



Universidad Nacional del Nordeste
Facultad de Ciencias Veterinarias
Corrientes – Argentina

**TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN
-MÓDULO DE INTENSIFICACIÓN PRÁCTICA-**

OPCIÓN: Clínica de Pequeños Animales

TEMA: Microscopía Electrónica de Barrido aplicada al Estudio Morfológico de la Glándula del Veneno de Serpientes del Género *Bothrops alternatus*.

TUTOR EXTERNO: Dr. Hernández, David Roque.

TUTOR INTERNO: Dra. García Denegri, María Emilia.

RESIDENTE: Gómez Cherey, María Lorian.

E-MAIL: lorianagomezcherey@gmail.com

-AÑO 2022-

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a todas aquellas personas que deseen aumentar sus conocimientos sobre los ofidios, de esta manera poder despojarnos de todos los prejuicios, conociéndolas de forma objetiva y descubriendo un maravilloso grupo de animales.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia por haberme forjado como la persona que soy, cada uno de mis logros se los debo a ustedes ya que sin su apoyo incondicional no lo hubiera logrado. Me formaron con reglas y algunas libertades, motivándome a no bajar los brazos que con paciencia y perseverancia podría alcanzar todos mis anhelos.

Agradezco a mis amigos, que me regaló esta hermosa profesión como también a aquellos que desde la distancia siempre me brindaron su total apoyo, sabiendo que muchas veces estaría ausente pero aun así celebraron cada uno de mis logros.

Agradezco a mi directora la Dra. María Emilia Garcia Denegri por su paciencia, dedicación, buena predisposición y ayuda excepcional, además de ser una excelente profesional considero que fuiste un gran apoyo en este emocionante camino.

Agradezco a mi Co-director Dr. Hernández, David Roque, por su predisposición, motivación y palabras de apoyo. Gracias por compartir tus conocimientos conmigo y contribuir a mi formación profesional.

Agradezco a la Doctora Gladys Pamela Teibler por colaborar en este proyecto de investigación, ayudando a resolver cada uno de los obstáculos que se presentaron en el trayecto.

Agradezco al equipo de trabajo de CISVA que colabora a la comunidad científica con dedicación y esmero.

Agradezco a la Facultad de Ciencias Veterinarias por brindarme la posibilidad de participar en la beca CIN.

ÍNDICE

Dedicatoria.....	Pág. 2
Agradecimientos.....	Pág. 3
Resumen.....	Pág. 5
Introducción.....	Pág. 6
Materiales y Métodos.....	Pág. 11
Resultados.....	Pág. 15
Discusión.....	Pág. 21
Conclusiones.....	Pág. 22
Bibliografía.....	Pág. 23

RESUMEN

La víbora de la cruz o yarará grande, como comúnmente se la conoce en el NEA, pertenece a la familia Viperidae. Posee glándulas salivales modificadas, situadas a ambos lados de la cabeza, las cuales se adelgazan en su porción anterior para convertirse en conducto primario; luego sufre una dilatación y cambios en su estructura histológica que lo transforman en glándula accesoria; esta glándula es más pequeña que la principal, se considera esfínter y reservorio que controla el flujo de veneno.

El objetivo del presente trabajo es ampliar el conocimiento sobre las glándulas cefálicas encargadas de producir y almacenar el veneno de *Bothrops alternatus*. La metodología aplicada consistió primeramente en la identificación de los especímenes de *B. alternatus*, aportados por el Centro Interactivo de Serpientes Venenosas Argentina (CISVA) de la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV) UNNE. Posteriormente se realizó la extracción de las glándulas de veneno para su análisis morfológico e histológico. Se llevó a cabo la descripción de la superficie glandular y de los tipos celulares presentes, empleando Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Microscopía Óptica (MO) con tinciones histológicas de rutinas, H/E y PAS.

Los resultados histológicos obtenidos por MO confirmaron que las glándulas de veneno son de tipo tubuloalveolar, formada por un epitelio de células seromucosas cilíndricas bajas, con núcleos basales y con nucleolo evidente fuertemente basófilos. Los túbulos confluyen oblicuamente en el conducto excretor de la glándula de veneno. En tanto, que las microfotografías obtenidas por MEB muestra una imagen general de la glándula de veneno junto a la musculatura estriada asociada y, en sección transversal, presenta un patrón lobulillar con adenómeros con contenido secretorio acumulado en los mismos.

