a una digestión pepsina (Sigma Aldrich) en una relación enzima:sustrato 1:20 (p/p), a 37 °C en un fluido gástrico simulado (SGF) el cual contiene NaCl 150 mM, pH 2.5. Se usó BSA en presencia o ausencia de enzima como control positivo y negativo, respectivamente. Se tomaron alícuotas de la muestra y del control luego de 60 y 120 min de incubación. Para detener la reacción, el pH se elevó a 8.5 con buffer 150 mM Tris-Cl y las muestras se mantuvieron a -20 °C hasta su procesamiento. Para simular la fase intestinal, al remanente de las soluciones se les ajustó el pH a 7.5 con NaOH 0.1 M, se les agregó 0.25 M de ácido taurocólico (Sigma Aldrich) en buffer Tris-HCl 0.15 M, pH 7.5 y se incubó con tripsina en una relación enzima:sustrato 1:27 (p/p), a 37 °C. Se tomaron alícuotas de las muestras y del control a los mismos tiempos que en la fase gástrica y se almacenaron a -20 °C.

Finalmente, todas las muestras se hirvieron a 100 °C durante 10 min y se corrieron en PAGE-SDS 4-20% para chequear la integridad de las proteínas.

#### **5.2.10.2 Ensayos *in vivo***

Para evaluar la resistencia de PdPV1 a la digestión gastrointestinal *in vivo*, se utilizaron ratones hembra, *Mus musculus* de la cepa BALB/c AnN, de un peso promedio de  $16 \pm 1,1$  g, obtenidos de los laboratorios de animales experimentales de la facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP). Los animales se mantuvieron en el bioterio de la Facultad de Ciencias Médicas, con un ciclo luz:oscuridad de 12:12. Previo y durante los experimentos se les alimentó ad libitum.

A los animales se les administró por vía oral 0.6 mg de PdPV1 en buffer 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl y se recolectaron sus heces cada hora durante 8 h después de la administración y se congelaron hasta su análisis. Los ratones control fueron administrados únicamente con buffer. Aproximadamente 0.12 g de heces fueron resuspendidos en 500 µL de EDTA 30 mM, pH 8.4 en PBS con inhibidores de proteasas 1:100 (Sigma- Aldrich).y se les dejó hidratar durante 10 min. Luego las muestras fueron homogeneizadas en un homogeneizador de teflón antes de ser centrifugado a 13000 xg a 4 °C durante 10 min. Se descartaron los pellets y se determinó la concentración total de proteína. La presencia de PdPV1 sin digerir en los extractos fecales se estimó por PAGE-Nativo 4-20% y teñido con Coomassie Brilliant Blue (ver sección 3.6.1 y 3.6.3). Se realizó un western blot para confirmar la identidad de las bandas proteicas como en la sección 5.2.8, usando anticuerpos anti-PsSC (ver sección 3.8).

### **5.2.11 Caracterización de la actividad lectina**

#### **5.2.11.1 Ensayos de hemaglutinación**

La estructura multivalente de la mayoría de las lectinas les permite aglutinar células. Dadas estas propiedades, una forma clásica de evaluar la presencia de lectinas es por medio de un ensayo de hemaglutinación, donde se analiza la capacidad de una muestra biológica de aglutinar glóbulos rojos formando redes visibles al ojo desnudo (Nathan & Halina 2007). La capacidad hemaglutinante de PdPV1 se testeó usando eritrocitos de conejo, humano, cabra, caballo, rata y ave. Las células se obtuvieron de las instalaciones de la Universidad de La Plata (UNLP). Los conejos se sangraron por punción cardiaca y se colectó en EDTA

sódica 300 mM en condiciones estériles. Los eritrocitos de humano (RBC) de tipo A, B y O de pacientes saludables fueron donados por el Instituto de Hematología (Ministerio de Salud, Provincia de Buenos Aires, Argentina).

Previamente a su uso, los eritrocitos se lavaron por centrifugación a 1500 xg durante 10 min en buffer PBS (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH =7.4). Este procedimiento se repitió varias veces hasta que el sobrenadante quedo limpio. La actividad hemaglutinante se ensayó usando placas U microtiter (Greiner Bio One, Germany). Se incubaron 50 µL de diluciones seriadas en base dos de PdPV1 con un volumen igual de eritrocitos 2% (v/v) en PBS. La concentración inicial de proteína fue de 0.4 mg/mL. Los resultados obtenidos se expresaron como la menor concentración proteica a la cual se observa hemaglutinación a ojo desnudo.

#### ***5.2.11.2 Inhibición de la hemaglutinación***

Como primer paso para caracterizar la actividad lectina de PdPV1, se determinó su afinidad por diferentes hidratos de carbono, que se infirió a partir de la inhibición de su actividad hemaglutinante por competencia con varios monosacáridos. Los azucares utilizados fueron fucosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, glucosamina, galactosamina, manosa, galactosa y glucosa. Se hicieron diluciones seriadas en base dos de PdPV1 purificada empezando por 0.4 mg/mL en 200 mM de cada uno de los hidratos de carbono mencionados. Se incubaron durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, se les adicionó una suspensión de 50 µL de eritrocitos de conejo 2% en PBS en una microplaca con pocillos en forma de U y luego de 2 h se verificó la actividad hemaglutinante de PdPV1 sobre estos eritrocitos. La capacidad inhibitoria se expresó como un porcentaje de inhibición, comparando el título de aglutinación de PdPV1 sin inhibidor:

$$\text{Inhibicion (\%)} = 100 - \frac{Ti * 100}{T}$$

Donde T representa el título de hemaglutinación de PdPV1 sin inhibidor t *Ti* el titulo con inhibidor.

En algunos de los experimentos, los eritrocitos fueron pretratados con tripsina (Sigma-Aldrich) o con neuraminidasa (BioLabs) antes de los ensayos de hemaglutinación. En el primer caso, se incubaron 100 µL de eritrocitos de conejo con 200 µL de una solución de

tripsina 0.1 mg/mL en PBS a 37 °C durante 90 min. Para el tratamiento con neuraminidasa, se incubó 1 mL de eritrocitos de conejo con 2 mL de la enzima 0.1 U/mL en PBS a 37 °C durante 60 min. Luego de las incubaciones, los eritrocitos se lavaron 4 veces con PBS centrifugando a 500 xg y se utilizaron en ensayos de hemaglutinación como se describió anteriormente.

#### **5.2.11.3 Especificidad de unión a glicanos**

La especificidad de unión de PdPV1 por diferentes glicanos se evaluó mediante un microarreglo de glicanos en el Core H del consorcio de glicómica funcional (<http://www.functionalglycomics.org>, Emory University, Atlanta, GA, USA). Para los ensayos, la proteína se marcó fluorescentemente con Alexa 488 de la manera descrita en la sección 4.2.2. La proteína PdPV1 marcada se testeó en un microarreglo de glicanos el cual comprende 585 glicanos blanco (glycan array, versión 5.4). El experimento y los datos se analizaron como en la sección 4.2.4.

#### **5.2.12 Neurotoxicidad en roedores**

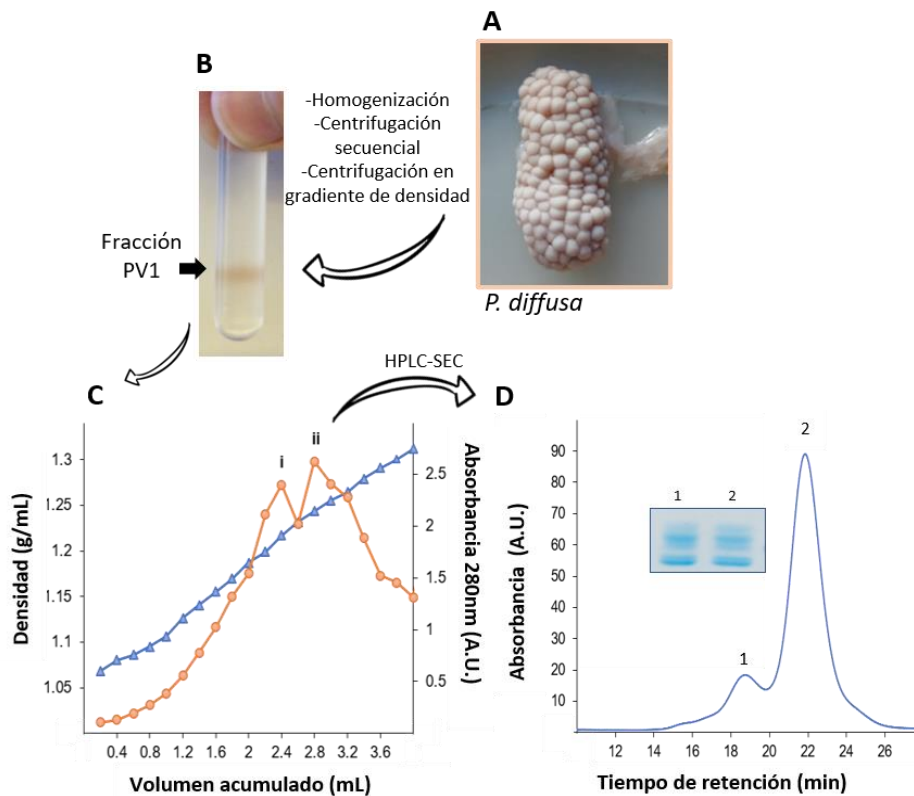
Para evaluar si los huevos de *P. diffusa* contienen toxinas del tipo PV2 reportada en otras especies de *Pomacea* (Giglio et al. 2016; Heras et al. 2008, Giglio et al. 2020), grupos de 5 ratones hembras *Mus musculus* de la cepa BALB/c AnN, se inyectaron intraperitonealmente ya sea con 200 µL de PBS o 4.6 mg/kg (200 µL) de ESF. Se observó el comportamiento de los animales durante el transcurso de 96 h. Se le prestó especial atención a la posible presencia de aquellos signos ya reportados tras la inyección de las toxinas de *P. canaliculata* y *P. maculata* incluyendo letargia, debilidad, taquipnea, pelo hirsuto, parálisis del tren posterior y movimientos espásticos de los músculos de la cola.

### **5.3 Resultados**

#### **5.3.1 Estructura de PdPV1**

El método de aislamiento y purificación de PdPV1 se basó principalmente en una combinación de ultracentrifugación y HPLC (Fig. 14 A-D). Luego de la ultracentrifugación en gradiente de NaBr de la fracción soluble del huevo, se obtuvieron dos fracciones proteicas. Una de ellas no mostró coloración, con una densidad aproximada de ~1.22 g/mL

mientras que la otra presentó una coloración rosa pálido y una densidad de  $\sim 1.24$  g/mL (Fig 14 C). La fracción coloreada se sometió a SEC y se observaron dos picos en el cromatograma (Fig 14 D). El pico mayoritario corresponde a la carotenoproteína a la que nombramos PdPV1, mientras que el pico con menor tiempo de retención corresponde al agregado de PdPV1. Esto fue confirmado por PAGE-SDS, al observar que ambos picos presentan la misma composición apoproteica (Fig 14 D inset).

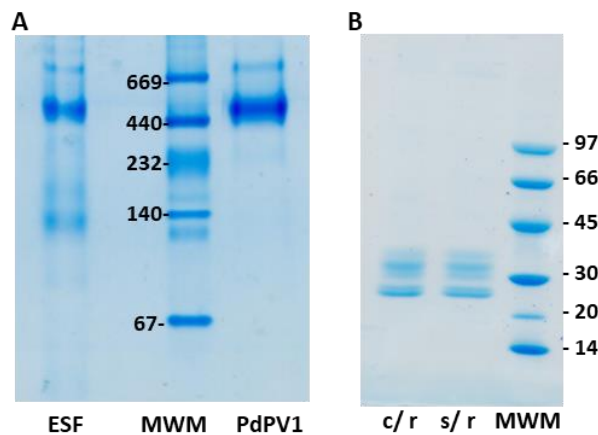


**Figura 14. Esquema de purificación de la PdPV1.** **A.** Puesta de *P. diffusa* a partir de la que se realiza la homogenización. **B.** Resultado de la ultracentrifugación en gradiente de densidad en NaBr en el cual se observa una banda coloreada en el tubo que corresponde a la fracción PV1. **C.** Densidad de hidratación (triángulos azules) y perfil de absorción a 280 nm (círculos naranjas) de la fracción soluble de huevo. Fracción (i) sin color (ii) coloreada. **D.** Cromatograma típico de la purificación por SEC de la fracción coloreada. (1) agregado de PdPV1 (2) PdPV1 purificada. **Inset:** PAGE-SDS de los picos 1 y 2 mostrando la misma composición apoproteica.

El análisis de la ESF de *P. diffusa* por PAGE-Nativo mostró que PdPV1 es la proteína más abundante del FPV, representando casi el 60% del total de proteína del huevo (Fig 15 A). El peso molecular de la partícula fue estimado por SEC y PAGE-Nativo. En el primer caso, se arribó a un resultado de 256 kDa mientras que el peso molecular aparente estimado por PAGE-Nativo fue de  $\sim 470$  kDa (Fig 15 A). PdPV1 está compuesta por 6 subunidades cuyo



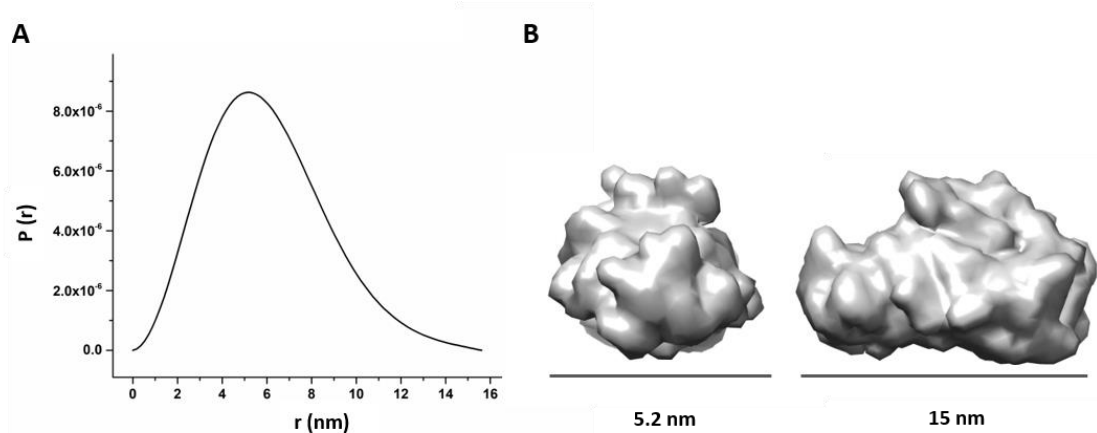
peso aproximado, estimado *in silico* y por PAGE-SDS en condiciones reductoras (Fig 15 B), fue de 23, 25, 29, 30 y 33 KDa. Estas subunidades no se encuentran unidas por puentes



**Figura 15. Purificación de PdPV1.** A. PAGE-Nativo de la fracción soluble de huevo (**ESF**) y PdPV1 purificada. **MWM**: estandar de alto peso molecular (KDa). B. PAGE-SDS de PdPV1 con reductor (**c/r**) y sin reductor (**s/r**). **MWM**: estándar de bajo peso molecular (KDa).

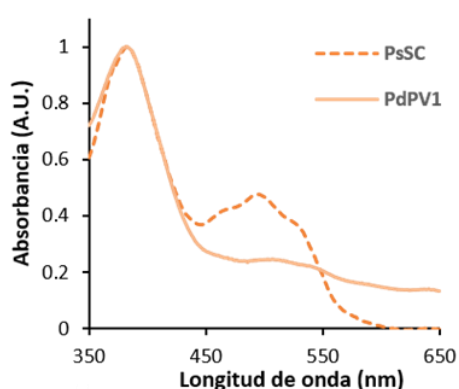
disulfuro como se infiere del análisis mediante SDS-PAGE hecho en condiciones reductoras y no reductoras, el cual no mostró diferencia alguna con el anterior.

Los estudios por SAXS mostraron para PdPV1 un  $R_g$  de 4.5 nm, estimado a partir de los gráficos de Guinier. En cuanto a su forma, los gráficos de Kratky indican que es una proteína globular. Mientras que su distribución de pares de distancias  $P(r)$  indica que presenta una forma elongada, anisométrica, con un eje mayor de 15 nm y uno menor de 5.2nm (Fig. 16 A). A partir de los datos de SAXS se pudo elaborar un modelo de baja resolución que se muestra en la figura 16 B. Los datos de estos experimentos se depositaron en el repositorio SASBDB (<https://www.sasbdb.org/data> Accession Code SASDG75).



**Figura 16. Experimentos de SAXS con PdPV1.** A. gráfico de distribución de pares de distancia  $P(r)$ . B. Modelo de baja resolución de PdPV1

El espectro de absorción de PdPV1 presenta las bandas características de los carotenoides en la región UV-Visible del espectro (Fig 17) que, a diferencia del resto de las especies del género, muestra un único máximo de absorción a 382 nm de baja intensidad, lo que se relaciona con la baja intensidad de color observada para esta proteína. Los máximos de absorción de las PV1 de las distintas especies se comparan en la Tabla 3.



**Tabla 3. Máximos de absorción presentes en la región visible del espectro de las distintas especies de *Pomacea*.**

Carotenoproteína	Máximo de absorción (nm)
PcOvo ( <i>P. canaliculata</i> )	427, 510, 545*
PmPV1 ( <i>P. maculata</i> )	430, 504**
PsSC ( <i>P. scalaris</i> )	383, 525***
PdPV1 ( <i>P. diffusa</i> )	382

\*Tomado de Cheesman, 1958

\*\* Tomado de Pasquevich, 2014

\*\*\* Tomado de Ituarte, 2008

**Figura 17. Análisis del espectro de absorción de PdPV1.** Espectro de absorción UV-visible de PdPV1 (línea completa) comparado con el de PsSC (línea punteada). Las comparaciones con las demás especies se muestran en la tabla 3.

En cuanto a la glicosilación de PdPV1, su contenido total de hidratos de carbono fue de 8.9%. El patrón de glicosilación fue inferido por un ensayo de lectin-dot-blot (Tabla 4). La ausencia de reactividad con PSA junto con la reacción positiva frente a Con A sugieren la presencia de glicanos con núcleo de trimanosidos. DBA, SBA y PNA dieron resultados positivos indicando la presencia de galactósidos. PdPV1 presenta así mismo el antígeno T no sustituido como lo sugiere la reacción positiva frente a PNA.

Secuencias internas, obtenidas por espectrometría de masas, junto con secuencias N-terminales de PdPV1 (Tabla S1) se usaron para identificar las secuencias completas de las 6 subunidades de PdPV1 en el transcriptoma de la glándula del albumen de *P. diffusa* (Ip et al. 2018). Se nombró a cada una de las secuencias como PdPV1-1 a 6 (Fig. 18 A). El

**Tabla 4. Acrónimos y especificidad de las lectinas utilizadas en el reconocimiento de los oligosacáridos de PdPV1. Se presenta una comparación con la lectina PsSC**

Acrónimo	Afinidad	PsSC	PdPV1
<b>Con A</b>	Man $\alpha$ 3[Man $\alpha$ 6] man, $\alpha$ Man terminal; N-glicanos tipo oligomanosa; N-glicanos tipo híbridos	+	+
<b>WGA</b>	Neu5Ac $\alpha$ 3/6/8 R	+	+
<b>PSA</b>	N-acetil quitobiosa unida a Fuc	-	-
<b>PNA</b>	Gal $\beta$ 13-GalNAc terminal	+	+
<b>JAC</b>	GalNAc	+	+
<b>RCA 1</b>	$\beta$ Gal terminal	+	+
<b>SBA</b>	Antígeno Tn, $\alpha$ GalNAc terminal	+	+
<b>DBA</b>	GalNAc $\alpha$ 1,3 GalNAc/Gal	+	+
<b>UEA</b>	$\alpha$ (1,2) L-Fuc	+	+
<b>PVL</b>	GlcNAc Neu5Ac $\alpha$ 26-Gal	+	-
<b>LCA</b>	N-glicanos del tipo complejo bi y triantenarios	-	+
<b>ECL</b>	LacNAc terminal	+	-
<b>BSL 1</b>	$\alpha$ GalNAc $\alpha$ Gal	+	+

alineamiento de secuencia hecho con MUSCLE de las 6 subunidades de PdPV1 se muestra en Fig. 18 B. El análisis bioinformático de las secuencias de aminoácidos obtenidas indica que todas ellas presentan péptido señal y una masa molecular teórica de alrededor de 21 kDa en concordancia con lo estimado por PAGE-SDS.

Todas las subunidades poseen al menos un sitio de fosforilación potencial. PdPV1-1 pareciera tener 4 Tyr fosforiladas (50%). PdPV1-2 presenta 1 Ser, 2 Thr y 3 Tyr. Para PdPV1-3 se predicen 2 Thr y 1 Tyr fosforiladas. En el caso de PdPV1-4 se predicen 1 Ser y 1 Tyr mientras que para PdPV1-5 únicamente 2 Ser (Fig. 18 A). Finalmente, PdPV1-6 presentaría 1 Thr y 2 Tyr. Respecto del análisis de los potenciales sitios de glicosilación de la proteína, mientras que las 6 subunidades presentan al menos un sitio de N-glicosilación, los sitios predichos para la O-glicosilación están presentes únicamente en PdPV1-4, PdPV1-5 y PdPV1-6 (Fig. 18 A).

La utilización del servidor SEG nos permitió determinar que PdPV1 no presenta regiones de baja complejidad. Tampoco se encontraron dominios conservados en su estructura

como lo indica el análisis realizado usando PROSITE. Mas aún, cuando se realizó un análisis de las secuencias mediante BLAST y PsiBlast contra la base de datos no redundante del NCBI en búsqueda de homólogos distantes, no se encontraron homologías con proteínas conocidas, excepto con las demás perivitelininas del mismo género *Pomacea*. Además, no se pudo encontrar homología de secuencia con ninguna lectina conocida a excepción de PsSC de la especie *P. scalaris*.

