



INFORME CIENTÍFICO-TECNOLÓGICO¹

PERIODO: 2010-11

Legajo N°:

1. APELLIDO: **DREON**
NOMBRES: **MARCOS SEBASTIAN**

2. TEMA DE INVESTIGACION

ALTERACIÓN EN EL METABOLISMO DE CRUSTÁCEOS COMO BIOMARCADOR DE LA CONTAMINACIÓN POR HIDROCARBUROS EN EL ÁREA DEL RÍO DE LA PLATA

ESTUDIOS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE PERIVITELINAS DEL GENERO POMACEA

3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA

DESIGNACION: Categoría: **Investigador Asistente** Año: **2005**
INGRESO: Categoría: **Investigador Asistente** Mes: **Enero** Año: **2006**
ACTUAL: Categoría: **Investigador Adjunto** desde el mes: **Diciembre** Año: **2009**

4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA

- 1 -Nombre: **INIBIOLP**

Dependencia: **UNLP-CONICET**

Dirección.Calle: **60 Y 120** N° **S/N**

Ciudad: **La Plata**.....Pcia: **Buenos Aires**.....Tel: **(0221) 482-4894**

Dirección electrónica: inibiolp@atlas.med.unlp.edu.ar

Cargo que ocupa: **Investigador**

5. DIRECTOR DE TRABAJOS. (En el caso que corresponda)

Apellido y Nombres:

Dirección.

Ciudad: Pcia: Tel:

Dirección electrónica:

.....
Firma del Director (si corresponde)

.....
Firma del Investigador

Fecha...../...../.....

¹ Art. 11; Inc. "e"; Ley 9688 (Carrera del Investigador Científico y Tecnológico)

6. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO.

Durante el período informado, se continuó con el estudio del efecto de la fracción hidrosoluble del petróleo (WSF) sobre la dinámica de los lípidos y el metabolismo en general en el camarón de agua dulce *Macrobrachium borellii*, analizando el posible empleo de estos como bioindicadores tempranos de contaminación en el estuario del Río de la Plata. Se concluyeron los estudios en el hepatopáncreas de *M. borellii* referidos al análisis de la expresión diferencial de proteínas por efecto de la WSF. En este sentido se lograron identificar varias proteínas cuya expresión resulta alterada luego de la exposición al contaminante. Mediante ensayos de RT-PCR (Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real) se logró determinar las variaciones a nivel transcripcional de algunas de estas proteínas permitiendo de esta manera evaluar el efecto de este contaminante en un nivel más temprano. Los resultados correspondientes a estos experimentos se encuentran actualmente en proceso de redacción para su publicación y fueron incluidos en la tesis doctoral de la Lic. Pasquevich a quien co-dirigí en su trabajo (ver CV-Dreon).

Por otra parte se continuó trabajando en el proyecto sobre perivitelinas del género *Pomacea*. Al respecto se concluyeron los estudios de caracterización bioquímica y estructural de la escalarina (SC), principal privitelina de *P. scalaris*. Dichos estudios corresponden a la tesis doctoral del Dr. Ituarte a quien co-dirigí en su trabajo (ver CV-Dreon). También durante este periodo se completaron los estudios correspondientes a la estabilidad estructural de la perivitelina-2 (PV2) de *P. canaliculata*. Finalmente, se concluyeron los estudios sobre ovorubina (OR) de *P. canaliculata* respecto a su posible función como agente antinutritivos. Para los trabajos en estas proteínas (OR, PV2 y SC) fue necesario realizar estudios de dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS) realizados en sucesivas concurrencias al Laboratorio Nacional de Luz Sincrotron (LNLS), Campinas, Brasil. Estos proyectos recibieron financiamiento del Laboratorio Nacional de Luz Sincrotron (Programa de ayuda financiera para investigadores de instituciones latino-americanas y del Caribe). (ver CV-Dreon).

Finalmente se iniciaron los estudios acerca de la capacidad hemaglutinante de la SC caracterizándose a esta proteína como una lectina.