Finalmente, los resultados obtenidos en esta investigación aportan datos de interés para investigaciones futuras y para investigadores en el campo de la histología de glándulas productoras de veneno obtenido de colubroideos (Familia Viperidae) y que podría servir de base para establecer comparaciones con la glándula de Duvernoy de los colúbridos (Familia Colubridae).

1. INTRODUCCIÓN

Se han descrito unas 3.701 especies de serpientes en el mundo (Uetz, 2018). América del Sur cuenta con más de 1.580 especies, contribuyendo con el 46% de la riqueza mundial, siendo el segundo continente con mayor riqueza de serpientes en el mundo luego de Asia (Uetz, 2000). Argentina, se encuentra habitada por 136 especies de serpientes, de las cuales, la mayoría de ellas no son venenosas o carecen de aparato inoculador de veneno incluyendo a los colmillos y a la glándula de veneno (Giraudó *et al.*, 2012, Orduna *et al.*, 2011). Del total de las serpientes que se encuentran en nuestro país, solo dieciocho especies son venenosas y pertenecen a la familia Viperidae y Elapidae e incluyen tres géneros diferentes, *Bothrops* con 10 especies; *Crotalus* con 1 especie y *Micrurus* con 7 especies (Giraudó, 2014). Muchas de estas serpientes se distribuyen en regiones reducidas del norte del país, en tanto que otras cinco presentan una distribución más amplia: *Bothrops alternatus*, *B. ammodytoides*, *B. diporus*, *Crotalus durissus terrificus* y *Micrurus pyrrhocryptus*. Estas cinco especies causan alrededor del 99% de los accidentes ofídicos en Argentina y por lo tanto son consideradas las de principal importancia sanitaria (Nori *et al.*, 2014). Como se mencionó anteriormente la mayoría de las serpientes presentes en nuestro país (87%) son inofensivas para el hombre y los animales, debido a que no presentan glándula del veneno o medios eficientes para su inoculación. Debe tenerse en cuenta que pueden provocar lesiones locales por acción mecánica directa de la mordedura. El 13% restante de las serpientes comprende a las familias Viperidae (yaráras y cascabel) y Elapidae (corales). Éstas poseen glándulas productoras de veneno (secreción salival modificada de tipo serosa), conectadas por un conducto glandular a dientes especializados para la inoculación del mismo (Fig. 1). La inyección de este veneno provoca serias alteraciones en el organismo que pueden ocasionar incluso la muerte.

Para referirse a la evolución de ofidios y sus venenos, y por lo tanto, a las glándulas productoras de veneno, es importante repasar la clasificación según la dentición maxilar (Pough *et al.*, 1999, Lee y Scanlon, 2002; Vidal, 2002) (Fig. 2).

- Aglifas: Ausencia de dientes maxilares con surcos. Algunos “colúbridos” presentan esta condición (Vidal, 2002).

- Opistoglifas (opisto = atrás, glifo = hueco): Serpientes que tienen uno o más dientes alargados (colmillos) en la parte de atrás de la maxila con dientes más pequeños en el frente. Estos colmillos pueden tener un surco que ayude a conducir el veneno a la herida de la víctima. Algunos “colúbridos” tienen este tipo de configuración (Fry y Wüster, 2004).

- Proteroglifas (proto = primero): Incluyen elápidos como cobras, mambas, corales y serpientes marinas. Más aún, Vidal (2002) agrega que todos los elápidos se caracterizan por presentar colmillos huecos permanentemente erectos y relativamente pequeños ubicados en el frente de la maxila y seguidos de dientes más pequeños.

- Solenoglifas (solen = tubería): A este tipo pertenecen los vipéridos. En estas serpientes los colmillos huecos son los únicos dientes de la maxila y rotan de modo que pueden ser “guardados” en el techo de la boca cuando no están en uso. Esto les permite tener colmillos largos que inyectan el veneno profundamente en la víctima.