## A

### PdPV1-1 (Pdi37843\_c0\_g1)

MFVATSLLLALATLVATVASKDEYLIMEINPPKKVSEQEILNMLSPLEIKHKFRVTGTTKLWIVIKLDPVGYMKLDNITVP  
GKVSVTPAEDMVDTMQKFGVFWPQASLTEENITLQSHSYLTDVTKEQLTAMMVGYGEHMVETLKSHPYQFYRAT  
GVTPHKHFFFVSSARDEVEVIGREGVDIWWGGPG<sup>Y</sup>EHVKPEYLIRI

AA: 201 MW: 22751.41 pl: 5.8

### PdPV1-2 (Pdi37785\_c0\_g1)

MAEHRIPVFLFLVVVAASSLAQMLPHQKYIIYEVKDKSEKSPQEIRDEMKDTEVL<sup>Y</sup>SFKALGAPSYQIVVEVNSLNLRKLE  
EVELKGKTKMVPVDMFDLAKTLGVTWRYCAHLADTNLTLVERTLPLEGLTTQ<sup>S</sup>RAHLKGFMEI<sup>K</sup>DSFQKYSYRAF  
YTNGSSPPKMYI<sup>Y</sup>INIPLDEVD<sup>D</sup>FASKGTNLFGGPG<sup>Y</sup>ALY<sup>T</sup>SASFISSFPK

AA: 209 MW: 23699.31 pl: 6.11

### PdPV1-3 (Pdi14773\_c0\_g1)

MYALAIALLAFSTFVSNAIARQEYLLLDIIEASTQEINTALSDIEIELKFKIKGTSRHLIVVKQNDLNLEKLAKIDIPGKSKPTPL  
QDMADLMEEIGVGWPKRELTNVNVTLFERTLNLEDRTMEQ<sup>Y</sup>MSEKMAYGQLITPLLSSYSYRAFKANGAYPPKIYFFI  
NIPRQNLDDASNTGIDVLLGGPG<sup>N</sup>ART<sup>T</sup>SVQYLTKLS

AA: 199 MW: 22340.76 pl: 5.54

### PdPV1-4 (Pdi33234\_c0\_g1)

VLLLAMSTLLTRVEMKEDSLVYLEVDSGNSEENLITFQ<sup>N</sup>RSIIPRGFSGKKVGT<sup>S</sup>TFFAVLREPD<sup>L</sup>ARMNLKDVNEITP  
VIQLEERINLKVWWPLHRDINTELWLFKVSPILKQQLQ<sup>Y</sup>EAL<sup>K</sup>HLIRTVASVKQT<sup>F</sup>CHR<sup>V</sup>YISKGSFPPKFYIFVN  
KEKDLFKAFINALNIFGGPG<sup>S</sup>TNVEASYVHILLR

AA: 196 MW: 22563.21 pl: 8.95

### PdPV1-5 (Pdi118877\_c0\_g1)

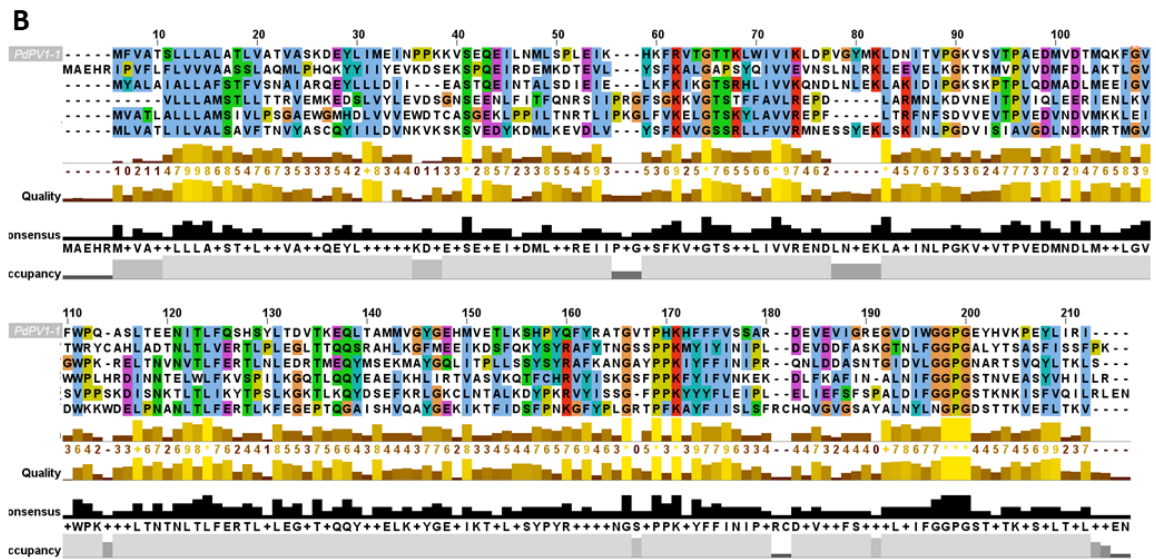
MVATLALLLAMSIVLPSGAEWGMHDLVVVEWDTCASGEKLPPILTNRTLIPKGLFVKELGTSKYLAVVREPFLTRFNFS  
DVVEVTPVEDVNDVMKKEI<sup>S</sup>VPPSKDISN<sup>K</sup>TLTIK<sup>Y</sup>TP<sup>S</sup>LK<sup>G</sup>KT<sup>L</sup>KQYDSEFKRLGKCLNTALKDYPKRVYISSGFPPKY  
YFLEIPLELIEFSFSPALDIFGGPG<sup>S</sup>TKNKISFVQILRLN

AA: 203 MW: 22783.74 pl: 8.72

### PdPV1-6 (Pdi67619\_c0\_g1)

MLVATLILVALSAVFTNVYASCQYIILDVNVKVKSKSVEDYKDMLEKVDLVYSFKVVGSSRLLFVVRMNESS<sup>Y</sup>EKLSKINLP  
GDVISIAVGLNDKMRMTMGVDWKKWDEL<sup>P</sup>ANLTLFERTLKFEGEPTQGAISHVQAYGEKIKTFIDSPNKGFYPLGR  
TPFKAYFIISLFRCHQVGVGSAYALNYLNGPG<sup>D</sup>ST<sup>T</sup>KVEFLTKV

AA: 204 MW: 20786.94 pl: 8.72



**Figura 18. Análisis bioinformático de las secuencias de PdPV1.** A. Secuencias de aminoácidos deducidas de las 6 subunidades. Los posibles péptidos señal se marcan en *itálica* y subrayados. Los potenciales sitios de fosforilación se marcan en **negrita** y subrayados, los potenciales sitios de N y O glicosilación están marcados en **negrita** o **recuadrados en negro** respectivamente. En rojo se resalta una secuencia conservada. B. Alineamiento múltiple de las secuencias de PdPV1.

### 5.3.2 Relaciones filogenéticas

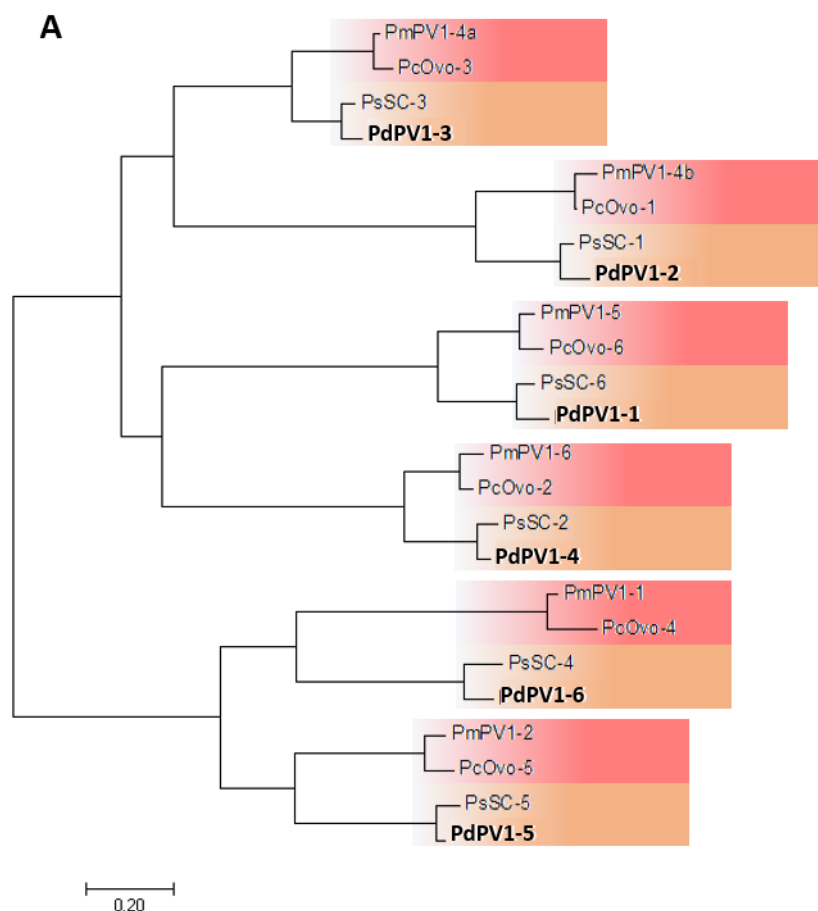
Las comparaciones de las secuencias aminoacídicas de PdPV1 con las de los ortólogos indica que hay una elevada similitud de secuencia entre ellas (Tabla 5). Se llevó a cabo un

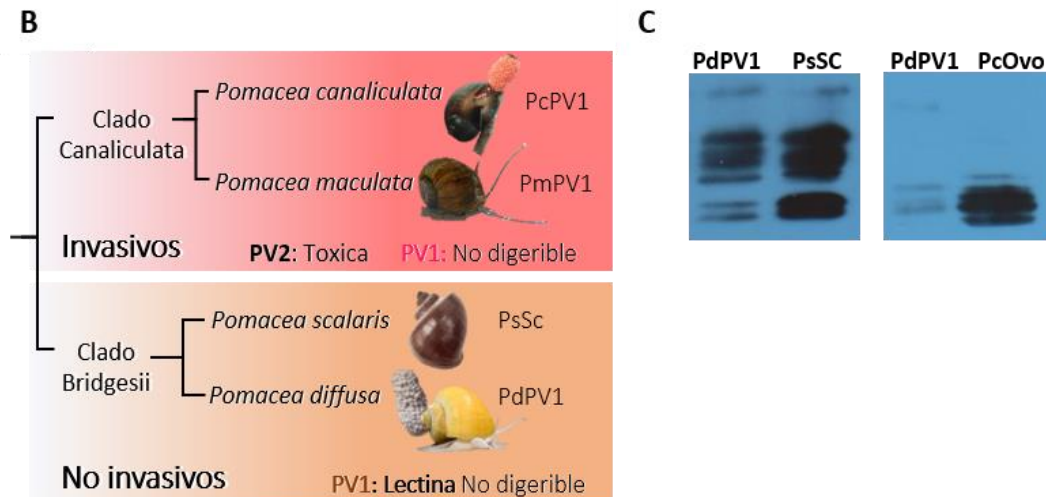
**Tabla 5. Identidad de secuencia entre las diferentes subunidades de las PV1 de *Pomacea*.**

Subunidad	Identidad de secuencia%		
	<i>P. scalaris</i>	<i>P. canaliculata</i>	<i>P. maculata</i>
PdPV1- 1* (pdi37843_c0_g1)	91% AWM63114.1	64% AFQ23940.1	61% APQ37931.1
PdPV1- 2 (pdi37785_c0_g1)	91% AWM63115.1	69% AFQ23938.1	68% AUI40900.1
PdPV1- 3* (pdi14773_c0_g1)	93% AWM63116.1	68% AFQ23939.1	70% APQ37930.1
PdPV1- 4 (pdi33234_c0_g1)	84% AWM63117.1	41% AFQ23945.1	46% APQ37928.1
PdPV1- 5* (pdi118877_c0_g1)	93% AWM63118.1	54% AFQ23937.1	56% APQ37929.1
PdPV1- 6 (pdi67619_c0_g1)	90% AWM63119.1	65% AFQ23937.1	65% AUI899.1

análisis filogenético con las secuencias disponibles de las subunidades de las cuatro perivitelinas del género *Pomacea* estudiadas hasta el momento (Fig. 19 A). Dicho análisis indica que las subunidades de PdPV1 no se agrupan juntas, sino que, por el contrario, cada una se agrupa con las subunidades ortólogas correspondientes de las demás especies, en seis grupos separados. A su vez, cada uno de estos seis agrupamientos se separa en dos nuevos grupos que corresponden al clado bridgesii y clado canaliculata (Fig. 19 B). Sin embargo, entre las subunidades de PdPV1, la similitud de secuencia es significativamente más baja que con las secuencias de sus ortólogos.

La reactividad cruzada entre PdPV1, PcOvo y PsSC se evaluó por ensayos de WB con el objetivo de reconocer si existen diferencias estructurales entre proteínas de los distintos clados. Los anticuerpos policlonales anti-PsSC reconocieron fuertemente cada una de las 6 subunidades de PdPV1, mientras que los anticuerpos policlonales anti PcOvo reaccionaron débilmente y solo con algunas subunidades de la proteína en estudio (Fig 19 C).





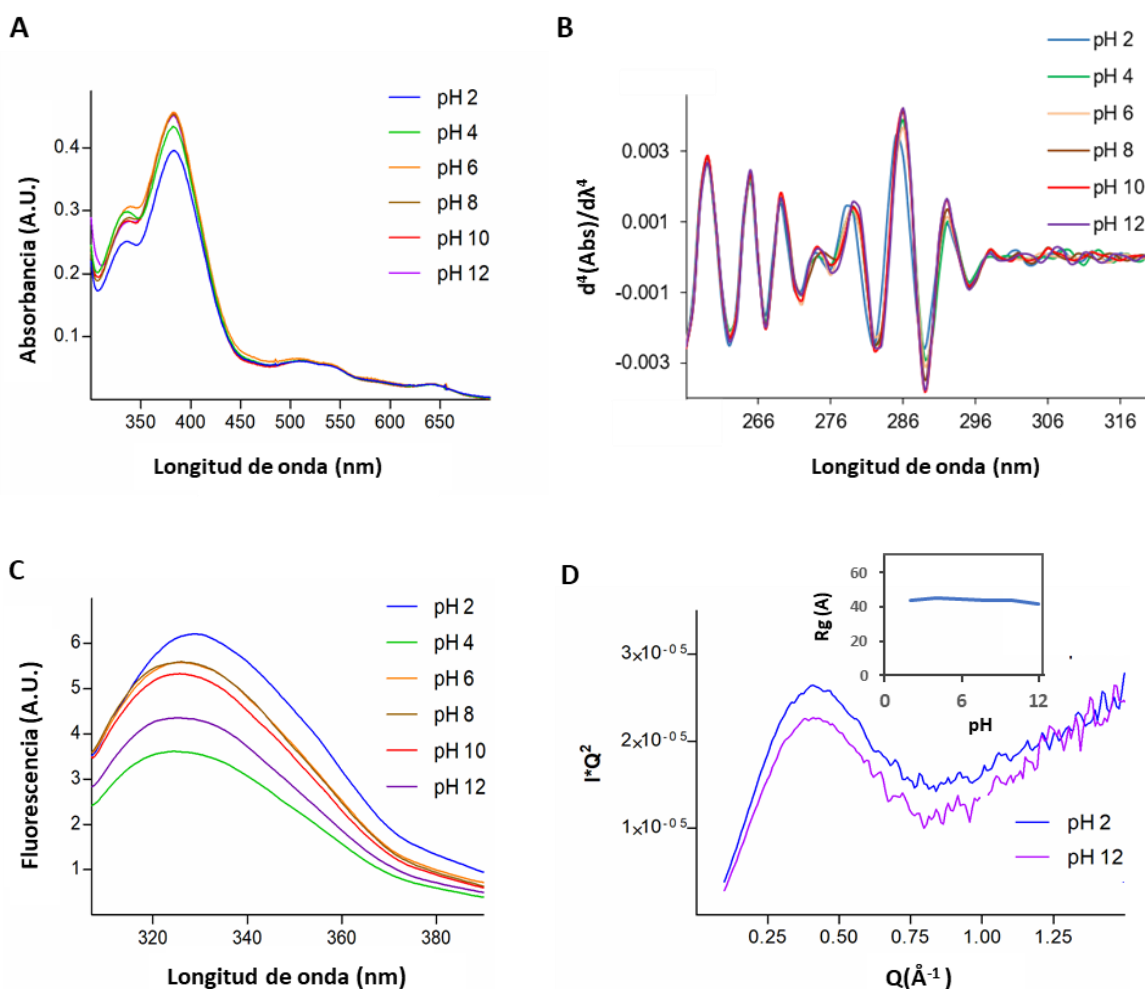
**Figura 19. Filogenia de las subunidades de las PV1 vs filogenia basada en morfología de los clados Canaliculata y Bridgesii. A.** Cladograma de máxima verosimilitud obtenido con RAxML bajo el mejor modelo de partición para las perivitelinas PV1 de *Pomacea*. Los valores en los nodos representan los porcentajes de Bootstrap bajo el mejor modelo de partición usando RAxML (BPRaxML) y IQ-TREE (BPIQ-TREE) y las probabilidades posteriores de los clados bajo el mejor modelo de partición usando MrBayes (PPMrBayes) y el modelo mixto de CAT-GTR usando PhyloBayes (PPPHyloBayes). En negrita se remarcan las subunidades de PdPV1. **B.** Representación de los clados canaliculata y bridgesii (tomado de Hayes, 2009) indicando las especies estudiadas, su invasividad y parte de las defensas presentes en cada clado. **C.** Reactividad cruzada de PdPV1 empleando los anticuerpos policlonales anti-PsSC (izquierda) y anti-PcOvo (derecha)

### 5.3.3 Estabilidad estructural

#### 5.3.3.1 Estabilidad a diferentes pH

La estabilidad estructural de PdPV1 a diferentes pH se monitoreó por espectroscopía de fluorescencia, absorción y SAXS. Tanto mediante espectroscopia de fluorescencia como de absorción se vio que PdPV1 permanece inalterada a excepción de pH 2.0, donde la proteína altera parcialmente su conformación como se observa por un decaimiento en la intensidad de absorción en la región visible del espectro donde absorbe el carotenoide (Fig 20 A), al igual que un corrimiento hacia el azul en la cuarta derivada del espectro (Fig 20 B). En el rango de pH estudiado, no se observan cambios en el espectro de emisión de fluorescencia del triptófano (Fig 20 C), indicando que la proteína permanece plegada correctamente hasta pH 2 en el que ya se observa un corrimiento hacia el rojo del máximo de emisión. No obstante, los cambios registrados a pH 2.0 deben ser considerados alteraciones menores en la estructura de la proteína debido a que los experimentos de SAXS muestran que la proteína permanece globular en el rango de pH 2.0 a 12.0 inclusive (Fig 20 D), no

observándose tampoco cambios en su  $R_g$  a excepción de una pequeña reducción a pH 12.0 (Fig. 20 D, inset).



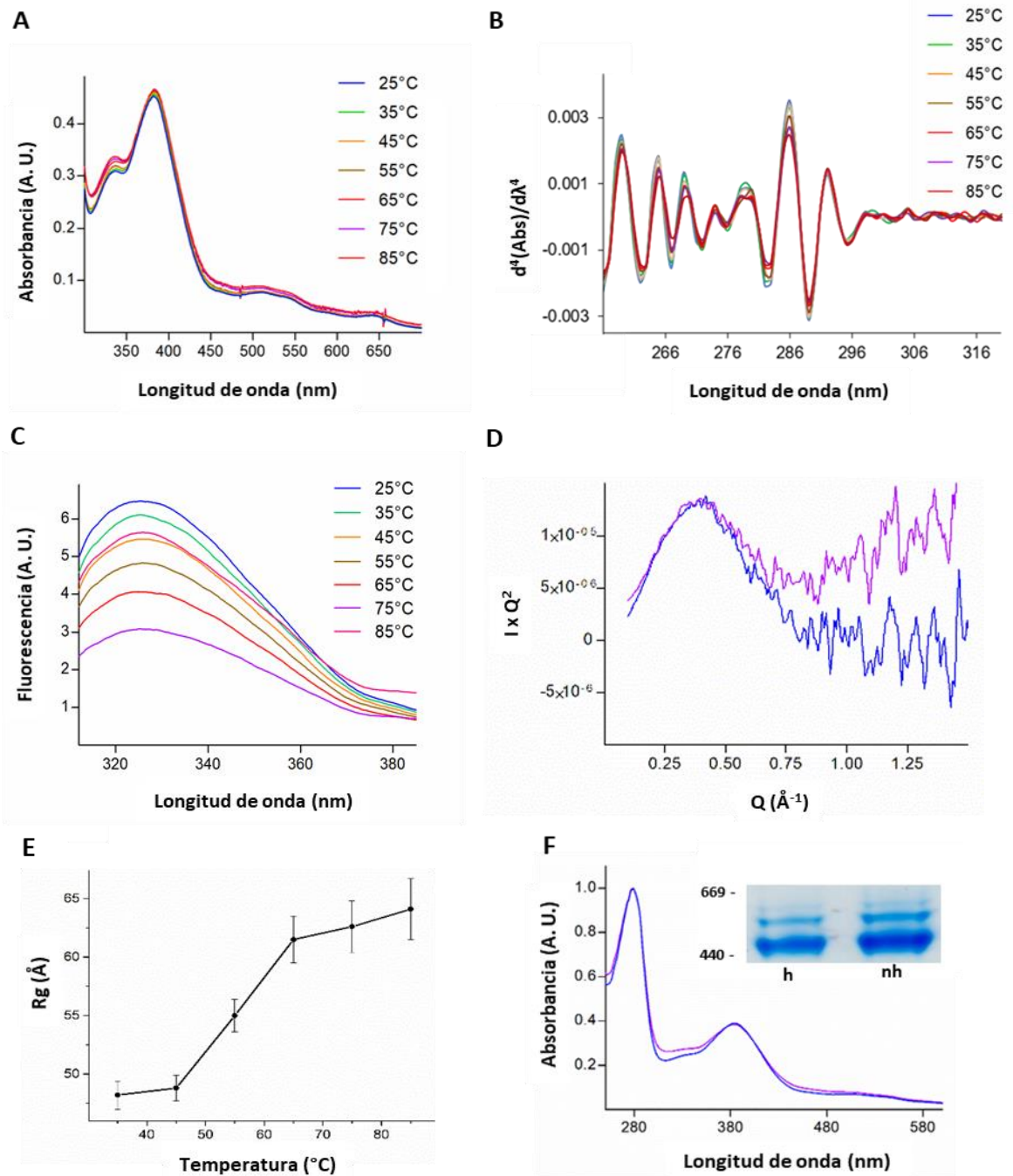
**Figura 20. Efecto del pH sobre la estabilidad estructural de PdPV1.** **A.** Espectro de absorción en la región visible del espectro a distintos pH **B.** Cuarta derivada del espectro de absorción. **C.** Espectro de emisión de fluorescencia a distintos pH. **D.** Gráficos de Kratky de PdPV1 a pH 2.0 (azul) y 12.0 (violeta), inset: radio de giro de PdPV1 a distintos pH.