7. TRABAJOS DE INVESTIGACION REALIZADOS O PUBLICADOS EN ESTE PERIODO.

7.1 PUBLICACIONES.

7.1.1. STRUCTURE AND STABILITY OF THE NEUROTOXIN PV2 FROM THE EGGS OF THE APPLE SNAIL POMACEA CANALICULATA. Frassa, María Victoria, Ceolín, Marcelo, Dreon, Marcos S. and Horacio Heras BBA - Proteins and Proteomics 1804 2010, pp. 1492-1499. (ISSN: 1570-9639).

There is little information on the egg proteins of gastropod mollusks. Here we focus on PV2, a novel neurotoxin from snail eggs, studying its size, shape, structure, and stability, using small angle X-ray scattering (SAXS), absorption and fluorescence spectroscopy, circular dichroism, electron microscopy and partial proteolysis. Results indicate that PV2 is a compact and well folded oligomer of 130x44 Å. It is an octamer of four 98 kDa heterodimers composed of 67 and 31 kDa subunits. Subunits are held together by disulfide bonds. Dimers are assembled into native PV2 by non-covalent forces. The larger subunit is more susceptible to proteolysis, indicating it is less compactly folded and/or more exposed. Quenching of tryptophan fluorescence showed a single class of tryptophyl side chains occluded in hydrophobic regions. Native structure shows loss of secondary structure ($\alpha+\beta$) at 6 M urea or 60–70 °C; the effects on the quaternary structure suggest an unfolding without disassembling of the protein. The 3D model of PV2 presented here is the first for an egg proteinaceous neurotoxin in animals.

Participación personal: Diseño y desarrollo experimental, redacción del trabajo y discusión de los resultados.

7.1.2. CARBOHYDRATES AND GLYCOFORMS OF THE MAJOR EGG PERIVITELLINS FROM POMACEA APPLE SNAILS (Architaenioglossa: Ampullariidae). Ituarte, S., Dreon, M.S., Pasquevich, M.Y., Fernández, P.E., Heras, H. Comparative Biochemistry and Physiology B 157 2010, pp 66-72. (ISSN: 0305-0491).

To better understand how glycans contribute to the multiple roles of perivitellins in embryo development, the carbohydrate moieties and glycoforms of the carotenoglycoproteins ovorubin and scalarin from the eggs of Pomacea canaliculata (Lamarck, 1822) and Pomacea scalaris (d'Orbigny, 1835) were studied. All subunits of both proteins are glycosylated and appear to be glycoforms with isoelectric points ranging from ~ 5.3 to ~ 9.1. Complete deglycosylation reduced subunit heterogeneity to spots of similar molecular weight (~ 27 and ~ 25 kDa in scalarin and ovorubin, respectively) but with varying IP. Serine phosphorylation, present in both perivitellins, explains part of the isoforms. Glycosylation patterns of scalarin were determined using biotinylated lectins, PNGaseF treatment and selective chemical deglycosylation, which revealed the presence of hybrid and oligomannose N-linked glycans in all subunits. Scalarin has terminal sialic acid residues possibly resistant to neuraminidase and O-linked residues derived from the T- and Tn antigens. Ovorubin displayed predominantly the same glycans, though in different amounts. Capillary gas chromatography (GC) showed galactose and mannose as the major monosaccharides followed by GlcNAc and fucose. An interesting feature was the important amount of sialylated and fucosylated structures found in both perivitellins determined by GC, spectroscopy and lectins. This is the first report of these structures in gastropods other than heterobranchs.

Participación personal: Diseño y desarrollo experimental, redacción del trabajo y discusión de los resultados.

7.1.3. THE ROLE OF THE PROTEINASE INHIBITOR OVORUBIN IN APPLE SNAIL EGGS RESEMBLES PLANT EMBRYO DEFENSE AGAINST PREDATION. Marcos Sebastián Dreon, Santiago Ituarte, Horacio Heras. PLoS ONE 5(12) 2010: e15059.doi:10.1371/journal.pone.0015059.