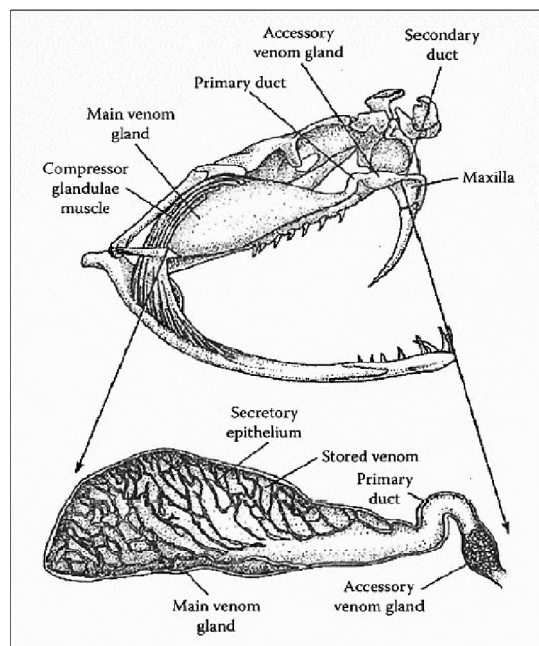


Fig. 1: Esquema de la Glándula de veneno principal, accesoria y su conducto. Weinstein *et al.*, 2021).

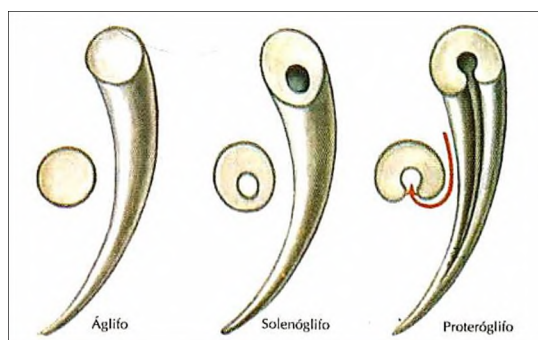


Fig. 2: Diferentes tipos de dientes venenosos en los ofidios. Extraído de: Aritio, L. B. (1997).

Los ofidios de importancia sanitaria pueden dividirse en dos grupos: serpientes venenosas, constituida por la familia Viperidae y la familia Elapidae. Por otro lado, el grupo de las serpientes no venenosas representada por la familia Boidae y Colubridae. (Orduna *et al.*, 2007).

- Familia Boidae: No son venenosas, pero pueden significar un peligro por su gran tamaño.
- Familia Colubridae: Es el grupo de serpientes más numeroso, y la mayoría de las veces causan cuadros clínicos leves.
- Familia Elapidae: Son serpientes muy venenosas pero poco agresivas y de hábitos cavícolas o subterráneos.
- Familia Viperidae: Son las víboras verdaderas, son todas venenosas. La Familia Viperidae está presente en el país con dos géneros: *Crotalus* (“cascabel”) y *Bothrops* (“yará”). Estas serpientes se identifican por tener dos orificios a cada lado de la cabeza por delante de los ojos (orificios nasales y fosetas loreales) y también por poseer pequeñas escamas en el dorso cefálico. Su aparato venenoso es el más evolucionado y eficiente para la inoculación, pudiendo inyectar grandes cantidades de veneno, en solo fracciones de segundo. A continuación, se hace referencia al género de interés para este trabajo:

Género *Bothrops*: En nuestro país se han encontrado siete especies de este género, más conocidas como “yará”. Tienen dimorfismo sexual muy marcado siendo la hembra de mayor tamaño que los machos.

- *Bothrops alternatus* ("yará grande", "víbora de la cruz" o "crucera"). Su nombre se debe a su gran tamaño, ya que puede superar el 1,50 m de longitud. El dorso es de color pardo-grisáceo con dibujos de forma arriñonada de color castaño oscuro bordeados de blanco. Posee un dibujo de líneas blancas con forma de cruz trunca en la cabeza. La cara ventral es blanquecina con pintas oscuras.
- *Bothrops diporus* ("yará chica", "yará overa"). No suelen superar 1 o 1,1 m, una hembra adulta. Presentan una coloración similar a la anterior, pero los dibujos en la cara dorsal semejan mariposas con las alas abiertas, tienen forma de trapecios, con sus bases menores hacia el dorso, y dos manchas cerca de los vértices de las bases mayores (una en cada vértice). La cara ventral es de coloración blanquecina o amarillenta, en general homogénea ("yará overa"). Es muy agresiva y veloz en el ataque.