### 5.3.3.2 Estabilidad térmica

La estabilidad estructural de PdPV1 a temperaturas crecientes (25 °C a 80 °C) se monitoreó por espectroscopía de fluorescencia, absorción y SAXS. No se observaron perturbaciones de la estructura terciaria en las condiciones ensayadas ni por espectroscopia de absorción (Fig. 21 A y B), Ni de fluorescencia (Fig. 21 C). Esto indica que la proteína es estable hasta los 85 °C respaldado por los datos de SAXS, aunque mediante esta técnica se observa una pérdida parcial de la globularidad (Fig. 21 D), asociada a un leve incremento en el  $R_g$  de la



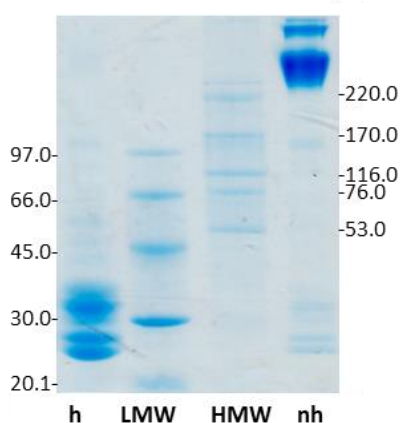
proteína a temperaturas de 85 °C (Fig. 21 E). Sin embargo, el tratamiento térmico extremo aplicado a PdPV1 (hervida durante 15 min) no afectó la integridad del oligómero cuando se lo analizó mediante PAGE-Nativo (Fig. 22 F).



**Figura 21. Efecto de la temperatura en la estabilidad estructural de PdPV1.** **A.** Espectro de absorción en la región visible del espectro a distintas temperaturas. **B.** Cuarta derivada del espectro de absorción. **C.** Espectro de emisión de fluorescencia a distintas temperaturas. **D.** Gráficos de Kratky obtenidos de los experimentos de SAXS a 25°C (azul) y 85°C (violeta). **E.** Radio de giro a diferentes temperaturas. **F.** Espectro de absorción de PdPV1 sin hervir (azul) y hervida (violeta), inset: PAGE-Nativo 4-20%. Calle h: PdPV1 hervida durante 15min, calle nh: PdPV1 no hervida. Referencias de peso molecular en KDa.

### 5.3.3.3 Estabilidad cinética

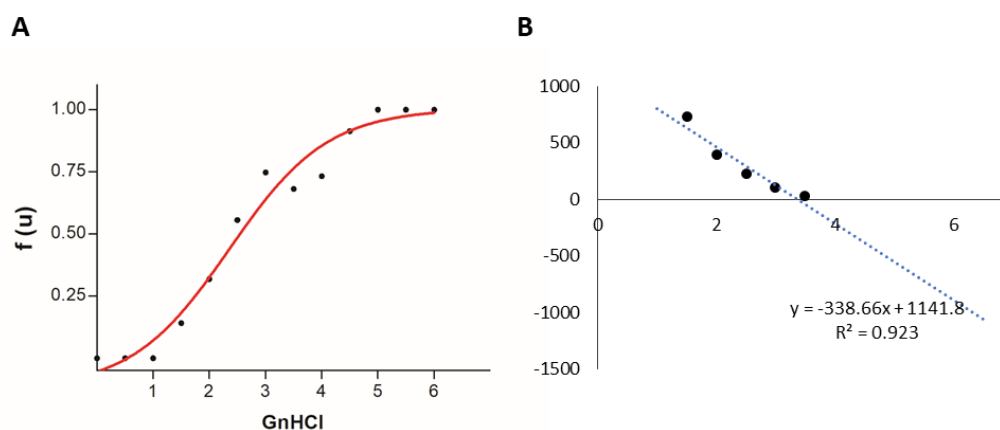
Las proteínas que son cinéticamente estables no muestran alteraciones en su movilidad electroforética tras ser incubadas con SDS, y es necesario calentarlas para poder desensamblarlas en sus subunidades. Cuando PdPV1 fue incubada con SDS no mostró ninguna alteración en el patrón de bandas luego de ser analizada por PAGE-SDS. Solo cuando la partícula se hirvió en presencia de SDS el oligómero se desensambló en sus 6 subunidades características (Fig. 22).



**Figura 22. Estabilidad cinética evaluada por resistencia al SDS.** La muestra de PdPV1 fue calentada (h) o no calentada (nh) en presencia de SDS durante 10 min inmediatamente antes de ser sembrada en el gel. LMW: estándar de bajo peso molecular en KDa. HMW: estándar de alto peso molecular en KDa. Las proteínas no estables frente al SDS se desensamblan en sus subunidades sin la necesidad de aplicarle calor.

### 5.3.3.4 Estabilidad química

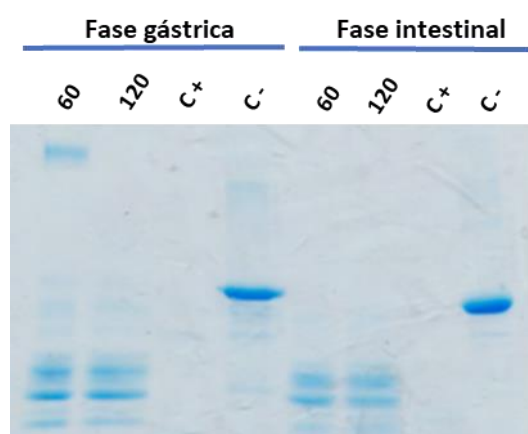
La cinética de desplegamiento de PdPV1 se estudió mediante experimentos de desplegamiento en equilibrio. La fracción proteica desplegada vs [GndHCl] se representa en la figura 23 A, mostrando una transición de tipo cooperativa al estado desplegado. El proceso de desplegamiento se ajustó a un modelo de dos estados con la proteína completamente desplegada a partir de 4.5 M de GndHCl. La energía libre calculada para el proceso de desplegamiento fue de  $1.14 \text{ Kcal.mol}^{-1}$  y el valor de  $m$ , que indica el grado de exposición de los residuos de Trp al solvente con el desplegamiento, fue de  $338.7 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{M}^{-1}$ . Finalmente, la concentración media desnaturizante, en la cual la fracción de proteína plegada y desplegada es igual, es de 3.4 M de GndHCl (Fig. 23 B).



**Figura 23. Desnaturalización química de PdPV1.** A. Curva de fracción desnaturalizada de PdPV1 en función de la concentración de GndHCl. B. Gráfico que describe la energía libre de la reacción en función de la concentración de caótropro.

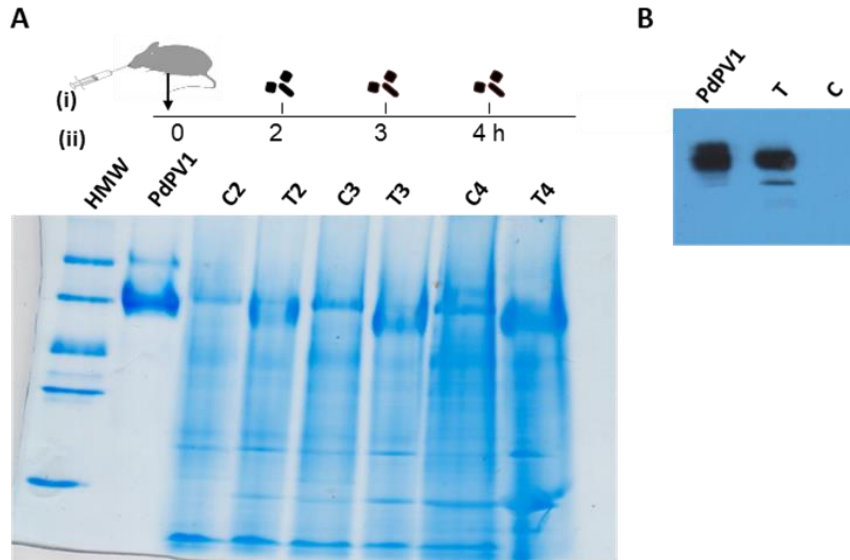
#### 5.3.4 Resistencia a la digestión gastrointestinal

PdPV1 mostró resistencia a la degradación enzimática, soportando una digestión gastrointestinal simulada durante 2h. La integridad de la proteína después de las fases gástrica e intestinal se analizó por PAGE-SDS, mostrando que no hay alteraciones significativas en su migración electroforética (Fig. 24). Solo en la fase intestinal puede evidenciarse una mínima degradación a través de la aparición de nuevas bandas de menor peso molecular. Tanto en la fase gástrica como intestinal se observa una digestión completa de la BSA del control positivo. Mas aún, cuando se administró la proteína oralmente a ratones BALB/c fue posible recuperarla casi intacta en las heces como se



**Figura 24. Digestión gastrointestinal simulada de PdPV1 analizada por PAGE-SDS.** Fase gástrica: PdPV1 luego de la incubación con pepsina en FGS durante 60 y 120 min (**60 y 120**). **C<sup>+</sup>** y **C<sup>-</sup>**: control positivo y negativo respectivamente de la digestión de BSA con y sin pepsina. Fase intestinal: PdPV1 incubada con tripsina durante 60 y 120 min (**60 y 120**). **C<sup>+</sup>** y **C<sup>-</sup>**: control positivo y negativo de la digestión de BSA con y sin tripsina.

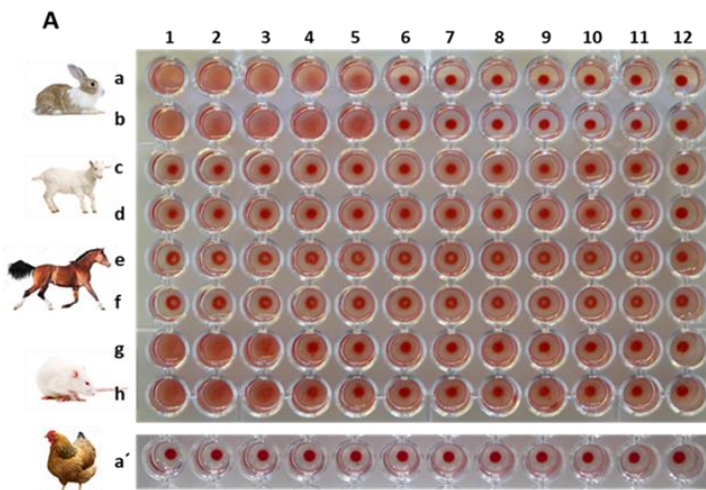
observa mediante análisis de PAGE-Nativo (Fig. 25 A) y WB (Fig. 25 B), indicando que PdPV1 es capaz de atravesar el sistema digestivo de un roedor sin alteraciones significativas de su estructura.

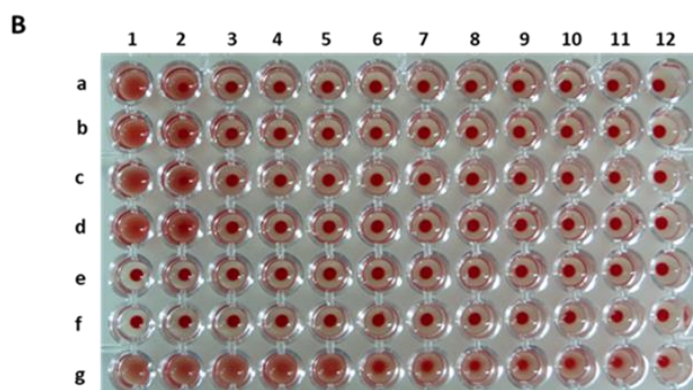


**Figura 25. Digestibilidad *in vivo* de PdPV1.** A. (i) Diagrama del protocolo experimental mostrando la administración oral de PdPV1 y los tiempos de colección de las heces. (ii) Análisis de las proteínas en las heces por PAGE-Nativo. **HMW**: estándar de alto peso molecular. **PdPV1**: PdPV1 purificada. **C2, C3, C4, and T2, T3 y T4**: control y heces colectadas después de 2, 3 y 4h, respectivamente. B. Inmuno detección mediante Western Blot de PdPV1 en las heces colectadas luego de 4h de la administración a los ratones de buffer (C) o de 0.6mg de PdPV1 (T).

### 5.3.5 Actividad Lectina

PdPV1 mostró capacidad hemaglutinante frente a eritrocitos de conejo, rata y células de humano y no mostró reactividad detectable frente a eritrocitos de las otras especies ensayadas (Fig. 26 A y B). Esta actividad fue ampliamente inhibida por N-acetil





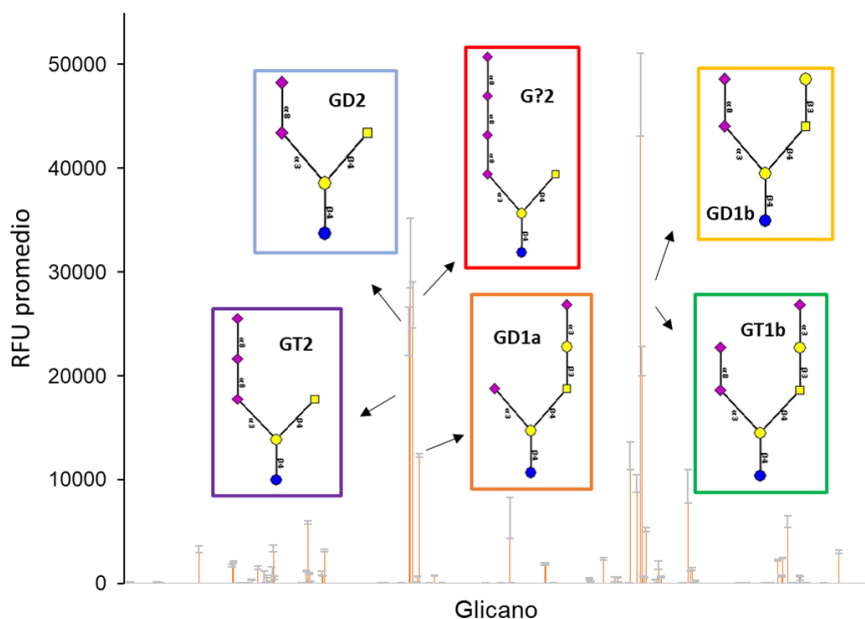
**Figura 26. Actividad hemaglutinante de PdPV1.** A. Pocillos del 1-11: eritrocitos (2%) de distintas especies incubados con diluciones crecientes de PdPV1, pocillo **12**: control con eritrocitos 2% en PBS. **a y b** conejo, **c y d** cabra, **e y f** caballo, **g y h** rata. B. Pocillos 1-11: eritrocitos de humano (2%) incubados con diluciones crecientes de PdPV1, pocillo **12**: control eritrocitos (2%) en PBS. **a y b**: Grupo A, **c y d**: grupo B, **e y f**: grupo 0, **g**: Control con eritrocitos de conejo incubados con PdPV1

galactosamina, galactosamina y galactosa (Tabla 6), mientras que la preincubación de eritrocitos de conejo con neuraminidasa y tripsina no impidió la hemaglutinación. La especificidad y afinidad relativa también se evaluó por un arreglo de glicanos (Fig. 27). De las 585 estructuras de glicanos ensayadas, observamos unión significativa de PdPV1 principalmente a glicanos conteniendo ácido N- acetilneuramínico con uniones 2,8, un ácido siálico muy común en gangliosidos de vertebrados. De hecho, PdPV1 reconoce con elevada afinidad los gangliosidos GD1b, GT2, GD2, GT1b, GD1a. Notablemente, todos estos glicanos poseen en común un motivo GalNAcb1-4Gal que podría ser la verdadera estructura de reconocimiento y explicaría los resultados obtenidos al tratar los eritrocitos con neuraminidasa. A su vez, la afinidad de PdPV1 por motivos GalNAc-Gal también podría

**Tabla 6. Inhibición (expresada en %) de la actividad hemaglutinante por competencia con monosacáridos**

Monosacárido	PdPV1	PsSC
GalNH <sub>2</sub>	75	99
GlcNH <sub>2</sub>	-	99
GalNAc	75	50
GlcNAc	-	-
Glucosa	-	-
Galactosa	75	-
Fucosa	-	-
Manosa	-	-

$$\text{Inh\%} = 100 - (T_{\text{inhibidos}}/100)/T_{\text{sin inhibir}}$$



**Figura 27. Arreglo de glicanos de PdPV1.** Se recuadran las estructuras reconocidas con mayor afinidad por la proteína. RFU= media de las unidades relativas. Los colores de los recuadros se corresponden con los de la tabla 7.

explicar la presencia de los agregados de PdPV1 observados en el análisis cromatográfico, ya que estos glicanos, que predominan en los patrones de glicosilación de PdPV1, promoverían el autoreconocimiento y por ende la autoagregación. Los glicanos con mayor score se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7. Se listan los 10 oligosacáridos reconocidos con mayor afinidad por PdPV1.** RFU ± 1SD, N = 4. %CV= 100 x SD.

Orden	Oligosacárido	RFU promedio	%CV
1	Galb1-3GalNAcb1-4(Neu5Aca2-8Neu5Aca2-3)Galb1-4GlcB-Sp0	47094 ± 3961	8
2	GalNAcb1-4(Neu5Aca2-8Neu5Aca2-8Neu5Aca2-3)Galb1-4GlcB-Sp0	31842 ± 3388	11
3	GalNAcb1-4(Neu5Aca2-8Neu5Aca2-3)Galb1-4GlcB-Sp0	26833 ± 2216	8
4	GalNAcb1-4(Neu5Aca2-8Neu5Aca2-8Neu5Aca2-8Neu5Aca2-3)Galb1-4GlcB-Sp0	24275 ± 2348	10
5	Neu5Aca2-3Galb1-3GalNAcb1-4(Neu5Aca2-8Neu5Aca2-3)Galb1-4GlcB-Sp0	21408 ± 1403	7
6	Neu5Aca2-3Galb1-3GalNAcb1-4(Neu5Aca2-3)Galb1-4GlcB-Sp0	12349 ± 185	1
7	Gala1-4Galb1-3GlcNAcb1-2Mana1-6(Gala1-4Galb1-3GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4GlcNAcb-Sp19	12313 ± 1317	11
8	GalNAcb1-3Gala1-6Galb1-4GlcB-Sp8	9642 ± 871	9
9	Galb1-4GlcNAcb1-2Mana-Sp0	9360 ± 1641	18
10	GalNAcb1-3Galb-Sp8	6334 ± 2003	32

### 5.3.6 Neurotoxicidad

La inyección intraperitoneal de la ESF de *P. diffusa* no tuvo efectos en la mortalidad de los ratones. Es más, 96 h después del tratamiento los ratones no mostraron signos de afección neurológica ni cambios comportamentales.

## 5.4 Discusión

Durante la transición de los ampularidos del agua a la tierra, los huevos de *Pomacea* han enfrentado las condiciones ambientales desfavorables del medio terrestre adquiriendo novedosas defensas. Entre ellas se incluye una perivitelina oligomérica altamente estable y no digerible que es el componente proteico mayoritario del FPV (Dreon et al. 2003, 2010; Ip et al. 2019, 2020; Ituarte et al. 2008; Pasquevich et al. 2014, 2017).

En este capítulo, aislamos y caracterizamos por primera vez la principal perivitelina de los huevos de *P. diffusa* lo cual nos permitió comprender mejor las tendencias evolutivas dentro del género. Hallamos que, al igual que las PV1 de otras especies de *Pomacea*, su PV1 es una carotenoproteína altamente estable a elevadas temperaturas, pHs extremos y elevadas concentraciones de caótopo. Más aún, su inusual estabilidad estructural le otorgaría la capacidad de ser indigerible, siendo capaz de atravesar el tracto gastrointestinal de ratones y de llegar al epitelio digestivo en una conformación completamente activa.