[http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.015059 - cor1](http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.015059-cor1)

Background: Fieldwork has thoroughly established that most eggs are intensely predated. Among the few exceptions are the aerial egg clutches from the aquatic snail Pomacea canaliculata which have virtually no predators. Its defenses are advertised by the pigmented ovorubin perivitellin providing a conspicuous reddish coloration. The nature of the defense however, was not clear, except for a screening for defenses that identified a neurotoxic perivitellin with lethal effect on rodents. Ovorubin is a proteinase inhibitor (PI) whose role to protect against pathogens was taken for granted, according to the prevailing assumption. Through biochemical, biophysical and feeding experiments we studied the proteinase inhibitor function of ovorubin in egg defenses.

Methodology/Principal Findings: Mass spectrometry sequencing indicated ovorubin belongs to the Kunitz-type serine proteinase inhibitor family. It specifically binds trypsin as determined by small angle X-ray scattering (SAXS) and crosslinking studies but, in contrast to the classical assumption, it does not prevent bacterial growth. Ovorubin was found extremely resistant to in vitro gastrointestinal proteolysis. Moreover feeding studies showed that ovorubin ingestion diminishes growth rate in rats indicating that this highly stable PI is capable of surviving passage through the gastrointestinal tract in a biologically active form.

Conclusions: To our knowledge, this is the first direct evidence of the interaction of an egg PI with a digestive protease of potential predators, limiting predator's ability to digest egg nutrients. This role has not been reported in the animal kingdom but it is similar to plant defenses against herbivory. Further, this would be the only defense model with no tradeoffs between conspicuousness and noxiousness by encoding into the same molecule both the aposematic warning signal and an antinutritive/antidigestive defense.

These defenses, combined with a neurotoxin and probably unpalatable factors would explain the near absence of predators, opening new perspectives in the study of the evolution and ecology of egg defensive strategies.

Participación personal: Diseño y desarrollo experimental, redacción del trabajo y discusión de los resultados.

7.1.4. TRIACYLGLYCEROL CATABOLISM IN THE PRAWN MACROBRACHIUM BORELLII (Crustacea: Palaemoniade). M.Y. Pasquevich, M.S. Dreon, S. Lavarías, H. Heras. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 160 2011, pp 201-207. (ISSN: 0305-0491).

While invertebrates store neutral lipids as their major energy source, little is known about triacylglycerol (TAG) class composition and their differential catabolism in aquatic arthropods. This study focuses on the composition of the main energy source and its catabolism by lipase from the midgut gland (hepatopancreas) of the crustacean *Macrobrachium borellii*. Silver-ion thin-layer chromatography of prawn large TAG deposit (80% of total lipids) and its subsequent fatty acid analysis by gas chromatography allowed the identification of 4 major fractions. These are composed of fatty acids of decreasing unsaturation and carbon chain length, the predominant being 18:1n-9. Fraction I, the most unsaturated one, contained mainly 20:5n-3; fraction II 18:2n-6; fraction III 18:1n-9 while the most saturated fraction contained mostly 16:0. Hepatopancreas main lipase (Mr 72 kDa) cross-reacted with polyclonal antibodies against insect lipase, was not dependent on the presence of Ca²⁺ and had an optimum activity at 40 °C and pH 8.0. Kinetic analysis showed a Michaelis–Menten behavior. A substrate competition assay evidenced lipase specificity following the order: 18:1n-9-TAG > PUFA-enriched-TAG > 16:0-TAG different from that in vertebrates. These data indicate there is a reasonable correspondence between the fatty acid composition of TAG and the substrate specificity of lipase, which may be an important factor in determining which fatty acids are mobilized during lipolysis for oxidation in crustaceans.

Participación personal: Diseño y desarrollo experimental, redacción del trabajo y discusión de los resultados.

7.1.5. Fernández PE, Frassa V., Gimeno E.J, Dreon M., Heras H. Chapter 83, “Changes in carbohydrate expression in the cervical spinal cord of mice intoxicated with perivitellin PV2 from *Pomacea canaliculata*. In: *Poisoning by plants, mycotoxins and related toxins*”. Edited by Riet-Correa, F., Pfister J., Schild A.L. and Panter K. CAB International (2011) 482-498. ISBN 13 978 1 84593 833 8.