También se mencionan otras especies de *Bothrops* que tienen importancia sanitaria, aunque su distribución es reducida ya que se localiza principalmente en la provincia de Misiones o áreas de selva profunda. Ellas son:

- *Bothrops amodytoides* ("yará ñata"). Es la más pequeña de su género, no supera los 60 cm de longitud. La modificación de las escamas de la zona nasal le da un aspecto de "nariz" respingada ("yará ñata").
- *Bothrops jararaca* ("yará", "yará perezosa"): no suelen superar 1,40 m de largo. Solo se la encuentra en la provincia de Misiones.
- *Bothrops jararacussu* ("yarácuzú" o "surucucú – apeté"). Es la especie de mayor tamaño pudiendo superar 1,70 m. Es la más peligrosa por la cantidad de veneno que puede inocular (superando generalmente 1 gramo).
- *Bothrops moojeni* ("caçaca" o "lanzadera"): igual que la anterior presenta un gran tamaño. Su nombre común se debe a que puede saltar dos o tres veces sucesivamente, estirando todo el largo de su cuerpo al atacar.
- *Bothrops cotiara* ("yará de panza negra"). Es muy raro su hallazgo. Algunas tienen algo de parecido a *B. alternatus* en los dibujos corporales, pero no suelen verse ejemplares de gran tamaño como sucede con ésta última.

Glándula del veneno

El veneno es secretado por glándulas especiales ubicadas a lo largo de la parte posterior del labio superior. Aquellas son glándulas salivales modificadas que secretan una mezcla

de diferentes sustancias, algunas de función digestiva y otras tóxicas (Scrocchi *et al.*, 2006).

La glándula venenosa es de forma ovoide, se halla situada a ambos lados de la cabeza, desde la parte posterior del maxilar superior hasta la comisura labial. En *Bothrops* esta glándula se adelgaza en su porción anterior para convertirse en conducto primario, después de un corto trayecto, sufre una dilatación y cambios en su estructura histológica que lo transforman en glándula accesoria; ésta es más pequeña que la glándula principal, se considera esfínter y reservorio que controla el flujo de veneno, produce ciertos principios tóxicos de mucopolisacáridos y diluyentes del veneno. Sigue luego un conducto que vierte el producto de secreción en el colmillo inyector, llamado conducto secundario (Patiño, 2002). La glándula se asocia externamente a una musculatura estriada esquelética que contribuye a la eyección del veneno, la cual está conformada por el músculo compresor que cubre la superficie lateral y dorso-lateral de la glándula principal y el músculo pterigoideo glandular que cubre la superficie medial y la mitad craneal de la misma (Young *et al.*, 2001).

La glándula accesoria está formada por largos túbulos revestidos por un epitelio de células seromucosas cilíndricas bajas, con núcleos basales, fuertemente basófilos. Los túbulos confluyen oblicuamente en el conducto excretor de la glándula de veneno.

La glándula del veneno de *B. alternatus* está rodeada por una cápsula de tejido conjuntivo denso que emite septos que separan y sirven de soporte a los túbulos secretores. Estos son largos y convergen de la región dorsal posterior a la región ventral anterior de la glándula. Están revestidos por un estrato de células seromucosas cilíndricas de citoplasma granular acidófilo. La altura de las células varía según el contenido de veneno de los túbulos, altas en las glándulas vacías y achatadas en las glándulas repletas de veneno. Sus núcleos son basales, redondeados y de cromatina escasa. La luz tubular muestra abundante secreción (Parpinelli *et al.*, 2013).

El objetivo de este trabajo de investigación es generar y ampliar conocimiento en el área de la histología sobre la estructura de la glándula de veneno de *B. alternatus* mediante microscopía óptica y de barrido. Los resultados obtenidos constituyen un nuevo aporte en la toxicología ofídica que se verán reflejadas en el ámbito de la investigación básica en el campo de las Ciencias Veterinarias.

El presente trabajo corresponde al Plan de Beca (CIN) realizada a lo largo del período 2020-2021 en el laboratorio de Toxicología de la Cátedra de Farmacología y Toxicología (FCV-UNNE), en la Cátedra de Histología y Embriología (FCV-UNNE) y en el Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido UNNE (MINCyT).

El estudio de las glándulas de veneno de *B. alternatus* forma parte de un proyecto de tesis doctoral cuyo nombre es “Análisis histológico de glándulas del veneno de serpientes del género *Bothrops* del Nordeste Argentino”, de la doctoranda Lic. en Ciencias Biológicas, Srta. María Emilia Benítez.