Encontramos que PdPV1 está compuesta por 6 cadenas polipeptídicas, presentando moderada similitud de secuencia con sus ortólogos PcOvo, PsSC y PmPV1 (Ituarte et al. 2008; Pasquevich et al. 2017). Se ha sugerido que las subunidades se han originado por una duplicación genética ancestral (Sun et al. 2012, 2019). El análisis filogenético de las cuatro perivitelinas muestra que cada una de las subunidades de PdPV1 se ubican por separado en uno de 6 grupos diferentes, cada uno conteniendo a la correspondiente subunidad ortóloga de cada una de las cuatro especies de *Pomacea*. Cada uno de estos grupos de ortólogos presenta poca divergencia en las secuencias, reforzando la idea propuesta en el capítulo anterior de que luego de la duplicación genética la ventaja de tener múltiples copias del mismo gen facilitó la síntesis rápida de perivitelinas durante la formación del huevo, evitando así variaciones genéticas adicionales. La elevada expresión de estos genes, casi exclusivamente restringida a la glándula del albumen de *P. diffusa* (Ip

et al. 2020), apoya aún más esta hipótesis. El árbol filogenético construido con las secuencias de las perivitelinas concuerda con los existentes del género, basados en la morfología o en el análisis del gen de la citocromo c oxidasa mitocondrial (Hayes et al. 2015). Así, dentro de un mismo grupo, las subunidades pertenecientes a PsSC y PdPV1 se agrupan siempre juntas, segregándose en el clado *bridgesii*, mientras que las pertenecientes a PcOvo y PmPV1 se agrupan por separado, respetando el clado *canaliculata*. Estas relaciones fueron evidenciadas también por el uso de anticuerpos: mientras que las perivitelinas del clado *bridgesii* son reconocidas específicamente por anticuerpos policlonales anti-PsSC, los anticuerpos policlonales anti-PcOvo solo reconocen débilmente algunas subunidades de estas. Estos resultados proveen la primera evidencia de la existencia de diferencias estructurales entre perivitelinas de ambos clados, probablemente asociadas, aunque no restringidas, a sus diferentes patrones de glicosilación y/o a sus diferentes funciones. En relación a esto, el patrón de glicosilación de PdPV1 es muy similar al observado en PsSC (Ituarte et al. 2010) y difiere considerablemente del observado en las perivitelinas del clado *canaliculata*. La presencia de ligandos glucídicos en la superficie de PdPV1, compatibles con su espectro de especificidad de reconocimiento, conforma un espacio multivalente que es, probablemente, el causal de la agregación observada en esta lectina: una característica de las PV1 del clado *bridgesii*, pero que no se observa en las del clado *canaliculata* (Dreon et al. 2003, Pasquevich 2014).

La caracterización de PdPV1 nos permitió, además, establecer las primeras generalizaciones respecto de las carotenoproteínas del género *Pomacea*. Todas ellas son oligómeros homólogos de alto peso molecular conformados por 6 subunidades diferentes de entre 25-35 kDa, con secuencias aminoacídicas similares. En cuanto a su participación en el sistema de defensa anti-depredador, debido a que son cinéticamente estables, resistentes a elevadas temperaturas y pH extremos así como también a la digestión gastrointestinal, actuarían como proteínas antinutritivas disminuyendo el valor nutricional de los huevos (Dreon, 2010; Ituarte 2012, Pasquevich et al. 2017). La evidencia indica que además de la cantidad de proteína, la calidad de la proteína también tiene un impacto significativo en la interacción depredador-presa. Al estar masivamente acumuladas y ser extremadamente resistentes a la degradación proteolítica, las proteínas cinéticamente estables disminuyen el valor nutricional al no estar disponible para la utilización por los



depredadores. Una estrategia similar es utilizada por semillas de leguminosas, las cuales tienen un elevado contenido de proteínas cinéticamente estables, que reducen la eficiencia de utilización de proteínas (Xia et al. 2016). Por tanto, por más que se acostumbra a pensar en defensa química como sinónimo de presencia de toxinas, algunas defensas químicas incluyen la ausencia de nutrientes y la presencia de otros no-nutrientes (Ruxton et al. 2004).

Además, si asumimos que PdPV1 y PsSC tienen roles similares podemos pensar que actuarían en la defensa anti-depredador del huevo como lectinas, alterando la morfofisiología del tracto digestivo. Hemos demostrado que ambas lectinas son capaces de llegar al intestino en una conformación biológicamente activa, en el caso de PdPV1 se recupera inalterada en las heces tras ser ingerida y en el caso de PsSC, si bien ese experimento no fue realizado, sabemos que se une a los enterocitos modificando su patrón de glicosilación y alterando la morfología del tracto digestivo de ratas, por lo cual podrían tener implicancias nutricionales en los potenciales consumidores. Considerando que la función de las lectinas está desencadenada por el reconocimiento de glicanos específicos (Hirabayashi 2014), y que tanto PsSC como PdPV1 se unen al mismo tipo de gangliósidos, lo más probable es que la unión de las lectinas PV1 a la superficie celular sea el primer paso de su mecanismo de acción sobre el tracto digestivo, una estrategia estudiada en las lectinas defensivas de plantas (Peumans & Van Damme 1995; Vasconcelos & Oliveira 2004).

Las similitudes estructurales y funcionales halladas entre PdPV1 y PsSC en su actividad lectina, estructura primaria y especificidad de reconocimiento frente a gangliósidos, junto con la ausencia de homología con lectinas presentes en las bases de datos, nos llevó a plantearnos la posible presencia de un nuevo módulo de reconocimiento de hidratos de carbono asociado a una posible nueva familia de lectinas. De hecho, esto ya ha sido planteado para otros moluscos recientemente, como por ejemplo, para la lectina del mejillón *Mytilus trossulus* (Chickalovets et al. 2016) que no presenta homología de secuencia con lectinas de las bases de datos a excepción de Mytilec (Fujii et al. 2012) y CGL (Kovalchuk et al. 2013). Esto permitió a los autores, tras una caracterización estructural de su sitio de reconocimiento de hidratos de carbono, describir una nueva familia de lectinas.

En nuestro caso, se necesitan llevar a cabo más estudios estructurales sobre estas perivitelinas para poder confirmar dicha hipótesis.

## 5.5 Conclusión

El estudio del FPV de *P. diffusa* y el de su perivitelina mayoritaria, la carotenoproteína PdPV1, contribuyen al conocimiento sobre la biología reproductiva de los caracoles del género *Pomacea*. En particular, aquí se brinda evidencia de la presencia de estrategias defensivas clado-específicas en los huevos del género: una de ellas involucrando carotenoproteínas con actividad lectina y la otra con neurotoxinas como efectores principales. La ocurrencia de ambas defensas está estrechamente relacionada con la posición filogenética de las especies y podría relacionarse con su capacidad invasiva. En contraste, la presencia de carotenoproteínas de reserva altamente estables, no digeribles, acumuladas masivamente en el huevo se consolida como una característica común del género. Otra característica común es que las PV1s proveen a los huevos de coloración, una señal presumiblemente aposemática que advierte a los depredadores de la presencia de los tóxicos presentes. Se necesitan más estudios comparativos sobre las perivitelinas de estos caracoles, de los clados en estudio y de otros del género, para comprender de una manera más acabada estos sistemas de defensa.

## 6 Efecto de los huevos de *Pomacea* sobre depredadores no mamíferos

## 6.1 Introducción

Las adaptaciones contra la depredación ocurren en todos los biomas y en los principales grupos taxonómicos, lo cual demuestra su gran importancia ecológica y evolutiva (Ruxton et al. 2004). Los huevos de la mayoría de los animales no son una excepción y se encuentran sometidos a intensa depredación (Kamler 2005; Ricklefs 1969). Sorprendentemente, los huevos de *Pomacea* parecen escapar a esta regla. Como hemos visto en capítulos anteriores, presentan una coloración que va del rosa pálido al rojo estridente. Estas llamativas masas de huevos, depositadas fuera del agua, probablemente atraen la atención de potenciales depredadores siendo, sin embargo, muy escasos los reportados hasta el momento. La presencia de coloración llamativa, sumada a las defensas bioquímicas de los huevos de *Pomacea*, nos ha llevado a hipotetizar que el color actúa como una señal aposemática. La coloración aposemática es una defensa primaria que intenta evitar el ataque del depredador, actuando como señal de advertencia de la presencia de defensas secundarias (Poulton 1890). Estas últimas operan luego de que el depredador detectó a su presa e inició el ataque, haciendo el encuentro poco provechoso para el atacante (Edmunds 1974). Las especies con coloración aposemática cumplen ciertas características como presentar una coloración contrastante con el fondo, estimular el sentido de la visión del depredador, algunas incluso son conspicuas (Ruxton et al. 2019). Sin embargo, todos estos rasgos aumentan las probabilidades de ser detectados y solo aquellas presas que contengan defensas químicas efectivas contra una amplia gama de depredadores tendrán la tendencia a desarrollar una señal aposemática (Endler & Mappes 2004; Ruxton et al. 2004). De otra forma, este rasgo podría volver a la presa vulnerable frente a los depredadores para los que las defensas químicas no son efectivas. En este sentido vimos la necesidad de ampliar a otros taxa los estudios de las defensas de los huevos de *Pomacea*, actualmente restringidos únicamente a mamíferos, particularmente a roedores como modelo de depredador. En estos se ha visto que la ingesta de la fracción soluble de huevo (ESF) de *P. canaliculata* produce acortamiento de las vellosidades intestinales, reducción de la superficie absortiva del sistema digestivo (Dreon et al. 2013, 2014), así como una alta letalidad si se la inyecta por vía intraperitoneal (Heras et al. 2008) y reducción de la tasa de crecimiento de ratas (Dreon et al. 2014). Además, en el capítulo 4 hemos demostrado que también la ESF de *P. scalaris* produce alteraciones sobre el

digestivo de ratones. Sin embargo, se desconoce si la ingesta de estas masas de huevos tiene efectos nocivos sobre otros taxones. Los anfibios y aves, como potenciales depredadores de los huevos, podrían ser susceptibles a este tipo de defensas, e incluso sus efectos diferir respecto de mamíferos, ya que la morfofisiología del tracto digestivo varía considerablemente entre taxones (McClelland 1979; Stevens 1988; Ziswiler & Farner 1972; Sabat & Bozinovic 2000). Dado que existe una correlación entre la estructura del sistema digestivo y la dieta (Ricklefs 1996), en este capítulo analizamos el efecto que tiene la ingesta de ESF sobre el intestino de un representante de cada uno de estos taxones, que al menos en la teoría, son capaces de percibir los estímulos visuales de los huevos de *Pomacea*. En el caso de anfibios, se tomó como modelo la rana invasora *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Anura, Ranidae), comúnmente llamada rana toro, que solapa parcialmente su distribución geográfica con la de *P. canaliculata*, tanto en el rango de distribución nativa como en el introducido (Akmentins & Cardozo 2010). Esta rana norteamericana, introducida en varias partes del mundo, tiene hábitos voraces y una dieta muy variada, incluyendo huevos tanto de vertebrados como invertebrados (Hirai 2004; Snow & Witmer 2010) y por tanto, una potencial consumidora de los huevos de *Pomacea*. Por otro lado, estudios respecto de la visión de las aves indican que las longitudes de onda del rojo son percibidas como conspicuas contra el follaje verde que forma el fondo sobre el cual se encuentra la presa (Arenas et al. 2014). Por lo tanto, la señal aposemática emitida por los huevos de *Pomacea* podría ser bien percibida por este tipo de depredadores y su sistema digestivo ser blanco de sus defensas bioquímicas. En este caso se tomó como modelo de ave a una especie omnívora, la codorniz común, *Coturnix coturnix*. En este capítulo exploramos en estos modelos, otros potenciales blancos de las defensas de los huevos de *Pomacea*, además de mamíferos, intentando comprender mejor el sistema de defensa tan particular de estos caracoles, tanto en aspectos de su biología como ecología evolutiva.

## 6.2 Métodos

### 6.2.1 Obtención de muestras y animales para experimentación

Para los ensayos se utilizó ESF de las especies *P. canaliculata*, *P. maculata* y *P. scalaris* que se obtuvieron como se describió en la sección 3.2 y 3.4. El contenido de proteína se determinó por el método de Lowry (ver sección 3.7.1.).

Para los ensayos que involucraron anfibios, se emplearon los ejemplares de *L. catesbeianus* sexualmente inmaduros que se obtuvieron de un acuario de la ciudad de Buenos Aires. Se mantuvieron en una sala especialmente acondicionada en el INIBIOLP, en contenedores plásticos de 60x40x50 cm con un colchón de tierra y vegetación natural. Se les proveyó agua en recipientes plásticos la cual fue cambiada dos veces al día durante todo el experimento. Los animales tuvieron un ciclo de luz:oscuridad de 12:12 h y la sala se mantuvo a  $22 \pm 3$  °C. Se los alimentó una vez al día con larvas del género *Tenebrio molitor* (Linneo, 1758) o con adultos de cucarachas *Blaptica dubia* (Serville, 1839).

Para aquellos experimentos que involucraron aves, se emplearon codornices *Coturnix coturnix*. Los ejemplares se obtuvieron de una granja en la ciudad de Gonnet, Pcia. Buenos Aires y se mantuvieron en cajas de cartón de 60x40x50 cm bajo una lámpara incandescente de 60 W, a una temperatura de  $26 \pm 3$  °C y un ciclo luz:oscuridad de 12:12 h en una sala especialmente acondicionada en el INIBIOLP. El agua se recambio diariamente y los animales se alimentaron con alimento comercial *ad libitum*.

### 6.2.2 Ensayos en ranas

#### 6.2.2.1 Letalidad

Para evaluar el efecto tóxico de la ESF de *P. canaliculata* en ranas, se realizó una prueba preliminar. Grupos de cinco ranas toro ( $8.0 \pm 1.1$  g) se inyectaron intraperitonealmente (i.p.) con una dosis única de 150 µL de PBS (controles) o el mismo volumen de una de las 4 diluciones (entre 12 y 1.5 mg/Kg) de ESF (9 mg/mL), teniendo como referencia que una concentración de 3 mg/Kg es cercana a la dosis letal media (LD<sub>50</sub>) calculada para ratones (Heras et al. 2008). Para las inyecciones se utilizó una jeringa 30G x 13 mm. Como en este ensayo preliminar no se observó letalidad, se realizó un segundo experimento en el cual tres ranas se inyectaron con 150 µL de ESF pura (sin diluir) (170 mg/Kg) lo cual equivaldría a 0.04 g de huevo (una puesta pesa en promedio unos 4 g). Esta dosis es 50 veces más

elevada que la LD<sub>50</sub> determinada para ratones. Los animales se observaron durante 96 h post-administración evaluando letalidad, cambios comportamentales o algún otro signo (Giglio et al. 2016; Heras et al. 2008).

### **6.2.2.2 Alimentación forzada y preparación del tejido**

Para evaluar el efecto que la ESF de *P. canaliculata* pudiera tener sobre el tracto digestivo, se administraron por vía oral ranas toro (n=6) con una dosis única de 200 µL de ESF (9 mg/mL), usando una cánula plástica flexible. Esto correspondería a 1.8 mg de proteínas totales que equivale a la ingesta aproximada de 0.05g de puesta (Giglio et al. 2016). Los animales control (n=3) fueron administrados con el mismo volumen de PBS. A las 24 h y 48 h de la administración se sacrificaron grupos de 3 animales por inmersión en un baño conteniendo Tricaina metano sulfonato (MS-222) 0.2 mg/mL, siguiendo el procedimiento descrito por Tyler (2009). De cada animal se disecó la primera porción del intestino delgado (aproximadamente 0.5 cm) que fue lavado varias veces con PBS antes de ser procesado para los estudios histológicos.

El tejido obtenido fue fijado en formalina neutral 10% durante 48 h con una relación fijador:muestra de 40:1 (v/p). A continuación, las muestras fueron transferidas a etanol 70% para su preservación y posterior análisis histológico. Se realizaron tacos en parafina, para lo cual las muestras fueron deshidratadas mediante su incubación por 1 h en mezclas de alcoholes crecientes de 35, 45, 55, 75, 96 y 100. Seguidamente se incluyeron en Histoplast® a 60 °C durante 1 h y se cortaron secciones transversales al eje mayor del intestino de 5-7 µm de espesor usando un micrótopo manual, espaciados entre corte y corte por 50-70 µm de manera de lograr un análisis más representativo de la muestra. Las secciones fueron observadas en un microscopio óptico Olympus BX51. Las imágenes digitales se obtuvieron con una video cámara Olympus DP-70 y luego analizadas con el software Image ProPlus v. 6.3 (Media Cybernetics, USA).

#### **6.2.2.2.1 Análisis morfométrico del intestino delgado**

Para evaluar los cambios morfológicos en la mucosa de ranas, se tomaron fotografías a una magnificación 4x de 9 secciones por animal teñidos con hematoxilina y eosina (HE) siguiendo el procedimiento sugerido en Bancroft & Gamble (2008) y se analizaron usando el software Image ProPus. No fue posible medir el largo y ancho de las vellosidades

individuales ya que no se distinguían claramente unas de otras (a ninguna magnificación), por lo cual se decidió tomar a las vellosidades como una unidad de la siguiente manera. Se midió el “área de la sección” (SA) (Fig. 28, izquierda) dentro de la región de interés (ROI) delimitada por la línea verde, considerando la mucosa (epitelio y lamina propia, excluyendo la capa de tejido muscular) y el área del lumen. Así mismo, se midió el “área de tejido” (TA) (Fig. 28, centro) dentro de la ROI, considerando el área de tejido de la mucosa relativa a SA, excluyendo del cálculo el área del lumen. También se estimó la relación entre el área del lumen y SA. Para estimar la superficie absortiva, se midió el perímetro del epitelio expuesto al lumen en relación a SA (Fig. 28, derecha).

Para el análisis estadístico, se realizó un test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Las diferencias entre los grupos control, tratado 24 h y tratado 48 h se determinaron haciendo un test de comparación múltiple de Dunn ( $P < 0.1$ ).



**Figura 28.** Esquemas del intestino delgado de ranas toro resaltando las zonas utilizadas para las mediciones morfométricas. **Izquierda:** “Área de la sección” (SA): área definida dentro de la región de interés (ROI) delimitada por la línea verde que incluye el área de la mucosa (excluyendo la capa muscular) y el área del lumen. **Centro:** “Área de tejido” (TA): incluye la medición del área de la mucosa (resaltada en rojo) relativa a SA, dentro de la ROI. **Derecha:** medición del perímetro (indicado por la línea verde) del epitelio intestinal relativo a SA.

#### 6.2.2.2.2 *Presencia de eosinófilos y macrófagos*

Para determinar la presencia de eosinófilos, se analizaron 9 secciones por animal teñidos con hematoxilina y eosina (HE) como se detalló en la sección anterior. Los eosinófilos se contaron usando un microscopio óptico (ver sección 6.2.2.2) en 5 campos de  $0.05 \text{ mm}^2$  seleccionados al azar de cada corte (magnificación 60x), analizando un total de 135 campos para cada grupo experimental. Se realizó un test no paramétrico de Kruskal-Wallis y las diferencias entre tratamientos se analizaron por medio de un test de comparación múltiple de Dunn ( $P < 0.05$ ).



La presencia de macrófagos se determinó por inmunohistoquímica. Para ello, 9 secciones por animal se desparafinaron e hidrataron y luego se incubaron toda la noche a 4 °C con un anticuerpo monoclonal CD68 clon KP1 de ratón contra humano (1:100, Dako). Luego las secciones fueron reveladas con un kit comercial con un sistema biotina- estreptavidina (LSAB) conjugada con HRP (Dako) y se visualizó utilizando el cromógeno 3,3'-tetrahidrocloruro de diaminobenzidina (DAB) (Dako) y peróxido de hidrogeno. En esta técnica, se hacen incubaciones sucesivas de la muestra durante 10 min con un anticuerpo secundario biotinilado anti-ratón junto con estreptavidina conjugada con HRP y el complejo se visualiza luego de una incubación con DAB durante 5-10 min. La reacción positiva se observa por un precipitado marrón en la zona del antígeno. Las secciones fueron contrastadas con hematoxilina de Mayer antes del análisis.

#### **6.2.2.2.3 *Determinación de colágeno en las vellosidades intestinales***

Debido al engrosamiento observado de la lámina propia se evaluó el aumento en la cantidad de fibras de colágeno. Para ello, se tiñeron 3 secciones por animal usando Picrosirius red (Direct Red 80, Aldrich, Milwaukee, WI 53233, USA) (Portiansky et al. 2002). Las secciones se desparafinaron y luego se tiñeron por 1 h en una solución 0.1% (p/v) de Sirius red en una solución acuosa saturada con ácido pírlico. Seguidamente, las secciones fueron rápidamente lavadas con agua y contrastadas con hematoxilina de Harris (Montes 1996). Las muestras se observaron luego bajo luz polarizada, se utilizó un analizador U-ANT (Olympus) y un polarizador UPOT (Olympus) para estudiar la birrefringencia del colágeno teñido. El colágeno de tipo I refleja la luz roja a amarilla, mientras que el colágeno de tipo III refleja la luz verde. Las imágenes de los cortes histológicos (magnificación 20x) se digitalizaron usando una videocámara Olympus DP73 montada en un microscopio Olympus BX53 usando el software Olympus cellSens Dimension V1.7. El colágeno total se calculó como la suma del área de todo el tejido conectivo (tipo I y III), dividido por el total del área de la sección.

Para el análisis estadístico, se realizó un test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Las diferencias entre los grupos control, tratado 24 h y tratado 48 h se determinaron haciendo un test de comparación múltiple de Dunn ( $P < 0.05$ ).

#### 6.2.2.2.4 *Ensayo de unión de PcPV2 a enterocitos*

Debido a la presencia de PcPV2 con actividad lectina en el FPV de *P. canaliculata*, la cual corresponde al 18% del total del contenido proteico (Giglio et al. 2016), se analizó su capacidad de unirse al epitelio intestinal a través de su interacción con los hidratos de carbono de los enterocitos. Se analizaron 3 secciones por animal en vidrios positivados que se deshidrataron e incubaron con peróxido de hidrogeno 3% (v/v) en metanol durante 30 min a temperatura ambiente. Luego, los cortes se lavaron con PBS y se sometieron a un procedimiento de recuperación de antígeno dado que en tejidos fijados con formaldehido se pueden generar modificaciones químicas que interfieren con la detección de proteínas. Se utilizó un sistema de recuperación de antígeno con proteinasa K 1:30 (Dako). Luego de esta proteólisis, se bloquearon los sitios inespecíficos de unión con una solución de BSA 2% (p/v) durante 30 min en una cámara húmeda a 4 °C, seguido de la incubación durante toda la noche con el anticuerpo primario anti-PcPV2(1:200). Para el revelado se usó un kit EnVision plus (Dako). Este kit contiene un sistema similar al LSAB descrito en la sección 6.2.5 pero en este caso contiene un polímero marcado con HRP conjugado a los anticuerpos secundarios. Como consecuencia, se elimina o al menos se reduce la tinción inespecífica que resulta de la actividad avidina-biotina en algunos tejidos a la vez que es un sistema mucho más sensible que los anteriores. Para el ensayo se utilizaron anticuerpos policlonales anti-PcPV2 preparados como se indicó en la sección 3.8. La reacción positiva muestra una coloración dorado oscuro. Todas las secciones fueron contrastadas con hematoxilina de Mayer.