Participación personal: Diseño y desarrollo experimental, redacción del trabajo y discusión de los resultados.

7.2 TRABAJOS ENVIADOS Y AUN NO ACEPTADOS PARA SU PUBLICACIÓN.

8. DIRECCION DE BECARIOS Y/O INVESTIGADORES.

8.1. Codirección de la estudiante de doctorado Pasquevich, Yanina. CONICET- Beca interna de postgrado tipo I (3 años): Resolución D N° 0018 del 11 de Enero de 2007.

8.2. Codirección del Dr. Santiago Ituarte. CONICET- Beca interna Postdoctoral. Resolución No. (Expediente No. 002325/09).

9. DIRECCION DE TESIS

9.1. Codirección de la estudiante de doctorado Pasquevich, Yanina. “Efecto de hidrocarburos hidrosolubles sobre el metabolismo y la expresión proteica del camarón *Macrobrachium borellii* (Crustacea Decapoda)”. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP. Resolución N° 176/2007. En ejecución.

9.2. Codirección del estudiante de doctorado Ituarte Santiago. “Estudio estructural y funcional de las perivitelinas de *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampulariidae)”. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP. Resolución N° 180/2005 y 60/2008.

10. PARTICIPACION EN REUNIONES CIENTIFICAS.

10.1. BIOCHEMICAL DEFENSES AGAINST PREDATION OF APPLE SNAIL EGGS RESEMBLE PLANT STRATEGIES AGAINST HERBIVORY. Marcos S. Dreon, Santiago Ituarte, María V. Frassa and Horacio Heras. International meeting Physiomas 10. Noviembre 2010. Quebec, Canada.

10.2. MULTIFUNCTIONAL PERIVITELLINS FROM APPLE SNAILS: THE CASE OF *POMACEA SCALARIS* (d’Orbigny, 1835) (*Architaenioglossa*, Ampullariidae). Santiago Ituarte, Marcos S. Dreon, Horacio Heras. International meeting Physiomas 10. Noviembre 2010. Quebec, Canada.

10.3. A PROTEÓMIC APPROACH TO THE STUDY OF AQUATIC POLLUTION IN A SHRIMP EXPOSED TO CRUDE OIL HYDROCARBONS. Pasquevich MY, Dreon MS and Heras H. XLVI Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. Diciembre 2010. Puerto Madryn, Chubut, Argentina.

10.4. THE ROLE OF THE PROTEINASE INHIBITOR OVORUBIN IN THE APPLE SNAIL EGGS DEFENSES AGAINST PREDATION. Marcos Sebastián Dreon, Santiago Ituarte and Horacio Heras. 4th International Workshop on the Biology of Ampulariidae. Noviembre 2010, San Miguel de Tucumán, Argentina.

10.5. PERIVITELLINS OF POMACEA CANALICULATA. DEFENSIVE MOLECULES OR STORAGE PROTEINS? Horacio Heras, Santiago Ituarte, María V. Frassa and Marcos S Dreon. 4th International Workshop on the Biology of Ampulariidae. Noviembre 2010, San Miguel de Tucumán, Argentina.

10.6. MULTIFUNCTIONAL PERIVITELLINS IN POMACEA: CHARACTERISTIC OF AERIAL EGGS? S Ituarte, MS Dreon, H Heras. 4th International Workshop on the Biology of Ampulariidae. Noviembre 2010, San Miguel de Tucumán, Argentina.

10.7. PV2: A NOVEL TOXIN ISOLATED FROM THE EGGS OF POMACEA CANALICULATA. María V. Frassa; Marcos S. Dreon and Horacio Heras. 4th International Workshop on the Biology of Ampulariidae. Noviembre 2010, San Miguel de Tucumán, Argentina.

10.8. HEMAGGLUTINATING ACTIVITY AND STRUCTURAL STABILITY OF A SNAIL EGG-PROTEIN. Ituarte S, Dreon MS and Heras H. XLVII Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. Noviembre 2011. Potrero de los Funes, San Luis, Argentina.