Finalmente, se menciona que el proyecto marco fue aprobado por el Comité de Ética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNNE de acuerdo al registro N° 067/16 (actualmente en vigencia).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Unidad experimental

Se trabajó con ejemplares de serpientes venenosas del género *Bothrops* comúnmente conocidas como “yarará”, procedentes de la provincia de Corrientes. El estudio fue realizado con piezas cadavéricas formoladas de ejemplares de *Bothrops alternatus* aportados por el Centro Interactivo de Serpientes Venenosas de Argentina (CISVA, FCV-UNNE).

En primer lugar se procedió a la identificación taxonómica y ontogénica de los ejemplares de *B. alternatus* (juvenil y un adulto). Además, se registró la longitud hocico cloaca (LHC o SLV en inglés) mediante la técnica de análisis. Se registró el peso corporal de ambos estadios de desarrollo con balanza digital.

Con el fin de establecer la diferencia entre los estadios ontogénicos de las serpientes, se empleó el criterio empleado por González (2021) con el cual determina a las serpientes juveniles como aquellos individuos en un estado pre-reproductivo que han alcanzado un desarrollo corporal adulto, aunque con un tamaño menor (LHC de 40 a 50 centímetros) al que se ha señalado como máximo para la especie; y además cuenta con la mayoría de los sistemas funcionales, especialmente la alimentación y locomoción.

2.2. Técnica de extracción de la glándula del veneno de serpientes *Bothrops* sp. (yarará):

Se utilizó la Técnica de Kochva y Gans (1966) modificada, que consiste en realizar un primer corte transversal desde la línea media hasta la línea lateral de la articulación temporo-mandibular. Luego, una segunda incisión longitudinal, sobre el borde labial, desde el extremo anterior hasta el colmillo, levantando de esta manera la piel y dejando expuesta la glándula productora del veneno (Fig. 3). A continuación de la disección de las glándulas, se realizó el pesaje y medición del ancho y largo de las mismas, para luego llevar a cabo el procesamiento histológico.



Fig. 3: Disección de la glándula cefálica productora de veneno. Separación de la piel y exposición del tejido glandular junto con la musculatura asociada en un ejemplar juvenil *B. alternatus*. Kochva y Gans modificada (1966).

2.3. Procesamiento para Microscopía Óptica

El procesamiento histológico se realizó en dos instancias, la primera en forma manual y posteriormente con el procesador automático (Fig. 4 y 5). El mismo consistió en la deshidratación de las muestras mediante una serie de alcoholes de graduación creciente (50°C, 70°C, 80°C, 95°C y alcohol absoluto 100°) y un posterior aclaramiento, en el que se sustituyó el agente deshidratante por una sustancia miscible con la parafina, como es el xileno. Luego, las muestras fueron acondicionadas en recipientes (anillos) con parafina y se procedió a su corte con micrótopo tipo Minot, a un espesor de 5 micras. Los cortes fueron coloreados con Hematoxilina-eosina y PAS (Ácido Periódico de Schiff). La observación microscópica y registro fotográfico se obtuvo mediante la utilización del

microscopio Leica DM500 con cámara digital Leica ICC50, y sistema de análisis de imágenes: Leica Application Suite 3.4.1.



Fig. 4: Procesamiento manual de las muestras con alcoholes de graduación creciente y aclaramiento con xileno.



Fig. 5: Glándula de veneno en casetes de inclusión para su posterior deshidratación e incrustación en parafina.

2.4. Procesamiento histológico para Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Se realizó en el Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido de la UNNE, el cual cuenta con un microscopio marca JEOL 5800 LV (Fig. 7). La misma cuenta con la siguiente tecnología: operación automatizada, toma de fotomicrografías, operación en

alto y bajo vacío, intercambio rápido de muestras, software para medición de imágenes y aplicación de falso color y digitalización de imágenes.



Fig. 6: Microscopio Electrónico de Barrido y Digitalizador de imágenes.

Las muestras de las glándulas fueron fijadas en glutaraldehído al 2%, deshidratadas en acetona en concentraciones crecientes, secadas a punto crítico (Fig. 7A) y posterior metalización con oro paladio para su observación bajo MEB (Fig. 7B).