#### 6.2.2.2.5 *Histoquímica con lectinas*

Para analizar posibles cambios en la glicosilación de los enterocitos, se evaluó la reactividad de los tejidos frente a diferentes lectinas biotiniladas (Lectin Biotinylated BK 1000 Kit, Vector Laboratories Inc), a saber: Con A (*Concanavalina ensiformis*), DBA (*Dolichos biflorus*), SBA (*Glycine max*), PNA (*Arachis hypogaea*), RCA-I (*Ricinus communis-I*), UEA-I (*Ulex europaeus-I*), and WGA (*Triticum vulgare*). 3 secciones por animal fueron desparafinadas con xileno, deshidratadas con Alcohol 100% durante 10 min dos veces. Para inhibir la actividad endógena de la peroxidasa se incubó 5 min con peróxido de hidrógeno 0.3-3.0% en metanol. Luego se hidrataron, se lavaron con PBS y se incubaron con las lectinas durante toda la noche. Al otro día, se volvieron a lavar con PBS seguido de una incubación de 10

min con estreptavidina conjugada con HRP en PBS (Vector Labs. Inc.). Finalmente, las lectinas unidas al tejido se visualizaron incubando durante 4-10 min con una solución buffer Tris-HCl (0.05 M, pH 6.0) conteniendo 0.02% DAB y 0.05% peróxido de hidrogeno. Las secciones se contrastaron con hematoxilina de Mayer. Para el análisis, los enterocitos se dividieron virtualmente en 3 zonas: zona apical (porción del enterocito que mira al lumen del intestino), estroma (citosol de los enterocitos) y zona supranuclear. También se analizó la tinción de las células caliciformes. Las células positivamente marcadas mostraron una coloración marrón oscuro a doradas y se les asignó un valor de acuerdo con la intensidad de tinción.

### 6.2.3 Ensayos en codornices

#### 6.2.3.1 Alimentación forzada y preparación del tejido

Para estudiar el efecto de la ingesta de huevos de *Pomacea* sobre el sistema digestivo de aves, se administró oralmente ESF a 16 codornices. Para ello, se asignaron al azar codornices que pesaban  $73.07 \pm 7.15$  g a uno de los siguientes 5 grupos: Grupo tratado 24 h con ESF de *P. maculata* (n=3), grupo tratado 24 h con ESF de *P. scalaris* (n=3), grupo tratado 48 h con ESF de *P. maculata* (n=3) y grupo tratado 48 h con ESF de *P. scalaris* (n=3) o grupo control (n=4). Las aves fueron sondeadas con 500  $\mu$ L de ESF de *P. maculata* (9.5 mg/mL) o de *P. scalaris* (8 mg/mL), usando una cánula plástica flexible. A los animales control se les administró el mismo volumen de PBS. Las concentraciones de proteína corresponden en el caso de la ESF de *P. maculata*, a 4.7 mg de proteína lo que equivaldría a la ingesta aproximada de 0.14g de puesta (Giglio et al. 2016). Estas cantidades son considerablemente pequeñas teniendo en cuenta que una puesta de *P. maculata* pesa en promedio 13g. Concentraciones similares se emplearon para *P. scalaris*.

Los animales de los grupos tratado 24 h, tanto con ESF de *P. maculata* como de *P. scalaris*, fueron analizados 24 h después de ser sondeados disecándoles la primera porción del intestino delgado (aproximadamente 1 cm) para su posterior análisis histológico. Las codornices asignadas al grupo 48 h recibieron una dosis adicional de ESF (equivalente a la primera) 24 h después de la primera y fueron sacrificadas un día después de la segunda dosis. Se disecó la primera porción del intestino delgado (aproximadamente 1 cm). En

todos los casos los animales se sacrificaron por inhalación de dióxido de carbono y el tejido para los análisis histológicos se preparó como se describió en la sección 6.2.2.2.

#### **6.2.3.1.1 Análisis morfométrico del intestino delgado**

Para medir los cambios morfológicos, los cortes histológicos fueron teñidos con HE siguiendo el procedimiento sugerido en Bancroft y Gamble (2008) y se tomaron imágenes en el microscopio óptico (magnificación 4x) como se describió en la sección 6.2.2.2 las cuales fueron procesadas usando el software Image ProPlus v. 6.0. Se midió el largo y el ancho de 17 vellosidades por animal, correctamente orientadas, y sus criptas contiguas. Estas medidas se usaron además para calcular el índice de amplificación de la superficie absorptiva (M) siguiendo el método de Kisielinski et al. (2002) como se describió en la sección 4.2.6.1.

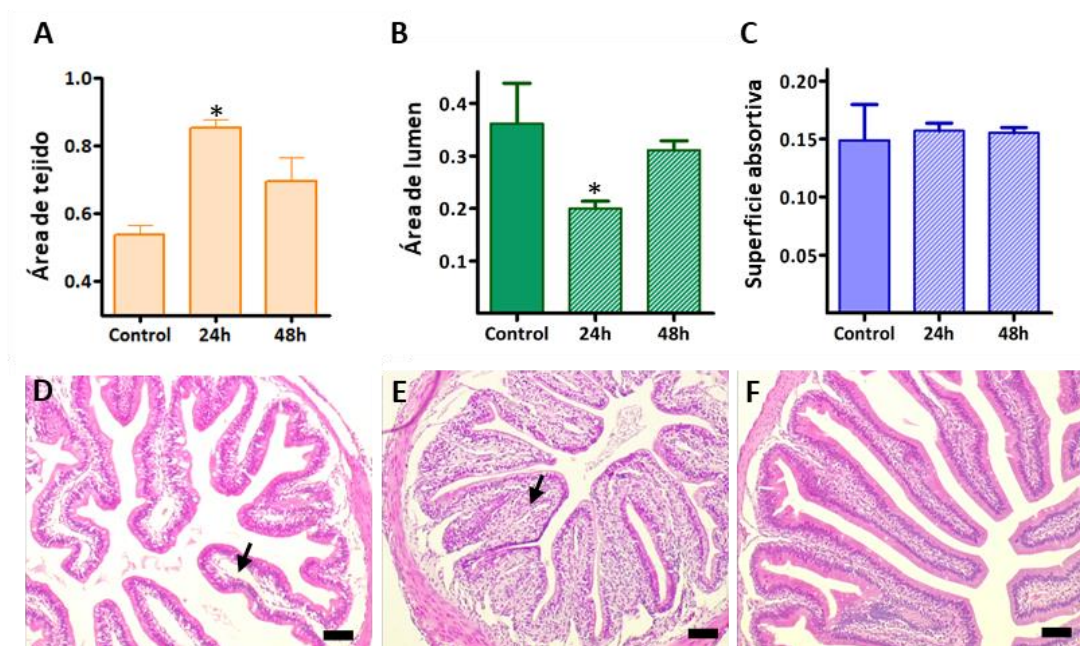
En todos los casos, el análisis estadístico se realizó por un test no paramétrico de Kruskal-Wallis y para analizar la presencia de diferencias significativas entre tratamientos se realizó un test de comparación múltiple de Dunn ( $P < 0.1$ ).

### **6.3 Resultados**

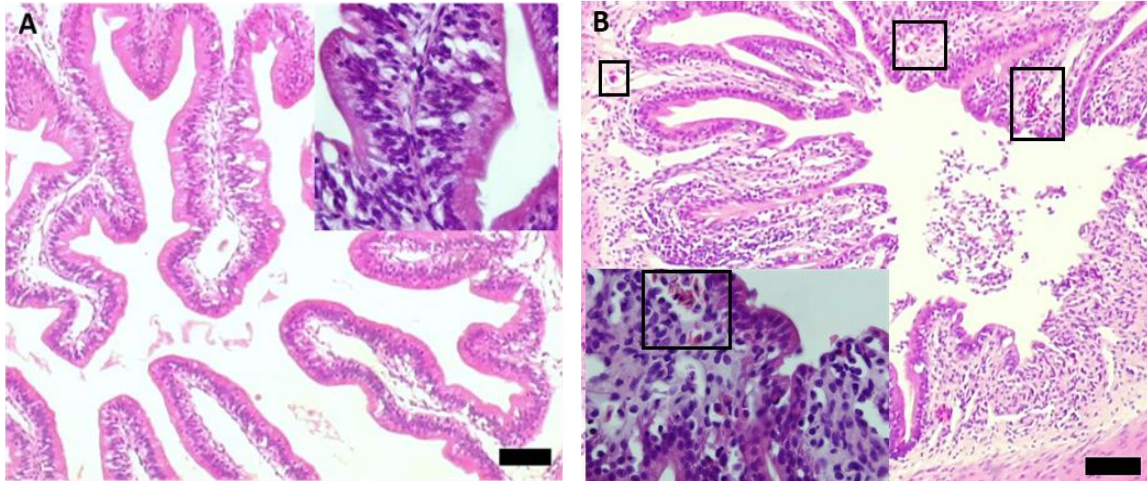
#### **6.3.1 Efecto de la ESF sobre la morfología del digestivo en ranas toro**

La ingestión de los extractos de huevo alteró la morfometría del intestino delgado en los diferentes grupos mostrando que luego de 24 h de la administración de la ESF de *P. canaliculata*, la mucosa incrementa significativamente su área relativa (Media  $0.85 \pm 0.05$  SD) respecto de los animales control (Media  $0.52 \pm 0.08$  SD), mientras que en el intestino de las ranas 48 h posteriores a la administración se observa que el área relativa tiende a volver a los valores control (Media  $0.69 \pm 0.12$  SD) (Fig. 29 A). Simultáneamente, el área relativa del lumen se ve significativamente reducida 24 h post administración de la ESF (Media  $0.20 \pm 0.08$  SD) en comparación con el control (Media  $0.36 \pm 0.08$  SD), mientras que para el tratamiento de 48 h los valores fueron similares a los observados para el control (Media  $0.31 \pm 0.09$  SD) (Fig. 29 B). Sin embargo, no se observaron cambios en la extensión relativa de epitelio intestinal (Fig. 29 C). Al microscopio óptico, las vellosidades intestinales de los animales control se ven largas y angostas, con un epitelio continuo que contiene algunas células caliciformes y un vaso linfático (lacteal) central bien definido (Fig. 29 D). Luego de 24 h de la administración de ESF, las vellosidades se ensanchan y se observa un

marcado engrosamiento de la lámina propia obstruyendo casi por completo el capilar linfático central y reduciendo el tamaño del lumen (Fig. 29 E). Así mismo, se observa una leve hemorragia (Fig. 30). Por el contrario, pasadas 48 h de la administración, la mucosa comienza a retornar a su morfología normal, mostrando vellosidades más angostas y un mayor lumen. Sin embargo, la lámina propia sigue viéndose más ensanchada que en los controles (Fig. 29 F). En cuanto al contenido de colágeno en la lámina propia, no se observaron diferencias significativas en la cantidad total entre los diferentes grupos



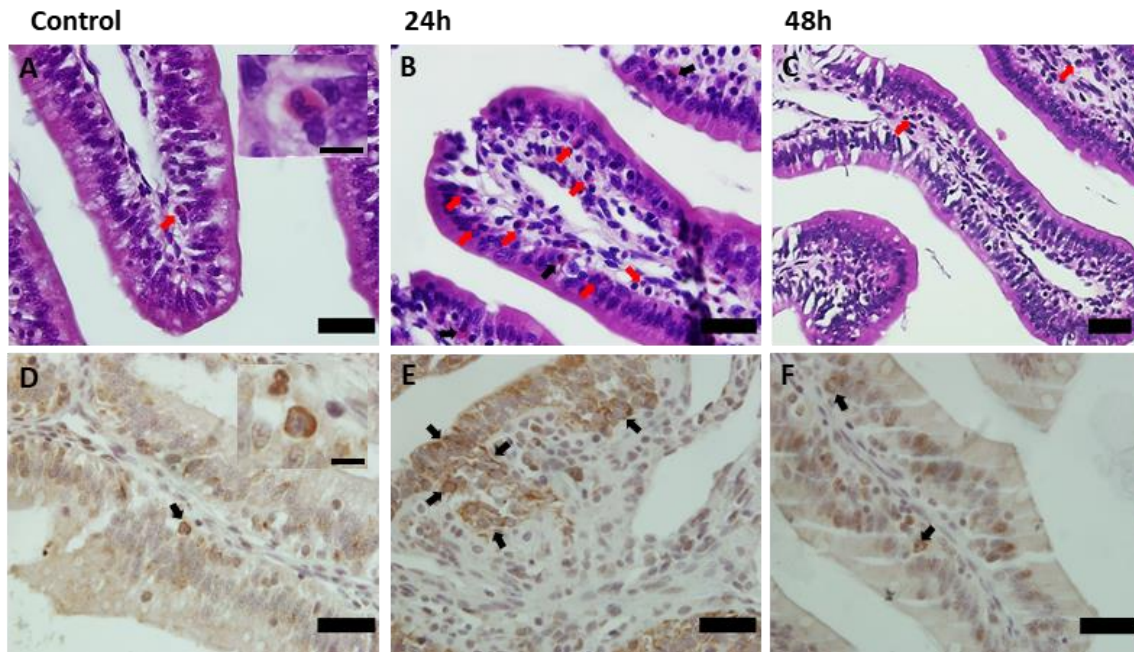
**Figura 29. Morfometría del intestino en los diferentes grupos de ranas toro.** A. Cambios en el área relativa de tejido (TA). B. Cambios en el área relativa del lumen. C. La superficie absortiva (perímetro/SA) no muestra cambios en relación con el tratamiento. D. Sección representativa de animales del grupo control. Se observa un lumen amplio y vellosidades largas y delgadas. Las flechas indican el vaso linfático central (lacteal). E. Sección representativa de los animales 24 h post administración. Se observa una reducción del lumen y las vellosidades se tornan anchas. Las flechas indican los capilares linfáticos reducidos debido al incremento de la lámina propia. F. Sección representativa de los animales 48 h posteriores administración. Las vellosidades comienzan a tener un aspecto más similar al control aunque todavía se observa un aumento del tejido conectivo en la lámina propia que obstruye parcialmente el capilar linfático. Barra= 100  $\mu$ m. \*P < 0.1



**Figura 30. Hemorragia inducida en el intestino delgado de ranas toro por la administración de ESF de *P. canaliculata*.** A. Sección representativa del grupo control. Recuadro: detalle de la lámina propia de las vellosidades. B. Sección representativa del grupo 24 h post administración mostrando signos de una hemorragia leve (rectángulos). Recuadro: detalle de la hemorragia observada en las vellosidades (rectángulos). Barra= 100  $\mu$ m.

### 6.3.2 Respuesta inflamatoria del intestino en ranas toro

El intestino delgado mostró un aumento en el número de células inflamatorias tanto a las 24 h como a las 48 h post administración de la ESF de *P. canaliculata* cuando se los compara con el control. Se observan eosinófilos tanto en la lámina propia como entre los enterocitos. En los controles, los eosinófilos contados fueron entre 0-2 por campo (Media  $1.0 \pm 0.8$  SD) (Fig. 31 A) mientras que 24 h post tratamiento se observa un aumento significativo de eosinófilos que va de 7 a 14 por campo (Media  $11.0 \pm 3.6$  SD) (Fig. 31 B). Los animales tratados 48 h muestran una disminución en los eosinófilos contados por campo ahora de 1 a 6 (Media  $4.0 \pm 2.6$  SD) (Fig. 31 C) tendiendo a volver a los valores control, al igual que sucede con los cambios morfológicos mencionados más arriba. El número de macrófagos presentes en el intestino delgado también se incrementó 24 h luego de la administración del ESF. Esto se evidencia por una intensa marcación con anticuerpos monoclonales CD68<sup>+</sup> principalmente en la zona de la lámina propia y entre enterocitos (Fig. 31 E), lo cual contrasta con el grupo control en el cual los macrófagos están prácticamente ausentes (Fig. 31 D). Nuevamente, el intestino de las ranas sacrificadas a las 48 h de la administración presentó una marcación mucho menor, aproximándose a la observada en los controles (Fig. 31 F).

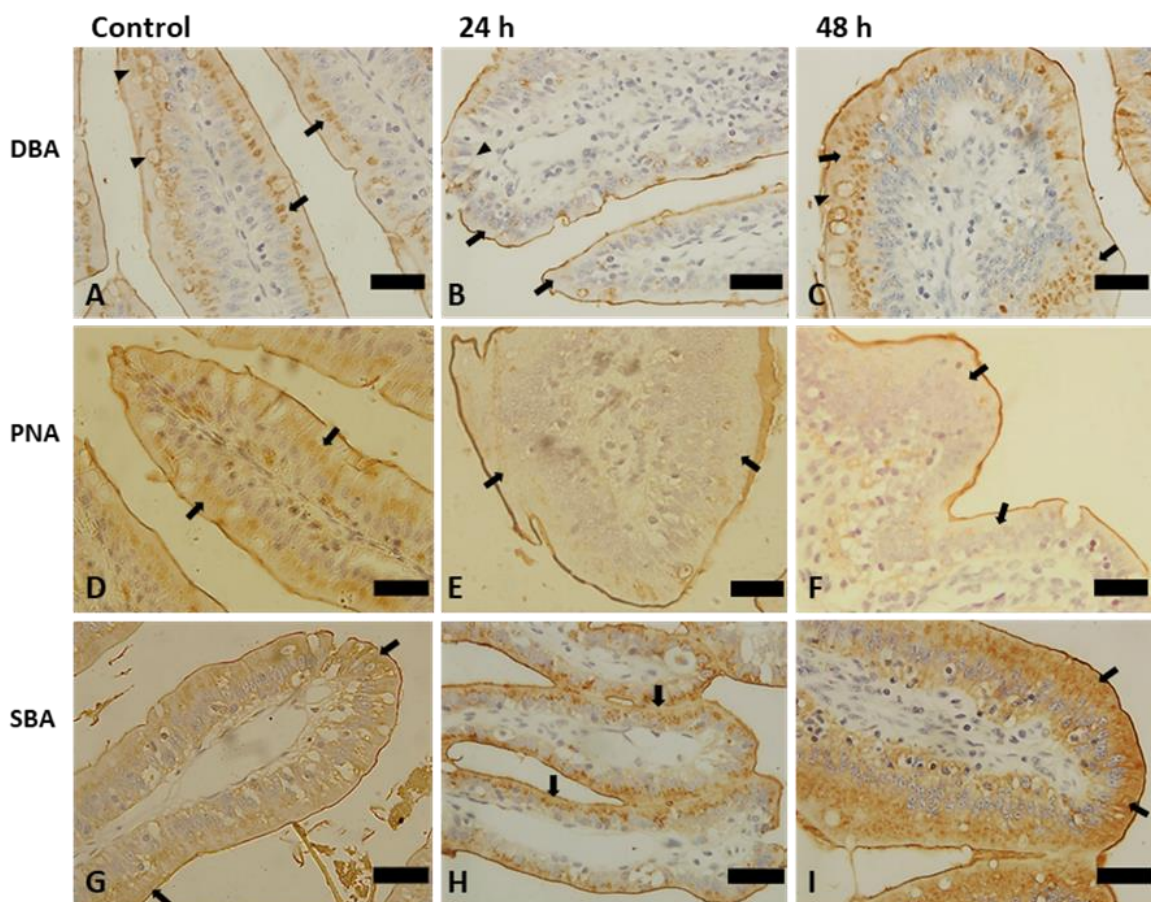


**Figura 31. Aumento de eosinófilos y macrófagos en el intestino de ranas toro tras la ingestión de ESF de *P. canaliculata*.** A-C. Eosinófilos (HE), **A.** Sección control, los eosinófilos se marcan con una flecha. Inset: eosinófilo típico con gránulos citoplasmáticos (barra= 10  $\mu$ m). **B.** Sección 24 h post administración. Se observa un marcado aumento en el número de eosinófilos (flechas). **C.** Sección 48 h post administración donde se observa el retorno a niveles control. **D.** Sección control mostrando los macrófagos marcados usando el anticuerpo monoclonal CD<sup>68+</sup>. Inset: detalle de un macrófago típico con inmunomarcación (barra= 10  $\mu$ m). **E.** Sección 24 h post administración donde se observa un aumento en el número de macrófagos. **F.** Sección 48 h post administración con los macrófagos retornando a los niveles de marcación del control. A-F Barra= 40  $\mu$ m.

### 6.3.3 Efecto de la ingesta de ESF en la glicosilación de los enterocitos de rana

Los análisis con lectinas del patrón de glicosilación del epitelio digestivo de ranas toro mostró una reactividad diferencial entre los grupos control y tratados, especialmente frente a las lectinas DBA, PNA y SBA. Las secciones control analizadas con DBA mostraron una tinción intensa en la zona supranuclear y región apical. También se observó marcación en el estroma de los enterocitos y en las células caliciformes, pero con menor intensidad (Fig. 33 A). 24 h post tratamiento, la zona supranuclear y células caliciformes se negativizaron mientras que la zona apical no mostró cambios comparado con el control (Fig. 33 B). Los animales tratados 48 h mostraron una tinción similar a la observada en los controles (Fig. 33 C). En los cortes tratados con la lectina PNA se observó un resultado similar al obtenido con DBA, donde a las 24 h se debilita la marcación de la zona supranuclear (Fig. 33 E) en comparación con el control (Fig. 33 D), pero a diferencia de lo

que sucede a las 48 h con DBA, la marcación con PNA permanece negativa 48 h luego de administrar la ESF (Fig. 33 F). Las células caliciformes no se marcaron con PNA ni en los controles ni en los tratados. Por último, la unión de SBA a los enterocitos mostró cambios en los animales tratados 24 h. En ellos, se observa una marcación mucho más intensa en la región supranuclear (Fig. 33 H) que la observada para los animales control (Fig. 33 G). A las 48 h, la zona supranuclear permaneció intensamente marcada al igual que la zona apical (Fig. 33 I). Los cambios observados en el patrón de reactividad del epitelio digestivo frente a las diferentes lectinas empleadas se resumen en la tabla 8.