10.9. EFFECT OF WATER- SOLUBLE CRUDE OIL HYDROCARBON EXPOSURE ON PROTEIN EXPRESSION OF A FRESHWATER PRAWN. Pasquevich MY, Dreon MS and Heras H. XLVII Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. Noviembre 2011. Potrero de los Funes, San Luis, Argentina.

11. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO.

11.1. Jefe de Trabajos Prácticos, Dedicación simple, Cátedra de Bioquímica, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. Nro de resolución 257/04. Hasta abril de 2010.

11.2. Ayudante Diplomado rentado, dedicación exclusiva, suplente. Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Médicas, UNLP. Expediente No. 800-4198/10, resolución No. 204. Desde abril de 2010 a la fecha.

12. SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO

12.1. Responsable del proyecto. Subsidio del Laboratorio Nacional de Luz Sincrotron (Programa de ayuda financiera para investigadores de instituciones latino-americanas y del Caribe) proyecto: "DEGLYCOSYLATION EFFECT ON THE STRUCTURE AND STABILITY OF OVORUBIN, A PROTEASE INHIBITOR FROM THE EGGS OF POMACEA CANALICULATA". (D11A - SAXS1-9744).

12.1. Investigador responsable. CIC-Subsidio institucional. Resolución N° 1535/10.

13. TITULO Y PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PROXIMO PERIODO.

ESTUDIOS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE PERIVITELINAS DEL GENERO POMACEA

Los gasterópodos dulceacuícolas del género *Pomacea* (Ampullariidae) son nativos de América, y comprenden un grupo importante dentro de la malacofauna de nuestro país. Algunas de sus especies, como *P. bridgesi*, *P. canaliculata* y *P. scalaris*, fueron introducidas en el sudeste asiático, África, Estados Unidos y Hawaii donde se han convertido en plagas del agro alterando la dinámica de ciertos ecosistemas acuáticos [1–3]. Por otro lado, en el sudeste asiático

estos caracoles son capaces de actuar como hospedadores intermediarios de *Angiostrongylus cantonensis*, aumentando el área de incidencia de la encefalitis eosinofílica humana causada por este nematode [4].

Nuestro laboratorio ha dedicado más de 15 años al estudio de la biología reproductiva de *Pomacea canaliculata*, un modelo representativo de nuestra región que despierta especial interés por sus implicancias económico-sanitarias. A saber: (a) es un potencial agente de control biológico de gasterópodos transmisores de esquistosomiasis [5] evitando de esta manera el uso de compuestos químicos contaminantes del ambiente, (b) ha sido empleado con éxito en el control de malezas acuáticas en el sur de la Pcia de Buenos Aires [6] y (c) como fue dicho antes, es vector de *Angiostrongylus cantonensis* causante de una meningoencefalitis humana en Asia [7] que si bien esta parasitosis es endémica de Asia, se han detectado recientemente focos de infección en Centroamérica [8] y Brazil [9].

Las especies de *Pomacea* presentan la peculiar estrategia reproductiva de desovar fuera del agua, cementando sus puestas de colores intensos sobre distintos sustratos, quedando los huevos expuestos a insolación, desecación y depredación durante el desarrollo [10,11]. A pesar de estas adversas condiciones los huevos completan su desarrollo llamando la atención la completa ausencia de depredadores a excepción de la hormiga de fuego (*Solenopsis geminata*, Arthropoda: Insecta) [12]. Los huevos de *P. canaliculata* están provistos de un fluido perivitelino (FPV) que, como hemos demostrado recientemente, es sintetizado y secretado por una glándula accesoria del tracto reproductor de la hembra denominada glándula del albumen [13–15]. Las proteínas de este FPV, denominadas perivitelinas, están siendo activamente estudiadas por nuestro laboratorio en *P. canaliculata* y *P. scalaris*, describiéndose además de su clásico rol nutricional, interesantes funciones relacionadas con la protección del embrión frente a factores abióticos y depredadores [16,17]. En este sentido, la ovorubina, principal perivitelina en el FPV de *P. canaliculata* cumple importantes funciones durante el desarrollo embrionario como fotoprotección, estabilización de moléculas antioxidantes e inhibición de proteasas [17–19]. Este rol como inhibidor de proteasas junto a su resistencia a proteasas digestivas y su gran estabilidad estructural a pHs ácidos permiten que esta perivitelina participe en el sistema de defensa anti-depredador limitando la digestión de los nutrientes del huevo (defensa antidigestiva) [16]. Además, la perivitelina-2 (PV2) de *P. canaliculata*, es neurotóxica con un efecto letal sobre roedores [20].