Fig. 7: A) Montaje de las muestras y secado a punto crítico y B) Metalización con oro paladio.

3. RESULTADOS

3.1. El ejemplar viborezno (juvenil) presentó una longitud corporal total de 35 cm y LHC de 33 cm, siendo su peso corporal de 25 g. Mientras que el ejemplar adulto exhibió una longitud corporal total de 90 cm y LHC de 87 cm, y peso corporal de 400 gr (**Tabla 1**) (**Fig. 8**).

Tabla 1: Parámetros morfométricos de ejemplares juvenil y adulto de *B. alternatus*.

Ejemplar <i>B. alternatus</i>	Peso Corporal	Longitud corporal
Juvenil	25 gr (Fig. 10 A)	35 cm (Fig. 10 B)
Adulto	400 gr (Fig. 11 A)	90 cm (Fig. 11 B)



Fig. 8: Registro de peso y de longitud de *B. alternatus*. Izquierda: ejemplar juvenil. Derecha: ejemplar adulto.

Las glándulas de veneno de ambos ejemplares mostraron dos regiones secretoras unidas por un conducto primario corto; una porción anterior pequeña, la glándula accesoria y una glándula principal de mayor tamaño. Todas las glándulas descritas mostraron una forma ovalada y superficie lisa. El análisis morfológico de las glándulas del veneno del ejemplar juvenil fue realizado bajo los mismos parámetros para ambos lados de la cabeza. El tamaño de la glándula derecha fue de 1 cm de largo por 0,5 cm de ancho y su peso fue de 0,02 g; el tamaño de la glándula izquierda fue de 0,8 cm de largo y 0,3 cm de ancho, con un peso de 0,01 g (**Fig. 9**).



Fig. 9: **A)** Longitud. Glándula principal (▲), glándula accesoria (★) y la flecha indica el conducto. **B)** Diámetro y **C)** Peso de Glándula de veneno de ejemplar juvenil de *B. alternatus*.

Por otra parte, los datos obtenidos para la serpiente adulta fueron los siguientes: la glándula del veneno izquierda pesó 0,75 g con un tamaño de 3,5 cm de largo y 1,3 cm de ancho; la glándula derecha tuvo un peso de 0,90 g, un largo de 3,5 cm por 1 cm de ancho. Ambas glándulas presentan un color castaño claro (**Fig. 10**).

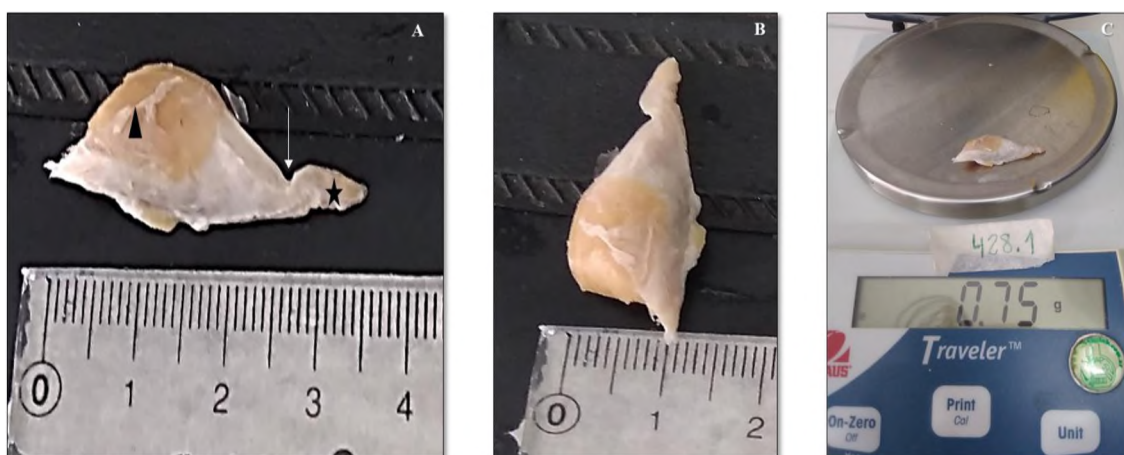


Fig. 10: **A)** Longitud. Glándula principal (▲), glándula accesoria (★) y la flecha indica el conducto. **B)** Diámetro y **C)** Peso de Glándula de Veneno de ejemplar adulta de *B. alternatus*.