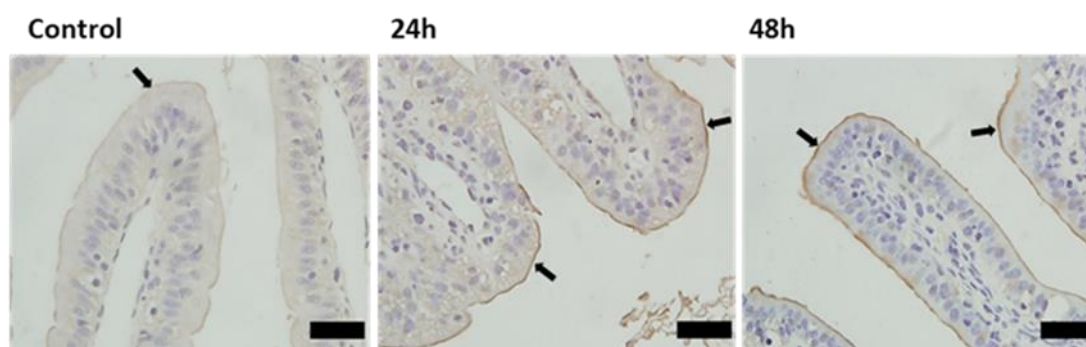
**Figura 32. Efecto de la administración de ESF sobre el patrón de glicosilación del intestino delgado de rana. A-C:** histoquímica con la lectina DBA. No se observa marcación en la zona supranuclear (flechas) ni en las células caliciformes (puntas de flechas) luego de 24 h de la administración comparado con el grupo control. Estos efectos se revierten a las 48 h. **D-F:** histoquímica con la lectina PNA. No se observa marcación en la zona supranuclear (flechas) ni estroma 24 h y 48 h posteriores a la administración de ESF. **G-I:** histoquímica con la lectina SBA. En los controles se observa una marcación débil de la zona supranuclear (flechas) pero, pasadas las 24 h de la administración, se observa una marcación intensa en la zona supranuclear. A las 48 h, los enterocitos muestran intensa marcación en la supranuclear que se extiende hacia el resto del estroma. Barra = 40 µm.



**Tabla 8. Cambios en la glicosilación de enterocitos 24 y 48 h post administración mediante histoquímica con lectinas.** En la tabla se reportan los cambios de reactividad frente a las diferentes lectinas en relación al grupo control. Ausencia de cambio en la reactividad de la lectina se simboliza con (=), las flechas hacia arriba y hacia abajo simbolizan aumento y disminución en la reactividad respectivamente.

Lectina	Apical 24h 48h	Supranuclear 24h 48h	Estroma 24h 48h	Caliciformes 24h 48h
Con A	= =	= =	= =	= =
DBA	= =	↓ =	↓ =	↓ =
WGA	= =	= =	= =	= =
PNA	= =	↓ ↓	↓ ↓	= =
UEA I	= =	= =	= =	= =
SBA	= =	↑ ↑	= =	= =
RCA I	= =	↓ =	= =	= =

Por otra parte, la lectina PcPV2, se unió a los enterocitos de animales a los que se les administró por vía oral ESF conteniendo 300 µg de esta proteína. Esto se evidencia por la marcación del epitelio intestinal usando anticuerpos anti-PcPV2, donde la zona apical de los enterocitos mostró signos claros de esta unión 24 h y 48 h post administración de la ESF, con una marcación más intensa sobre todo en la punta de las vellosidades (Fig. 33).



**Figura 33. Unión de PcPV2 al epitelio intestinal de ranas toro. Control:** no se observa unión de los anticuerpos anti-PcPV2 (flechas) a la membrana de los enterocitos. **24h:** se observa una intensa marcación del epitelio de las vellosidades, especialmente en el glicocáliz (color marrón, flechas). **48h:** se observa el mismo patrón de marcación que para 24 h. Barra= 40 µm

### 6.3.4 Inyección intraperitoneal de la ESF en ranas

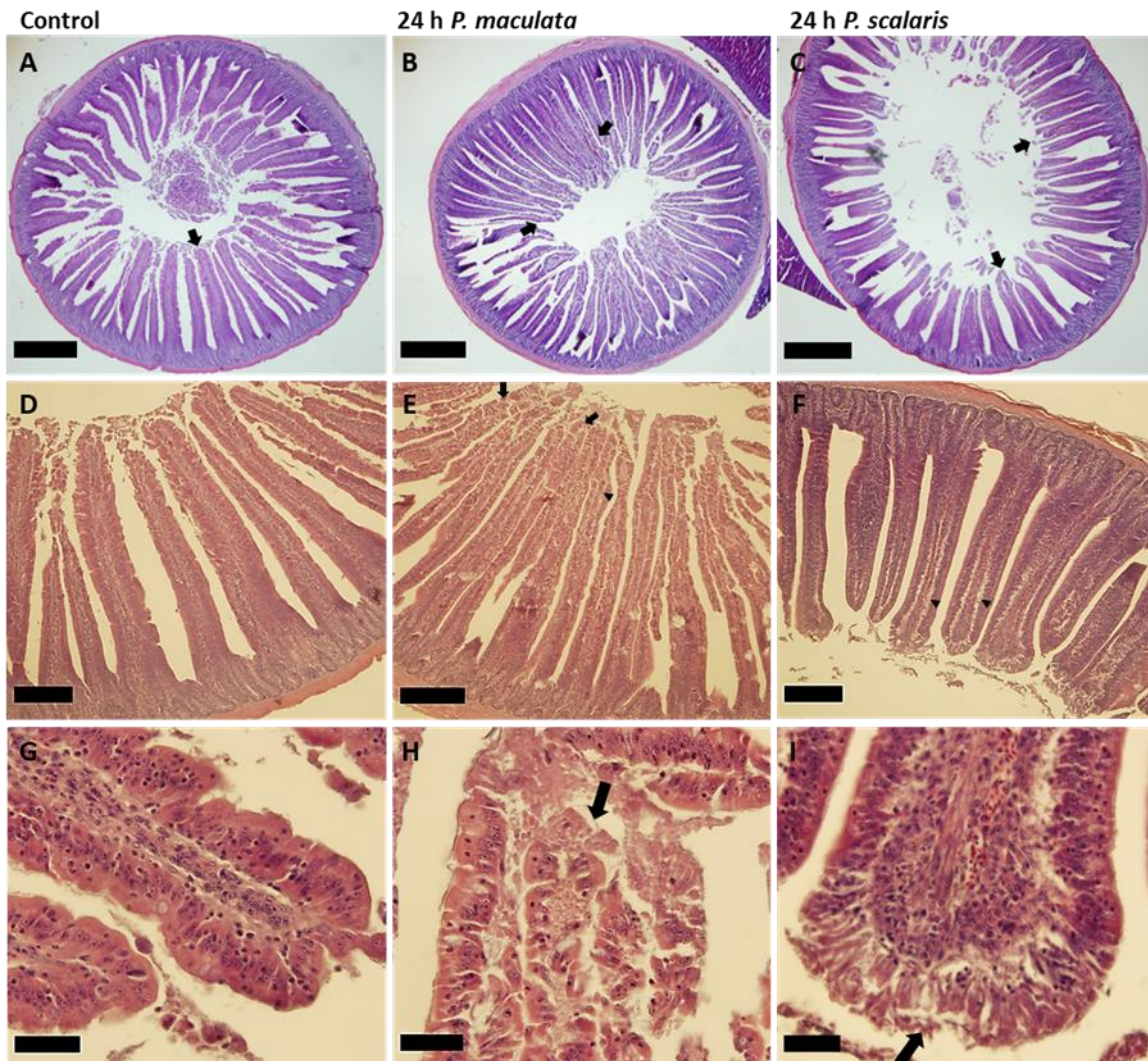
La inyección intraperitoneal del ESF de *P. canaliculata*, no provocó mortalidad entre las ranas ni cambios comportamentales, aun habiéndoles inyectado una dosis 50 veces mayor que la LD<sub>50</sub> determinada para ratones, impidiendo realizar el cálculo de la LD<sub>50</sub> para ranas. Las ranas se observaron durante 96 h para evaluar la presencia de signos neurológicos compatibles con los previamente reportados para ratones incluyendo letargia, debilidad muscular y parálisis de las extremidades posteriores. Sin embargo, no se observaron ninguno de estos signos o cualquier otro cambio comportamental en estos animales.

### 6.3.5 Efecto sobre la morfología del digestivo de codornices

Para evaluar el efecto que produce la ingesta de huevos de *Pomacea* sobre el sistema digestivo de las aves, se les administró oralmente ESF de *P. maculata* o de *P. scalaris* a grupos de codornices. Luego de 24 h post ingestión, el intestino de las codornices tratadas con ESF de *P. maculata* mostró una alteración en su morfología general (Fig. 34 A y B), el epitelio intestinal se mostró discontinuo (Fig. 34 D y E) y un posible aumento en el número de células caliciformes (Fig. 35). El intestino de las aves tratadas con ESF de *P. scalaris* también mostró alteraciones morfológicas respecto del control (Fig. 34 C). Sin embargo, no se observaron cambios en la continuidad del epitelio ni en el número de células caliciformes (Fig. 34 F, Fig. 35). Independientemente del ESF administrado, luego de 24 h de la ingestión, el intestino delgado de las codornices mostró degeneración y muerte de los enterocitos, principalmente de aquellos ubicados en el extremo de las vellosidades intestinales, en los que se observó integridad celular, pero sin núcleo evidente (necrosis coagulativa con cariólisis) (Fig. 34 G-I). Más aún, se observó en algunos casos que los enterocitos del extremo de las vellosidades se perdieron por completo. También se observó hiperemia de la arteriola de la vellosidad intestinal y edema subepitelial (Fig. 34 E y F, Fig. 35). Así mismo, se detectó infiltración de linfocitos, células mononucleares y algunos eosinófilos en el corion de la vellosidad.

A las 48 h posteriores a la administración de ESF de *P. maculata* se observó una reducción del edema subepitelial en las vellosidades y desaparición del tejido necrótico. En el caso de los animales sacrificados a las 48 h de la administración de ESF de *P. scalaris*, aun se observa hiperemia aunque con una reducción significativa del edema. A diferencia de los intestinos

tratados con ESF de *P. maculata*, en aquellos tratados con ESF de *P. scalaris*, 48 h post administración aún se observan células con necrosis coagulativa en las vellosidades, aunque ya se observa una recuperación respecto de los animales sacrificados 24 h post ingesta.



**Figura 34. Morfología del intestino delgado de codornices tras 24 h de la administración de ESF de dos especies de *Pomacea*.** A. Sección control. B. Sección representativa de animales tratados con ESF de *P. maculata*. C. Sección representativa de los animales tratados con ESF de *P. scalaris*. Las flechas indican vellosidades con morfología típica para el tratamiento correspondiente. D. Sección control donde se observa epitelio continuo y ausencia de edema. E. Tratado con ESF de *P. maculata*. Se observa epitelio discontinuo (flechas) y edema subepitelial en las vellosidades (puntas de flecha). F. Tratado con ESF de *P. scalaris*. Se observa epitelio continuo y edema subepitelial (puntas de flecha). G. Control donde se observa morfología normal de la punta de la vellosidad intestinal. H. Tratado con ESF de *P. maculata*, las flechas indican degradación y muerte celular (necrosis con cariólisis.) I. idem H pero tratado con ESF de *P. scalaris*. A-C: barra= 500  $\mu$ m (magnificación 4x), D-F: barra= 300  $\mu$ m (magnificación 10x), G-I: barra= 40  $\mu$ m (magnificación 60x).

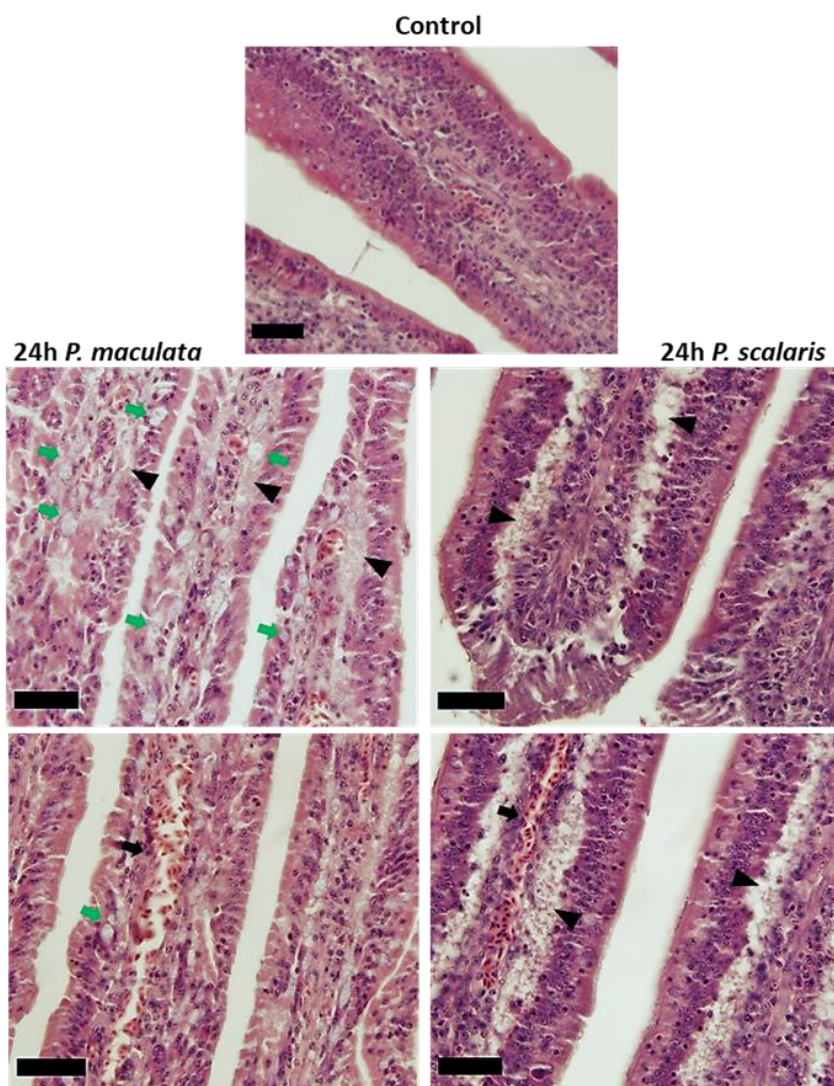


Figura 35. Detalle de células caliciformes, edema e hiperemia de la arteriola central en las vellosidades del intestino delgado de codornices luego de 24 h de la administración de ESF de *P. maculata* (columna izquierda) y *P. scalaris* (columna derecha). Las puntas de flecha indican edema, las flechas negras indican hiperemia, flechas verdes indican células caliciformes. Barra= 40  $\mu$ m

### 6.3.6 Morfometría de las vellosidades intestinales de codornices

Los intestinos del grupo tratado 24 h con ESF de *P. maculata* no mostraron diferencias significativas en la longitud de las vellosidades (Media  $63.27 \pm 6.52$  SD) en relación a la longitud control (Media  $61.17 \pm 5.12$  SD). Por el contrario, si se hallaron diferencias significativas en el ancho de la vellosidad, siendo las vellosidades tratadas más angostas (Media  $6.94 \pm 1.42$  SD) que las de los controles (Media  $8.60 \pm 01.66$  SD). Los animales tratados 24 h con ESF de *P. scalaris* también mostraron vellosidades alteradas, aunque en este caso con un acortamiento significativo (Media  $48.23 \pm 5.59$  SD) cuando se las compara

con la longitud de las vellosidades control ( $61.17 \pm 5.12$ ). Por el contrario, el ancho de las vellosidades no mostró alteraciones significativas (Media  $8.89 \pm 1.88$  SD) respecto del control (Media  $8.60 \pm 01.66$  SD). Luego de 24 h de tratamiento, el índice de amplificación de la superficie absortiva del intestino delgado no mostró diferencias significativas entre control y tratamientos.

En el caso de los grupos tratados 48 h, ya sea con ESF de *P. maculata* o *P. scalaris*, no se hallaron diferencias significativas respecto del control en cuanto a la morfometría de las vellosidades intestinales.

#### 6.4 Discusión

Es esperable que la intensa depredación actúe seleccionando las características que hacen a los huevos no comestibles o por lo menos más difíciles de digerir. En este sentido, en los huevos de *Pomacea* han evolucionado un conjunto de defensas bioquímicas únicas para evitar la depredación, cuyos efectos nocivos están estudiados en roedores (Dreon et al. 2013, 2014). En este capítulo extendemos a otros taxones el conocimiento del efecto de la ingesta de huevos por de potenciales depredadores, demostrando que la ingestión de extractos de los huevos de *Pomacea* también afectan el sistema digestivo de un anfibio y un ave.

Los estudios en ratones mostraron que tanto el FPV de *P. canaliculata* como el de *P. maculata* tiene un efecto neurotóxico letal a las pocas horas de la inyección intrapritoneal (Giglio et al. 2020; Heras et al. 2008). Efectos tóxicos similares fueron observados en codornices inyectadas con FPV de *P. maculata* (Giglio 2019, Tesis Doctoral). En contraste, la inyección intraperitoneal de la ESF de *P. canaliculata* en ranas toro no tuvo efecto letal, aún en concentraciones 25 veces mayores a la que produce mortalidad en el 100% de ratones. Inclusive, mientras que las dosis subletales producen parálisis del tren posterior, letargia y dolor en ratones, ninguno de estos signos neurológicos se observó en ranas. Estos resultados sugieren que la célula o molécula blanco de PcPV2, la lectina tóxica responsable de estos efectos en ratones (Dreon et al. 2013), se encuentra ausente en ranas toro.

A pesar de estas diferencias en cuanto a letalidad, la administración de ESF afectó el tracto gastrointestinal tanto de ranas toro como de codornices. Luego de 24 h de la ingestión de

ESF, la morfología del intestino sufrió varios cambios: en ranas toro indujo un aumento del tejido conectivo en la lámina propia de las vellosidades causando la obstrucción de los vasos linfáticos centrales, y una marcada desorganización epitelial en las puntas de las vellosidades. Además, las vellosidades intestinales se vieron aplanadas y el aumento del tejido conectivo fue tal que impidió la individualización de las mismas. Hasta donde llega nuestro conocimiento, no hay reportes de tales efectos inducidos por potenciales presas en otros anuros, lo que limita las comparaciones. En líneas generales, muchos de estos cambios morfológicos en el intestino recuerdan a los ejercidos tras la exposición a compuestos tóxicos antropogénicos en la herpetofauna (Çakici 2014; Çakici & Akat 2012; Çakici 2016; Özelmas & Akay 1995) y más recientemente, un estudio muestra efectos similares tras la ingesta de lectina de semillas de soja en ranas toro (Yang et al. 2019). En cuanto al efecto sobre las aves, se observan cambios en la morfometría de las vellosidades, aunque llamativamente los efectos inducidos por la ESF de *P. maculata* y *P. scalaris* fueron opuestos, apoyando una vez más los resultados del capítulo 5 que indican que estos caracoles presentan defensas clado-específicas. Los efectos observados en la morfometría del intestino podrían atribuirse a la presencia de las lectinas en el huevo, ya que por ejemplo, se han observado cambios similares en el intestino de pavos domésticos (*Meleagris gallopavo*) tras ingerir alimento conteniendo lectinas de soja (Casaubon-Huguenin et al. 2004; Fasina et al. 2006). En conjunto, los efectos observados tanto en las ranas como en las aves en nuestros experimentos se parecen en gran medida a los reportados por la ingestión de lectinas de plantas (Peumans & Van Damme 1995; Vasconcelos & Oliveira 2004), que afectan la morfofisiología del tracto gastrointestinal, al menos, de mamíferos e insectos (Bardocz et al. 1995; Dreon et al. 2014; Oliveira et al. 2004). Hasta el momento, el único animal en el que se ha descrito tal mecanismo defensivo es *Pomacea* (Dreon et al. 2014; Pasquevich et al. 2017, capítulo 4). Los cambios en el intestino de roedores son atribuidos a la combinación de inhibidores de proteasas (Ituarte et al. 2019) y lectinas enterotóxicas (Dreon et al. 2014; Giglio et al. 2020), y posiblemente estos mismos compuestos sean los responsables del efecto observado en anuros y aves. En este sentido, PcPV2 se une de manera específica en experimentos *in vivo* a las membranas de los enterocitos de ranas (este capítulo) y de ratas, y también lo hace a células Caco-2 en cultivos (Dreon et al. 2013).

Los enterocitos de rana expuestos a la ESF de *P. canaliculata* mostraron alteraciones en su patrón de glicosilación, mayormente revelado por el cambio en la reactividad de las lectinas DBA, SBA y PNA. Este estudio provee una de las pocas descripciones sobre el patrón de glicanos presente en el intestino de los anfibios. Los estudios empleando histoquímica con lectinas en el sistema digestivo de anuros son muy escasos (Kaptan et al. 2013), por lo cual nos vemos limitados a la hora de poder hacer comparaciones. Nuestros resultados sugieren que la ESF induce cambios reversibles en la glicosilación de los enterocitos. Cambios similares han sido reportados en ratas alimentadas con ESF de *P. canaliculata* (Dreon et al. 2014) y de *P. scalaris* (capítulo 4).