Respecto a *P. scalaris*, hemos aislado sus puestas la principal perivitelina, la escalarina, que presentó similitudes bioquímicas con la ovorubina de *P. canaliculata* [21] como una estructura oligomérica, alta glicosilación y un cofactor carotenoide. Además es altamente estable frente a la temperatura y pH y desde el punto de vista funcional, ambas perivitelinas actúan como protectoras de su cofactor carotenoides y resisten la digestión gastrointestinal. No obstante scalarina no posee actividad inhibidora de proteasas pero en cambio posee una fuerte actividad hemaglutinante (resultados no publicados), sugiriendo un sistema de defensa del embrión frente a depredadores algo diferente pero igualmente efectivo ya que tampoco posee depredadores en su ambiente natural.

En síntesis podemos decir que las perivitelinas de *Pomacea*, al menos en las 2 especies estudiadas, son proteínas multifuncionales, que no sólo proveen de nutrientes al embrión, sino que además lo protegen de factores abióticos durante su desarrollo y forman parte de una compleja defensa que incluye proteínas antinutritivas, antidigestivas, neurotóxicas y aglutinantes, que contribuirían significativamente al notable éxito reproductivo de la especie. Así, las perivitelinas antes de ser el alimento del embrión, impedirían la adquisición de nutrientes e intoxicarían al depredador, una defensa poco común en la naturaleza, que abre nuevas perspectivas para estudios evolutivos y ecológicos de estrategias reproductivas.

Un estudio estructural más detallado de estas perivitelinas podría ayudar a describir nuevas relaciones estructura-función de proteínas, no descritas en mamíferos. Por otro lado, dadas las interesantes funciones de la ovorubina, la PV2 y la escalarina, este conocimiento no hace más que incrementar el potencial de estas perivitelinas como proteínas modelo y su potencial aplicabilidad biotecnológica y sanitaria.

Objetivos:

1. Profundizar los estudios acerca de la actividad antinutritiva de la OR, estudiando a nivel histopatológico su efecto sobre el intestino de rata.
2. Continuar los estudios estructurales de la PV2, determinando su estructura primaria lo que permitirá establecer homologías con otras proteínas de función conocida.
3. Continuar con el estudio de las perivitelinas de *P. scalaris*, una especie relacionada y con una estrategia reproductiva similar a *P. canaliculata*, buscando homologías estructurales y funcionales con la ovorubina y la PV2.

Metodología:

1. Para estos estudios se realizarán bioensayos con ratas Wistar de 120g administrándoseles diariamente la proteína en el agua de bebida (Ver detalles en [16]). Los estudios histopatológicos del intestino de los animales se realizarán mediante inmunohistoquímica, lectinahistoquímica y microscopía electrónica de barrido.
2. La estructura primaria de la PV2 se obtendrá a partir de sus respectivos mRNA presentes en la glándula del albumen, siguiendo la metodología empleada en otros gasterópodos [22].
3. La metodología para este punto representa la ya puesta a punto en el laboratorio en anteriores estudios (ver CV Dreon).

Bibliografía:

1. Carlsson NOL, Brönmark C., Hansson LA (2004) Invading Herbivory: The golden apple snail alters ecosystem functioning in Asian wetlands. *Ecology* 85: 1575-1580.
2. Cowie RH (2002) Apple snails (Ampullariidae) as agricultural pests: Their biology, impacts, and management. In: Baker GM, editors. *Molluscs as Crop Pests*. Wallingford: CABI. pp. 145-192.
3. Hayes KA, Joshi RC, Thiengo SC, Cowie RH (2008) Out of South America: Multiple origins of non-native apple snails in Asia. *Diversity and Distributions* 14: 701-712.
4. Lv S, Zhang Y, Liu HX, Hu L, Yang K, Steinmann P, Chen Z, Wang LY, Utzinger J, Zhou XN (2009) Invasive Snails and an Emerging Infectious Disease: Results from the First National Survey on *Angiostrongylus cantonensis* in China. *PLoS Negl Trop Dis* 3: e368.
5. Cazzaniga NJ (1990) Predation of *Pomacea canaliculata* (Ampullariidae) on adult *Biomphalaria peregrina* (Planorbidae). *Ann Trop Med Parasitol* 84: 97-100.
6. Estebenet AL, Cazzaniga NJ (1990) Effect of short-term exposure to copper on survival of apple-snails in an integrated control program. *J Aquat Plant Manage* 28: 103-105.
7. Lv S, Zhang Y, Chen SR, Wang LB, Fang W, Chen F, Jiang JY, Li YL, Du ZW, Zhou XN (2009) Human angiostrongyliasis outbreak in dali, china. *PLoS Negl Trop Dis* 3: e520.

8. Slom TJ, Cortese MM, Gerber SI, Jones RC, Holtz TH, Lopez AS, Zambrano CH, Sufit RL, Sakolvaree Y, Chaicumpa W, Herwaldt BL, Johnson S (2002) An outbreak of eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* in travelers returning from the Caribbean. *N Engl J Med* 346: 668-675.
9. Caldeira RL, Mendonça CLGF, Goveia CO, Lenzi HL, Graeff-Teixeira C, Lima WS, Mota EM, Pecora IL, De Medeiros AMZ, Carvalho ODS (2007) First record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 102: 887-889.
10. Albrecht EA, Carreño NB, Castro-Vazquez A (1999) A quantitative study of environmental factors influencing the seasonal onset of reproductive behaviour in the south American apple-snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *J Mollus Stud* 65: 241-250.
11. Estebenet AL, Martín PR (2002) *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae): life-history traits and their plasticity. *Biocell* 26: 83-89.
12. Yusa Y (2001) Predation on eggs of the apple snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) by the fire ant *Solenopsis geminata*. *J Mollus Stud* 67: 275-279.
13. 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: 523-533.
14. Dreon MS, Lavarías S, Garín 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: 323-330.
15. Dreon MS, Heras H, Pollero RJ (2003) Metabolism of ovorubin, the major egg lipoprotein from the apple snail. *Mol Cell Biochem* 243: 9-14.
16. Dreon MS, Ituarte S, Heras H (2010) The Role of the Proteinase Inhibitor Ovorubin in Apple Snail Eggs Resembles Plant Embryo Defense against Predation. *PLoS One* 5: e15059.
17. Heras H, Dreon MS, Ituarte S, Pollero RJ (2007) Egg carotenoproteins in neotropical Ampullariidae (Gastropoda: Archaitaenioglossa). *Comp Biochem Physiol C* 146: 158-167.
18. Dreon MS, Schinella G, Heras H, Pollero RJ (2004) Antioxidant defense system in the apple snail eggs, the role of ovorubin. *Arch Biochem Biophys* 422: 1-8.
19. Norden DA (1972) The inhibition of trypsin and some other proteases by ovorubin, a protein from the eggs of *Pomacea canaliculata*. *Comp Biochem Physiol B* 42: 569-576.
20. Heras H, Frassa MV, Fernández PE, Galosi CM, Gimeno EJ, Dreon MS (2008) First egg protein with a neurotoxic effect on mice. *Toxicon* 52: 481-488.
21. Ituarte S, Dreon MS, Pollero RJ, Heras H (2008) Isolation and partial characterization of a new lipo-glyco-carotenoprotein from *Pomacea scalaris* (Gastropoda: Ampullariidae). *Mol Reprod Dev* 75: 1441-1448.
22. Mukai ST, Hoque T, Morishita F, Saleuddin AS (2004) Cloning and characterization of a candidate nutritive glycoprotein from the albumen gland of the freshwater snail, *Helisoma duryi* (Mollusca: Pulmonata). *Invert Biol* 123: 83-92.