Por otro lado, observamos que la ingestión de extractos de huevos induce además inflamación reversible del intestino en aves y anuros (este capítulo). Se sabe que la inflamación del tracto digestivo puede estar inducida por diversos estresores fisiológicos incluyendo la dieta, la perturbación del hábitat, la competencia por los recursos, los parásitos y la contaminación (Cardoso Dal Pont et al. 2020; Robert et al. 2014). De hecho, la ESF indujo una respuesta inflamatoria en el intestino 24 h posteriores a la alimentación forzada en ambos taxones, aunque no fue exactamente la misma: en ranas toro, produjo un incremento notable en el número de eosinófilos y macrófagos tanto en la lámina propia como en epitelio del digestivo. Esta reacción celular y el incremento de tejido conectivo asociado pueden estar relacionados al ensanchamiento de las vellosidades y compresión del vaso linfático central. Las alergias inducen este tipo de respuesta celular (McGavin & Zachary 2017), aunque nuestros resultados actuales impiden hacer mayores especulaciones. Efectos inflamatorios similares con infiltración de eosinófilos y otras células reactivas han sido reportados tras la ingestión de pesticidas en ranas (Çakici 2014; Cengiz & Unlu 2006; Velmurugan et al. 2007). Por el contrario, en aves la respuesta inflamatoria frente a la ingestión de ESF fue el edema y la hiperemia de las vellosidades intestinales. Si bien la reacción inflamatoria aguda en las aves comúnmente incluye edema, congestión y cambios vasculares (Shivaprasad 2014), este conjunto de síntomas asociados al tracto digestivo por un alimento sólo ha sido reportado tras la ingestión de bellotas verdes en *Columba domestica* (Meiser et al. 2000). Llamativamente, no se observó proceso inflamatorio en ratas alimentadas con ESF bajo las mismas condiciones experimentales (Dreon et al. 2013, 2014, capítulo 4).

En general, los resultados de este estudio sugieren que 48 h posteriores a la alimentación forzada con ESF, los animales parecen adaptarse a los componentes tóxicos del huevo. Efectos similares fueron observados en ratas (Dreon et al. 2013, 2014, capítulo 4), y en ratas y cerdos que ingieren lectinas de plantas (Bardocz et al. 1995; Thomsson et al. 2007; Vasconcelos & Oliveira 2004). Considerando que la anatomía y función del tracto digestivo de muchas especies de vertebrados es flexible y puede cambiar en respuesta a las condiciones ambientales (Karasov & Douglas 2013, Brzęk et al. 2011), podemos sugerir que los tres taxones evaluados hasta el momento tienen una rápida respuesta adaptativa. Esto es posible gracias a que el tracto digestivo de los vertebrados tiene la tasa de recambio más rápida de todos los órganos del cuerpo y, al menos en mamíferos, toma solo 3 días cubrir toda la superficie con nuevas células. Igualmente, estudios sobre la plasticidad intestinal en anfibios (Cramp & Franklin 2005; Naya et al. 2005; Ruthsatz et al. 2019; Seliverstova & Prutskova 2012), y en aves (McWilliams & Karasov 2001; Ricklefs 1996), muestran que tienen mecanismos adaptativos que modifican rápidamente el fenotipo del tracto digestivo cuando es necesario. Nuestros hallazgos son consistentes con este conocimiento, mostrando además que tanto anfibios como aves son capaces de responder adaptativamente frente a la ingestión de huevos tóxicos mediante una remodelación rápida del intestino. A pesar de esta rápida adaptación, podemos especular que los efectos adversos observados a las pocas horas, combinados con el bajo valor nutritivo son suficientes para disuadir al potencial depredador de consumir otras puestas. Hasta donde sabemos, no hay estudios de una respuesta del sistema digestivo similar frente a la ingesta de una presa, ni en anfibios ni en aves.

## 6.5 Conclusiones

Este estudio provee la primera descripción de los efectos sobre el tracto digestivo de potenciales consumidores no mamíferos de los huevos de *Pomacea*. Hemos demostrado que estos huevos presentan defensas bioquímicas que alteran el tracto digestivo de más de un tipo de depredador vertebrado, que hasta el momento incluye roedores, anfibios y aves. Estas defensas operan sobre la morfofisiología del epitelio digestivo a través de un mecanismo muy similar al de las defensas de plantas contra la herbivoría, siendo *Pomacea* el único género de animales con estas características. Finalmente, estas defensas tóxicas



probablemente son advertidas a los posibles consumidores mediante una señal aposemática y, este estudio nos invita a hacer algunas especulaciones al respecto. Dadas las diferencias observadas en los efectos producidos por las especies del clado *canaliculata* y el clado *bridgesii* (considerando a los huevos de ambos clados nocivos) y la similitud en su coloración externa, podríamos pensar que los huevos de estos clados se comportan con mimetismo Mülleriano, donde ambas especies potencian y se benefician de los efectos nocivos sobre sus depredadores. Si bien hacen falta estudios respecto del color *per se* y sobre cómo los depredadores son capaces de distinguir y aprender sobre esta señal, es evidente que los huevos de estos caracoles cumplen con varias de las características de las especies aposemáticas.

## 7 Conclusiones generales

Los huevos de los gasterópodos han sido poco estudiados hasta el momento, sobre todo desde la perspectiva de sus mecanismos de defensa. Esta tesis profundiza el conocimiento respecto de las defensas bioquímicas presentes en los huevos de diferentes especies de *Pomacea*. En este sentido, provee una de las pocas caracterizaciones estructurales y funcionales de lectinas de moluscos. Así, las lectinas PsSC de *P. scalaris* y PdPV1 de *P. diffusa*, representan un aporte novedoso al conocimiento respecto de este tipo de proteínas, siendo su estructura primaria única entre las lectinas descritas tanto del reino animales como en plantas. La elevada identidad de secuencia entre ambas lectinas y la similitud en su especificidad de reconocimiento, que no han sido descritas en otras lectinas conocidas, podría indicar que estamos ante la presencia de una nueva familia de lectinas, aunque son necesarios más estudios de su estructura terciaria y plegamiento para confirmarlo. Desde un punto de vista evolutivo, representan un aporte al género *Pomacea*. El aislamiento y caracterización de la carotenoproteína de *P. diffusa* permitió realizar las primeras generalizaciones respecto de los componentes del FPV del clado bridgesii y de las PV1s del género, brindando las primeras evidencias de la existencia de defensas contra la depredación clado-específicas que podrían estar relacionadas con sus potenciales de invasividad y su evolución. Así, el mecanismo de defensa del clado invasor y más diversificado canaliculata involucra la presencia de una PV1 antinutritiva y una PV2 neuro y enterotóxica, mientras que el clado no invasor y menos diversificado bridgesii carece de PV2 y su PV1 es una lectina antinutritiva. A su vez, se demostró que PsSC afecta la morfofisiología del tracto digestivo de roedores, extendiendo así el conocimiento previo de la presencia de defensas antidepredador de este tipo a una especie del clado bridgesii. Se halló también que las defensas bioquímicas presentes en los huevos de *Pomacea*, afectan a potenciales depredadores de distintos taxones, ampliando por primera vez la información sobre los blancos de ataque sobre vertebrados a aves y anfibios, además de los mamíferos. Se profundiza en este trabajo en la hipótesis de que los efectos sobre el tracto digestivo tras la ingestión de los huevos son similares a los descritos en plantas como defensa contra la herbívora, indicando un fenómeno de convergencia evolutiva. Este mecanismo no se ha reportado previamente en otros animales fuera del género *Pomacea*. También se realiza un aporte desde un punto de vista ecológico-evolutivo, ya que estos resultados sugerirían la presencia de un mecanismo *honesto* de señalización y advertencia

del contenido potencialmente nocivo de los huevos a distintos depredadores, al menos, mediante la coloración llamativa de las puestas, donde las carotenoproteínas PV1 jugarían un papel central. Esto abre nuevas perspectivas para el estudio de los parámetros de coloración de los huevos y su solapamiento con el espacio de color percibido por los posibles depredadores. La presencia de aposematismo en los huevos de estas especies bien podría ayudar a explicar la ausencia de depredadores reportados. Este trabajo muestra que las defensas de los clados *bridgesii* y *canaliculata* son diferentes entre sí. En este sentido, la variabilidad en la toxicidad de las especies hace potencialmente difícil para un depredador predecir a través de la señal visual la cantidad de toxina que ingeriría, por lo cual los depredadores reducirían su tasa de ataque hacia ellos, tal vez, para reducir el riesgo de comer una presa muy bien defendida (Skelhorn et al. 2016). Además, los depredadores son capaces de aprender no solo sobre la cantidad de tóxicos presentes sino también sobre el contenido de nutrientes, consintiendo el consumo de presas nocivas cuando su contenido nutricional es elevado (Halpin et al. 2014). En este sentido, los huevos de *Pomacea* no solo contienen componentes tóxicos, sino que además las proteínas mayoritarias y los polisacáridos de su FPV son no digeribles, reduciendo el valor nutricional de los huevos. Es necesario realizar más estudios en esta dirección, por ejemplo, respecto del modo de aprendizaje sobre esta señal, la densidad de presas simpátricas con *Pomacea*, la presencia de otras defensas secundarias como olores o no palatabilidad, etc para comenzar a comprender la significancia ecológica del color en este género y tener un conocimiento más acabado de las defensas tan particulares de estos animales.

## 8 Referencias

- Akmentins MS, Cardozo DE. 2010. American bullfrog *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) invasion in Argentina. *Biol. Invasions*. 12(4):735–37
- Albrecht EA, Carreño NB, Castro-Vazquez A. 1996. A quantitative study of copulation and spawning in the South American apple-snail, *Pomacea canaliculata* (Prosobranchia: Ampullariidae). *Veliger*. 39(2):142–47
- Alpuche J, Pereyra A, Mendoza-Hernandez G, Agundis C, Rosas C, Zenteno E. 2010. Purification and partial characterization of an agglutinin from *Octopus maya* serum. *Comp Biochem. B Biochem*. 156(1):1–5
- Arenas LM, Troscianko J, Stevens M. 2014. Color contrast and stability as key elements for effective warning signals. *Front. Ecol. Evol*. 2(JUN):1–12
- Arndt NX, Tiralongo J, Madge PD, von IM, Day CJ. 2011. Differential carbohydrate binding and cell surface glycosylation of human cancer cell lines. *J Cell Biochem*. 112(9):2230–40
- Baldo BA, Uhlenbruck G. 1974. Studies on the Agglutinin Specificities and Blood Group O(H)-Like Activities in Extracts from the Molluscs *Pomacea paludosa* and *Pomacea urceus*. *Vox Sang*. 27(1):67–80
- Bancroft JD, Gamble M. 2008. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 6th ed. Edinbugh: Churchill Livingstone.
- Bardocz S, Grant G, Ewen SW, Duguid TJ, Brown DS, et al. 1995. Reversible effect of phytohaemagglutinin on the growth and metabolism of rat gastrointestinal tract. *Gut*. 37(3):353–60
- Barnes MA, Fordham RK, Burks RL, Hand JJ. 2008. Fecundity of the exotic applesnail, *Pomacea insularum*. *J. N. Am. Benthol. Soc*. 27(3):738–45
- Belogortseva N, Molchanova V, Kurika A, Skobun A, Glazkova V. 1998. Isolation and characterization of new GalNAc/Gal-specific lectin from the sea mussel *Crenomytilus grayanus*. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*. 119(1):45–50

- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–74
- Brzęk P, Kohl KD, Caviedes-Vidal E, Karasov WH. 2011. Fully reversible phenotypic plasticity of digestive physiology in young house sparrows: Lack of long-term effect of early diet composition. *J. Exp. Biol.* 214(16):2755–60
- Burela S, Martín PR. 2011. Evolutionary and functional significance of lengthy copulations in a promiscuous apple snail, *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae). *JMS.* 77:54–64
- Burks RL, Kyle CH, Trawick MK. 2010. Pink eggs and snails: field oviposition patterns of an invasive snail, *Pomacea insularum*, indicate a preference for an invasive macrophyte. *Hydrobiologia.* 646(1):243–51
- Cadierno MP, Burela S, Dreon MS, Martín PR, Heras H. 2017a. The influence of energy, nutritional value and noxiousness of prey in sex- and size-biased predation by Snail Kites in southern South America. *Emu.* 117(4):382–87
- Cadierno MP, Dreon MS, Heras H. 2017b. Validation by qPCR of reference genes for reproductive studies in the invasive apple snail *Pomacea canaliculata*. *Malacologia.* 62(1): 163-170
- Cadierno MP, Saveanu L, Dreon MS, Martín PR, Heras H. 2018. Biosynthesis in the albumen gland-capsule gland complex limits reproductive effort in the invasive apple snail *Pomacea canaliculata*. *Biol. Bull.* 235(1):1–11
- Çakıcı Ö. 2014. Carbaryl-induced Histopathologic Alterations in the Digestive Tract of the Levantine Frog, *Pelophylax bedriagae* (Anura: Ranidae). *Toxicol. Pathol.* 42(6):1032–40
- Çakıcı Ö, Akat E. 2012. Histopathological effects of carbaryl on digestive system of snake-eyed lizard, *Ophisops elegans*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 88(5):685–90
- Çakıcı Ö. 2016. Histopathological study of toxic effects of carbaryl on digestive tract of *Bufo variabilis* (Anura: Bufonidae). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23(13):13432–37

- Cardoso Dal Pont G, Farnell M, Farnell Y, Kogut MH. 2020. Dietary factors as triggers of low-grade chronic intestinal inflammation in poultry. *Microorganisms*. 8(1):1–10
- Carlsson Nils OL, Brönmark C, Hansson LA. 2004. Invading Herbivory: The golden apple snail alters ecosystem functioning in Asian wetlands. *Ecology*. 85(6):1575–80
- Carlsson Nils OL, Re JO. 2005. Herbivory on aquatic vascular plants by the introduced golden apple snail (*Pomacea canaliculata*) in Lao PDR. *Biol. Invasions*. 7(2):233–41
- Casaubon-Huguenin M, Ávila-González E, Vazquez-Pelaez C, Trigo F, Lascurain R, Zenteno E. 2004. The effect of raw full-fat soybean and its lectin on the nutrition and pigmentation of broilers. *J. Agric. Food Chem*. 52(18):5702–8
- Catalán M, Dreon MS, Heras H, Pollero RJ, Fernández SN, Winik B. 2006. Pallial oviduct of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda): Ultrastructural studies of the parenchymal cellular types involved in the metabolism of perivitellins. *Cell Tissue Res*. 324(3): 523–533
- Catalán NM, Fernández SN, Winik BC. 2002. Oviductal structure and provision of egg envelopes in the apple snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda, Prosobranchia, Ampullariidae). *Biocell*. 26:91–100
- Cazzaniga NJ. 2002. Old species and new concepts in the taxonomy of *Pomacea* (Gastropoda: Ampullariidae). *Biocell*. 26(1):71–81
- Cengiz EI, Unlu E. 2006. Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish, *Gambusia affinis*: A microscopic study. *Environ. Toxicol. Pharmacol*. 21(3):246–53
- Cheesman DF. 1958. Ovorubin, a chromoprotein from the eggs of the gastropod mollusc *Pomacea canaliculata*. *Proc. R. Soc. B*. 149:571–87
- Cheesman DF, Lee WL, Zagalsky PF. 1967. Carotenoproteins in invertebrates. *Biol. Rev*. 42:132–60
- Chickalovets I, Kovalchuk S, Litovchenko AP, Molchanova VI, Pivkin M V, Chernikov O V. 2016. A new Gal/GalNAc-specific lectin from the mussel *Mytilus trossulus*: Structure, tissue specificity, antimicrobial and antifungal activity. *Fish Shellfish Immunol*. 50:27–

- Cowie RH. 2002. Apple snails (Ampullariidae) as agricultural pests: Their biology, impacts, and management. In *Molluscs as Crop Pests*, ed. GM Baker, pp. 145–92. Wallingford: CABI
- Cowie RH, Hayes KA. 2012. Apple snails. In *A Handbook of Global Freshwater Species*, ed. R Francis. London: Earthscan
- Cowie RH, Hayes KA, Thiengo SC. 2006. What are apple snails? Confused taxonomy and some preliminary resolution. In *Global Advances in Ecology and Management of Golden Apple Snails*, eds. J RC, Sebastian LS, pp. 3–24. Nueva Ecija: Philippine Rice Research Institute
- Cramp RL, Franklin CE. 2005. Arousal and re-feeding rapidly restores digestive tract morphology following aestivation in green-striped burrowing frogs. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 142(4):451–60
- Cuthill IC, Allen WL, Arbuckle K, Caspers B, Chaplin G, et al. 2017. The biology of color. *Science (80-. ).* 357:470
- D'Orbigny A. 1846. Voyage dans l'Amérique méridionale (le Brésil, la République orientale de l'Uruguay, la République Argentine, la Patagonie, la République du Chili, la République de Bolivia, la République du Pérou)
- De Jong-Brink M, Boer HH, Joose J. 1983. Mollusca. In *Reproductive Biology of Invertebrates, Vol. 1. Oogenesis, Oviposition and Oosorption*, eds. KG Adiyodi, RG Adiyodi. John Wiley and Sons
- Denizot F, Lang R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Meth.* 89:271–77
- Deutscher MP. 1990. Section II. General methods for handling proteins and enzymes. In *Guide to Protein Purification. Methods in Enzymology*, ed. MP Deutscher. New York: Academic Press
- Diella F, Cameron S, Gemund C, Linding R, Via A, et al. 2004. Phospho.ELM: a database of



- experimentally verified phosphorylation sites in eukaryotic proteins. *BMC Bioinformatics*. 5:79
- Dreon MS, Lavarias S, Garin CF, Heras H, Pollero RJ. 2002. Synthesis, distribution, and levels of an egg lipoprotein from the apple snail *Pomacea canaliculata* (mollusca: Gastropoda). *J. Exp. Zool.* 292(3):323-330
- Dreon MS, Ceolín M, Heras H. 2007. Astaxanthin binding and structural stability of the apple snail carotenoprotein overubin. *Arch. Biochem. Biophys.* 460(1):107-112
- Dreon MS, Fernández PE, Gimeno EJ, Heras H. 2014. Insights into embryo defenses of the invasive apple snail *Pomacea canaliculata*: Egg mass ingestion affects rat Intestine morphology and growth. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8(6):e2961
- Dreon MS, Frassa MV, Ceolín M, Ituarte S, Qiu J-W, et al. 2013. Novel animal defenses against predation: A snail egg neurotoxin combining lectin and pore-forming Chains that resembles plant defense and bacteria attack toxins. *PLoS One*. 8(5):e63782
- Dreon MS, Heras H, Pollero RJ. 2003. Metabolism of overubin, the major egg lipoprotein from the apple snail. *Mol. Cell. Biochem.* 243(1-2):9-14
- Dreon MS, Heras H, Pollero RJ. 2004a. Characterization of the major egg glycolipoproteins from the perivitellin fluid of the apple snail *Pomacea canaliculata*. *Mol. Reprod. Dev.* 68(3):359-364
- Dreon MS, Ituarte S, Ceolín M, Heras H. 2008. Global shape and pH stability of overubin, an oligomeric protein from the eggs of *Pomacea canaliculata*. *FEBS J.* 275(18):4522-4530
- Dreon MS, Ituarte S, Heras H. 2010. The role of the proteinase inhibitor overubin in apple snail eggs resembles plant embryo defense against predation. *PLoS One*. 5(12):e15059
- Dreon MS, Schinella G, Heras H, Pollero RJ. 2004b. Antioxidant defense system in the apple snail eggs, the role of overubin. *Arch. Biochem. Biophys.* 422(1):1-8
- Dubois M, Gilles K, Hamilton J, Rebers P, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28:350-56

- Duffey SS, Stout MJ. 1996. Antinutritive and toxic components of plant defense against insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 32(1):3–37
- Echan LA, Speicher DW. 2002. Protein detection in gels using fixation. *Curr. Protoc. Protein Sci.* 29:10.5.1-10.5.18
- Edgard RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32(5):1792–97
- Edmunds M. 1974. *Defence in Animals: A Survey of Antipredator Defences*. Harlow, Essex: Longman
- Endler JA, Mappes J. 2004. Predator mixes and the conspicuousness of aposematic signals. *Am. Nat.* 163:532–47
- Estebenet AL, Cazzaniga NJ. 1993. Egg variability and the reproductive strategy of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullaridae). *Apex.* 8(4):129–38
- Estebenet AL, MARTÍN PR. 2002. *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae): life-history traits and their plasticity. *Biocell.* 26:83–89
- Fasina YO, Classen HL, Garlich JD, Black BL, Ferket PR, et al. 2006. Response of turkey poults to soybean lectin levels typically encountered in commercial diets. 2. Effect on intestinal development and lymphoid organs. *Poult. Sci.* 85(5):870–77
- Frassa MV, Ceolín M, Dreon MS, Heras H. 2010. Structure and stability of the neurotoxin PV2 from the eggs of the apple snail *Pomacea canaliculata*. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* 1804(7):1492–99
- Fujii Y, Dohmae N, Takio K, Kawsar SMA, Matsumoto R, et al. 2012. A lectin from the mussel *Mytilus galloprovincialis* has a highly novel primary structure and induces glycan-mediated cytotoxicity of globotriaosylceramide-expressing lymphoma cells. *J. Biol. Chem.* 287(53):
- Gabor F, Stangl M, Wirth M. 1998. Lectin-mediated bioadhesion: binding characteristics of plant lectins on the enterocyte-like cell lines Caco-2, HT-29 and HCT-8. *J Control Release.* 55(2–3):131–42

- Garin CF, Heras H, Pollero RJ. 1996. Lipoproteines of the egg perivitelline fluid of *Pomacea canaliculata* snails (mollusca: gastropoda). *J. Exp. Zool.* 276(5):307–14
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, et al. 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In *The Proteomics Protocols Handbook*, ed. JM Walker, pp. 571–607. Humana Press
- Giglio ML, Ituarte S, Ibañez AE, Dreon MS, Prieto E, et al. 2020. Novel role for animal innate immune molecules: Enterotoxic activity of a snail egg MACPF-Toxin. *Front. Immunol.* 11(March):1–14
- Giglio ML, Ituarte S, Pasquevich MY, Heras H. 2016. The eggs of the apple snail *Pomacea maculata* are defended by indigestible polysaccharides and toxic proteins. . 785(September):777–85
- National Research Council. 2010. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 8th Edition. Washington, National Academies Press.
- Halpin CG, Skelhorn J, Rowe C. 2014. Increased predation of nutrientenriched aposematic prey. *Proc Biol Sci.* 281:20133255
- Halwart M. 1994. The golden apple snail *Pomacea canaliculata* in Asian rice farming systems: Present impact and future threat. *Int. J. Pest Manag.* 40(2):199–206
- Hammersley AP. 2016. 'FIT2D : a multi-purpose data reduction , analysis and visualization program. *J. Appl. Crystallogr.* 646–652
- Hayes KA, Burks RL, Castro-Vazquez A, Darby PC, Heras H, et al. 2015. Insights from an Integrated View of the Biology of Apple Snails (Caenogastropoda: Ampullariidae). *Malacolgia.* 58(1–2):245-302.
- Hayes KA, Cowie RH, Albrecht C, Thiengo SC. 2009a. Molluscan models in evolutionary biology: Apple snails (Gastropoda:Ampullariidae) as a system for addressing fundamental questions. *Am. Malacol. Bull.* 27(47):58
- Hayes KA, Cowie RH, Thiengo SC. 2009b. A global phylogeny of apple snails: Gondwanan origin, generic relationships, and the influence of outgroup choice (Caenogastropoda: Ampullariidae). *Biol. J. Linn. Soc.* 98(1):61–76

- Hayes KA, Cowie RH, Thiengo SC, Strong EE. 2012. Comparing apples with apples: Clarifying the identities of two highly invasive Neotropical Ampullariidae (Caenogastropoda). *Zool. J. Linn. Soc.* 166(4):723–53
- Hayes KA, Joshi RC, Thiengo SC, Cowie RH. 2008. Out of South America: Multiple origins of non-native apple snails in Asia. *Divers. Distrib.* 14(4):701–12
- Heras H, Dreon MS, Ituarte S, Pollero RJ. 2007. Egg carotenoproteins in neotropical Ampullariidae (Gastropoda: Architaenioglossa). *Comp. Biochem. Physiol. C* 146:158–67
- Heras H, Frassa MV, Fernández PE, Galosi CM, Gimeno EJ, Dreon MS. 2008. First egg protein with a neurotoxic effect on mice. *Toxicol.* 52(3):481–488
- Heras H, Garin CF, Pollero RJ. 1998. Biochemical composition and energy sources during embryo development and in early juveniles of the snail *Pomacea canaliculata* (Mollusca: Gastropoda). *J. Exp. Zool.* 280(6):375–83
- Heras H, Pollero RJ. 2002. Lipoproteins from plasma and perivitellin fluid of the apple snail *Pomacea canaliculata*. *Biocell.* 26(1):111–18
- Hirabayashi J. 2014. *Lectins Methods and Protocols*. Springer International Publishing
- Hirai T. 2004. Diet composition of introduced bullfrog, *Rana catesbeiana*, in the Mizorogaike Pond of Kyoto, Japan. *Ecol. Res.* 19(4):375–80
- Hylton Scott MI. 1957. Anotaciones sobre la morfología de *Tropicorbis peregrinus* (D'Orb.). *Rev. Mus. La Plata.* 7:1–22
- Iakoucheva LM, Radivojac P, Brown CJ, O'Connor TR, Sikes JG, et al. 2004. The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. *Nucleic Acids Res.* 32(3):1037–49
- Ip JC, Mu H, Chen Q, Sun J, Heras H, et al. 2018. AmpuBase: A transcriptomic database of eight species of apple snails (Gastropoda: Ampullariidae). *Gigascience.* 19(1):179
- Ip JCH, Mu H, Zhang Y, Heras H, Qiu J. 2020. Egg perivitelline fluid proteome of a freshwater snail (Caenogastropoda): insight into the transition from aquatic to terrestrial egg deposition. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 30:0–2

- Ip JCH, Mu H, Zhang Y, Sun ., Heras H, et al. 2019. Understanding the transition from water to land: Insights from multi-omic analyses of the perivitelline fluid of apple snail eggs. *J Proteomics*. 194:79–88
- Ituarte S, Brola TR, Dreon MS, Sun J, Qiu JW, Heras H. 2019. Non-digestible proteins and protease inhibitors: Implications for defense of the colored eggs of the freshwater apple snail *Pomacea canaliculata*. *Can. J. Zool.* 97(6):558–66
- Ituarte S, Dreon MS, Ceolin M, Heras H. 2012. Agglutinating activity and structural characterization of Sclarin, the major egg protein of the snail *Pomacea scalaris* (d'Orbigny, 1832). *PLoS One*. 7(11):e50115
- Ituarte S, Dreon MS, Ceolín M, Heras H. 2008. Isolation and characterization of a novel perivitellin from the eggs of *Pomacea scalaris* (Mollusca, Ampullariidae). *Mol.Reprod.Dev.* 75(9):1441–48
- Ituarte S, Dreon MS, Pasquevich MY, Fernández PE, Heras H. 2010. Carbohydrates and glycoforms of the major egg perivitellins from *Pomacea* apple snails (Architaenioglossa: Ampullariidae). *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 157(1):66-72
- Jacques DA, Trewhella J. 2010. Small-angle scattering for structural biology-expanding the frontier while avoiding the pitfalls. *Protein Sci.* 19(4):642–57
- Jaroszewski L, Rychlewski L, Li Z, Li W, Godzik A. 2005. FFAS03: a server for profile–profile sequence alignments. *Nucleic Acids Res.* 33(2):W284–88
- Jayaprakash NG, Surolia A. 2017. Role of glycosylation in nucleating protein folding and stability. *Biochem J.* 474(14):2333–47
- Joshi RC, Sebastian L. 2006. Global advances in ecology and management of golden apple snails. , p. 588. Muñoz: Philippine Rice Research Institute
- Kamler E. 2005. Parent-egg-progeny relationships in teleost fishes: An energetics perspective. *Rev. Fish Biol. Fish.* 15(4):399–421
- Kaptan E, Sengezer Inceli M, Sancar Bas S. 2013. Lectin binding properties of liver, small intestine and tail of metamorphosing marsh frog (*Pelophylax ridibundus Pallas*

- 1771). *Acta Histochem.* 115(6):595–602
- Karasov WH, Douglas AE. 2013. Comparative digestive physiology. *Compr. Physiol.* 3(2):741–83
- Keawjam RS, Upatham E. 1990. Shell morphology, reproductive anatomy and genetic patterns of three species of apple snails of the genus *Pomacea* in Thailand. *J. Med. Appl. Malacol.* 2:45–57
- Kisielinski K, Willis S, Prescher A, Klosterhalfen B, Schumpelick V. 2002. A simple new method to calculate small intestine absorptive surface in the rat. *Clin. Exp. Med.* 2(3):131–35
- Kovalchuk SN, Chikalovets I V, Chernikov O V, Molchanova VI, Li W, et al. 2013. cDNA cloning and structural characterization of a lectin from the mussel *Crenomytilus grayanus* with a unique amino acid sequence and antibacterial activity. *Fish Shellfish Immunol.* 35(4):1320–24
- Kumar S. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35(6):1547–1549
- Lakowicz JR. 1999. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers
- López MA, Altaba CR, Andree KB, López V. 2010. First invasion of the apple snail *Pomacea insularum* in Europe. *Tentacle.* 18:26–28
- Lowe S, Browne M, Boudjelas S, De Poorter M. 2000. *100 of the World's Worst Invasive Alien Species A Selection from the Global Invasive Species Database*. Auckland, New Zealand: World Conservation Union (IUCN)
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall R. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265–75
- Lv S, Zhang Y, Chen SR, Wang LB, Fang W, et al. 2009. Human angiostrongyliasis outbreak in dali, china. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 3(9):e520
- Malham SK, Lacoste A, Gelebart F, Cueff A, Poulet SA. 2002. A first insight into stress-

- induced neuroendocrine and immune changes in the octopus *Eledone cirrhosa*. *Aquat. Living Resour.* 15:187–92
- Manning M, Colón W. 2004. Structural basis of protein kinetic stability: Resistance to sodium dodecyl sulfate suggests a central role for rigidity and a bias toward  $\beta$ -sheet structure. *Biochemistry.* 43(35):11248–11254
- Mappes J, Marples N, Endler JA. 2005. The complex business of survival by aposematism. *Trends Ecol. Evol.* 20(11):598–603
- Margolis J, Wrigley CW. 1975. Improvement of pore gradient electrophoresis by increasing the degree of crosslinking at high acrylamide concentration. *J. Chromatogram.* 106:204–209
- Martin PR, Estebenet A. 2002. Interpopulation variation in life history of *Pomacea canaliculata* (gastropoda: Ampullariidae) in southwestern Buenos Aires Province. Argentina. . 4(1):153–63
- Matsukura K, Okuda M, Cazzaniga NJ, Wada T. 2013. Genetic exchange between two freshwater apple snails, *Pomacea canaliculata* and *Pomacea maculata* invading East and Southeast Asia. *Biol. Invasions.* 15(9):2039–48
- McClelland J. 1979. Digestive system. In *Form and Function in Birds*, pp. 69–81. London: Academic Press
- McGavin MD, Zachary JF. 2017. Acute inflammation. In *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 6th ed., pp. 73–131. Missouri: Mosby-Else.
- McWilliams SR, Karasov WH. 2001. Phenotypic flexibility in digestive system structure and function in migratory birds and its ecological significance. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 128(3):577–91
- Meiser H, Hagedorn HW, Schulz R. 2000. Pyrogallol poisoning of pigeons caused by acorns. *Avian Dis.* 44(1):205–9
- Mertens HD, Svergun DI. 2010. Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering. *J. Struct. Biol.* 172(1):128–41

- Montes GS. 1996. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol Int.* 20(1):15–27
- Mu H, Sun J, Fang L, Luan T, Williams GA, Cheung SG, Wong CKC, Qiu JW. 2015. Genetic basis of differential heat resistance between two species of congeneric freshwater snails: insights from quantitative proteomics and base substitution rate analysis. *Jour. Prot. Res.* doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00462
- Mu H, Sun J, Heras H, Hou K. 2017. Data in Brief Dataset for the proteomic and transcriptomic analyses of perivitelline fluid proteins in *Pomacea* snail eggs. *Data Br.* 15:203–7
- Nathan S, Halina L. 2007. *Lectins*. 2nd ed. The Netherlands: Springer.
- Naya DE, Farfán G, Sabat P, Méndez MA, Bozinovic F. 2005. Digestive morphology and enzyme activity in the Andean toad *Bufo spinulosus*: Hard-wired or flexible physiology? *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 140(2):165–70
- Oliveira JT, Rios FJ, Vasconcelos IM, Ferreira F V, Nojosa GB, Medeiros DA. 2004. Cratylia argentea seed lectin, a possible defensive protein against plant-eating organisms: effects on rat metabolism and gut histology. *Food Chem Toxicol.* 42(11):1737–47
- Orr JR, Adamson GL, Lindgren FT. 1991. Preparative ultracentrifugation and analytic ultracentrifugation of plasma lipoproteins. In *Analyses of Fats, Oils and Lipoproteins*, ed. P EG, pp. 525–554. Champaign, Illinois: AOCS press
- Özelmas Ü, Akay MT. 1995. Histopathological investigations of the effects of malathion on dwarf lizards (*Lacerta parva*, Boulenger 1887). *Fundam. Appl. Toxicol.* 730–37
- Pasquevich MY, Dreon MS, Heras H. 2014. The major egg reserve protein from the invasive apple snail *Pomacea maculata* is a complex carotenoprotein related to those of *Pomacea canaliculata* and *Pomacea scalaris*. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 169(1):63-71
- Pasquevich MY, Dreon MS, Qiu J-W, Mu H, Heras H. 2017. Convergent evolution of plant and animal embryo defences by hyperstable non-digestible storage proteins. *Sci. Rep.* 7(15848)



- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods*. 8(10):785–86
- Petoukhov M V. 2012. New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis'. *J. Appl. Crystallogr.* 45(2):342–350
- Peumans WJ, Van Damme EJ. 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.* 109(2):347–52
- Pinto M, Robine-Leon S, Appay M-D. 1983. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell.* 47:8
- Pizani NV, Estebenet AL, Martín PR. 2005. Effects of submersion and aerial exposure on clutches and hatchlings of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *Amer. Malacol. Bull.* 20:55–63
- Ponder WF, Colgan DJ, Healy JM, Nützel A, Simone LRL, Strong EE. 2008. Caenogastropoda. In *Phylogeny and Evolution of the Mollusca*, pp. 331–83. Berkely: Press, University of California
- Portiansky EL, Alonso CR, Costa EF, Gimeno EJ. 2002. Collagenous and elastic system fibres in the aorta of cattle poisoned by *Solanum glaucophyllum*. *Vet. Rec.* 150(2):42–45
- Poulton EB. 1890. *The Colours of Animals: Their Meaning and Use Especially Considered in the Case of Insects*. London: Kegan Paul, Trench, Trubner and Co. Ltd
- Prokop O, Uhlenbruck G, Kohler W. 1968. A new source of antibody-like substances having anti-blood group specificity: A discussion on the specificity of *Helix* agglutinins. *Vox Sang.* 14(5):321–33
- Przeslawski R. 2004. A review of the effects of environmental stress on embryonic development within intertidal gastropod egg masses. *Moll.Res.* 24:43–63
- Pusztai A, Ewen SW, Grant G, Peumans WJ, Van Damme EJ, et al. 1995. Lectins and also bacteria modify the glycosylation of gut surface receptors in the rat. *Glycoconj J.* 12(1):22–35

- Rawlings TA, Hayes KA, Cowie RH, Collins TM. 2007. The identity, distribution, and impacts of non-native apple snails in the continental United States. *BMC Evol Biol.* 7:97
- Ricklefs RE. 1969. An analysis of nesting mortality in birds. *Smithson. Contrib. to Zool.* (9):1–48
- Ricklefs RE. 1996. Morphometry of the digestive tracts of some passerine birds. *Condor.* 98(2):279–92
- Ripoll C, Favery B, Lecomte P, Van Damme E, Peumans W, et al. 2003. Evaluation of the ability of lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*) to protect plants against root-knot nematodes. *Plant Sci.* 164(4):517–23
- Rodriguez C., Prieto G. I., Vega I. A., Castro-Vazquez A. 2019. Functional and evolutionary perspectives on gill structures of an obligate air-breathing, aquatic snail. *PeerJ.* 7 e7342.
- Robert J, Grayfer L, Edholm ES, Ward B, De Andino FJS. 2014. Inflammation-induced reactivation of the ranavirus frog VIRUS 3 in asymptomatic *Xenopus laevis*. *PLoS One.* 9(11):
- Ruthsatz K, Giertz LM, Schröder D, Glos J. 2019. Chemical composition of food induces plasticity in digestive morphology in larvae of *Rana temporaria*. *Biol. Open.* 8(12):048041
- Ruxton GD, Allen WL, Sherratt TN, Speed MP. 2019. *Avoiding Attack: The Evolutionary Ecology of Crypsis, Aposematism, and Mimicry*. Oxford: Oxford University Press
- Ruxton GD, Sherratt TN, Speed MP. 2004. *Avoiding Attack: The Evolutionary Ecology of Crypsis, Warning Signals and Mimicry*. Oxford: Oxford University Press
- Sabat P, Bozinovic F. 2000. Digestive plasticity and the cost of acclimation to dietary chemistry in the omnivorous leaf-eared mouse *Phyllotis darwini*. *J. Comp. Physiol. - B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 170(5–6):411–17
- Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stammati A, Zucco F. 2005. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors

- on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol.* 21(1):1–26
- Sanchez JF, Lescar J, Chazalet V, Audfray A, Gagnon J, et al. 2006. Biochemical and structural analysis of *Helix pomatia* agglutinin: a hexameric lectin with a novel fold. *J. Biol. Chem.* 281:20171–20180
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74(12):5463–67
- Schmid F. 1989. Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. In *Protein Structure: A Practical Approach*, ed. TE Creighton, p. 251. New York: IRL
- Seliverstova E, Prutskova N. 2012. Morphofunctional changes in the small intestine epithelium of the frog *Rana temporaria* in the course of hibernation. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 48(3):295–305
- Seuffert ME, Burela S, Martín PR. 2010. Influence of water temperature on the activity of the freshwater snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae) at its southernmost limit (Southern Pampas, Argentina). *J. Therm. Biol.* 35(2):77–84
- Seuffert ME, Martín PR. 2008. Influence of temperature, size and sex on aerial respiration of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) from southern pampas, Argentina. *Malacologia.* 51(1):157–66
- Sharma R, Fernandez F, Hinton M, Schumacher U. 1997. The influence of diet on the mucin carbohydrates in the chick intestinal tract. *Cell. Mol. Life Sci.* 53(11–12):935–42
- Shivaprasad HL. 2014. *Pathology of Birds – An Overview*. Tulare: University of California
- Skelhorn J, Halpin CG, Rowe C. 2016. Learning about aposematic prey. *Behav. Ecol.* 27(4):955–64
- Smith DF, Song X, Cummings RD. 2010. Use of glycan microarrays to explore specificity of glycan-binding proteins. *Methods in Enzymology.* 480: 417-444
- Snow NP, Witmer G. 2010. American Bullfrogs as Invasive Species: A Review of the

- Introduction, Subsequent Problems, Management Options, and Future Directions. *Proc. Vertebr. Pest Conf.* 24: 86-89
- Snyder NFR, Kale HW. 1983. Mollusk predation by snail kites in Colombia. *Auk*. 100(1):93–97
- Söding J, Biegert A, Lupas AN. 2005. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res.* 33:W244–48
- Steentoft C. 2013. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO J.* 32(10):1478–1488
- Stevens C. 1988. *Comparative Physiology of the Vertebrate Digestive System*. Cambridge: Cambridge University Press
- Sun J, Mu H, Ip JCH, Li R, Xu T, et al. 2019. Signatures of divergence, invasiveness, and terrestrialization revealed by four apple snail genomes. *Mol. Biol. Evol.* 36(7):1507–20
- Sun J, Zhang H, Wang H, Heras H, Dreon MS, et al. 2012. First proteome of the egg perivitelline fluid of a freshwater gastropod with aerial oviposition. *J. Proteome Res.* 11(8):4240–48
- Svergun DI. 1999. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophys. J.* 76(6):2879–2886
- Sykes PWJ. 1987. The feeding habits of the Snail Kite in Florida, USA. *Colon. Waterbirds.* 10(1):84–92
- Teem JL, Qvarnstrom Y, Bishop HS, da Silva AJ, Carter J, et al. 2013. The Occurrence of the Rat Lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*, in Nonindigenous Snails in the Gulf of Mexico Region of the United States. *Hawaii J. Med. Public Heal.* 72(6 suppl 2):11–14
- Thiengo SC, Borda CE, Araujo JLB. 1993. On *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822) (Mollusca; Pilidae: Ampullariidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 88(1):67–71
- Thomsson A, Rantzer D, Westrom BR, Pierzynowski SG, Svendsen J. 2007. Effects of crude red kidney bean lectin (phytohemagglutinin) exposure on performance, health,

- feeding behavior, and gut maturation of pigs at weaning. *J Anim Sci.* 85(2):477–85
- Tyler MJ. 2009. Frogs and Toads fact sheet ANZCCART. . 1–7
- Uhlenbruck G, Steinhausen G, Cheesman DF. 1973. An incomplete anti-B agglutinin in the eggs of the prosobranch snail *Pila ovata*. *Experientia.* 29(9):1139–1140
- Van Damme EJM. 2008. Plant lectins as part of the plant defense system against insects. *Induc. Plant Resist. to Herbiv.* 285–307
- Vasconcelos IM, Oliveira JTA. 2004. Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon.* 44(4):385–403
- Vasta GR, Ahmed H, Tasumi S, Odom EW, Saito K. 2007. Biological roles of lectins in innate immunity: molecular and structural basis for diversity in self/non-self recognition. *Adv. Exp Med Biol.* 598:389–406
- Velmurugan B, Selvanayagam M, Cengiz EI, Unlu E. 2007. Histopathology of lambda-cyhalothrin on tissues (gill, kidney, liver and intestine) of *Cirrhinus mrigala*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 24(3):286–91
- Xia K, Pittelli S, Church J, Colón W. 2016. Kinetic stability of proteins in beans and peas: Implications for protein digestibility, seed germination, and plant adaptation. *J. Agric. Food Chem.* 64(40):7649–7657
- Yang M, Rahimnejad S, Zhang C, Song K, Lu K, Wang L. 2019. Histomorphology of gastrointestinal tract in bullfrog *Rana (Lithobates) catesbeiana* and evaluation of the changes induced by a soybean meal-based diet. *Aquac. Res.* 51(1):164–74
- Yusa Y. 2001. Predation on eggs of the apple snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) by the fire ant *Solenopsis geminata*. *J. Mollus. Stud.* 67:257–79
- Yusa Y, Sugiura N, Ichinose K. 2000. Predation on the apple snail, *Pomacea canaliculata* (Ampullariidae), by the Norway rat, *Rattus norvegicus*, in the field. *Veliger.* 43(4):349–53
- Zagalsky PF. 1985. Invertebrate carotenoproteins. *Methods Enzym.* B 111:216–47
- Zhang J. 2003. Evolution by gene duplication: An update. *Trends Ecol. Evol.* 18(6):292–98

Zhu-Salzman K, Luthe DS, Felton GW. 2008. Arthropod-inducible proteins: broad spectrum defenses against multiple herbivores. *Plant Physiol.* 146(3):852–58

Ziswiler V, Farner DS. 1972. Digestion and the digestive system. In *Avian Biology*, pp. 343–430. New York: Academic Press

Tesis doctoral 2021

Estrategias reproductivas de moluscos  
gasterópodos

Caracterización de las defensas de los  
huevos de *Pomacea scalaris* y  
*Pomacea diffusa* (Caenogastropoda:  
Ampullaridae).

*Tabata R. Brola*