3.3. Análisis Histológico por Microscopía óptica (MO)

3.3.1. Tinción de rutina (H/E) de preparados de glándulas del veneno.

Los resultados histológicos demostraron que las glándulas de veneno formada por largos túbulos revestidos por un epitelio de células seromucosas cilíndricas bajas, con núcleos basales, y núcleos fuertemente basófilos. Los adenómeros (**Fig. 11**), confluyen oblicuamente en el conducto excretor de la glándula de veneno.

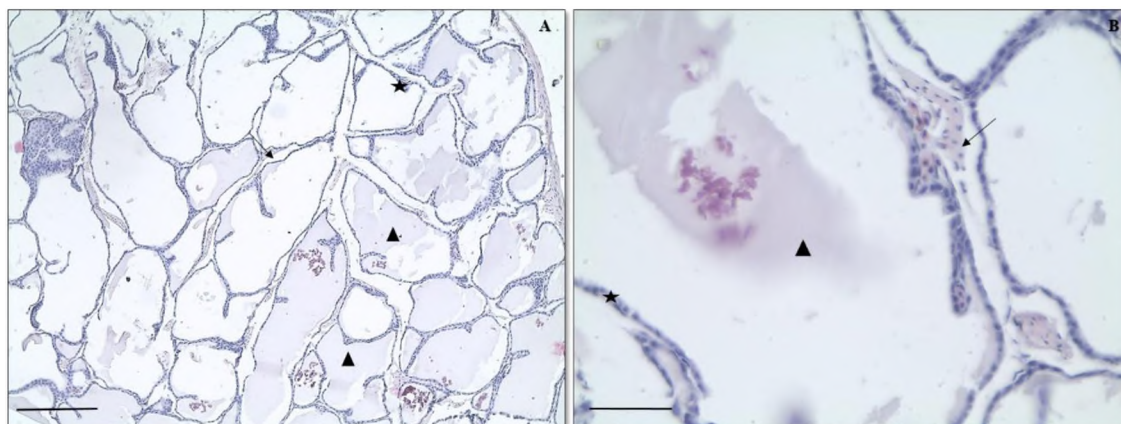


Fig. 11: Fotomicrografía de corte transversal de glándula del veneno *B. alternatus* juvenil. (Tinción H/E). A, B: Adenómeros glandulares repletos de veneno (▲), y células secretoras cuboidales (★). Las flechas apuntan al tejido conectivo intertubular. Barras: A: 10X; B: 40X.

3.3.1. Tinción PAS de preparados de glándulas de veneno:

Las glándulas poseen células seromucosas que revelan intensa reacción PAS. Pudiéndose observar estructuras PAS positivas, identificándose la presencia de mucosustancias neutras (**Fig. 12**).

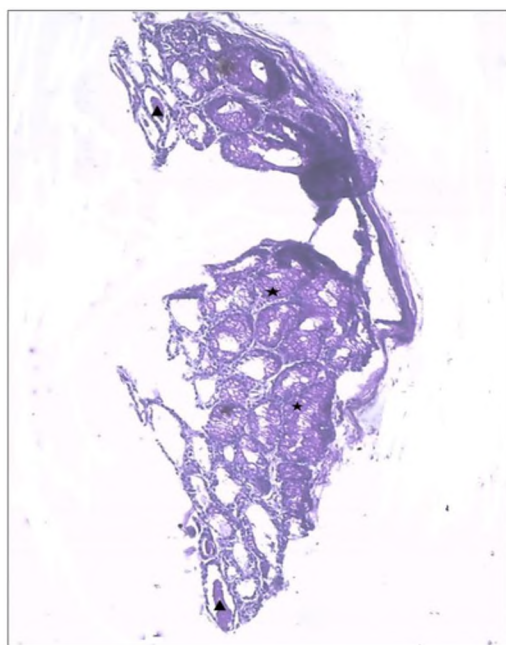


Fig. 12: Fotomicrografía de corte transversal de glándula del veneno *B. alternatus* juvenil. (Tinción PAS, 4x). Adenómeros glandulares repletos de veneno (▲) y células secretoras seromucosas (★).

3.4. Análisis con Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Por MEB se observó fascículos del músculo esquelético estriado que rodea a la glándula de veneno (**Fig. 13 A y B**). Por debajo de esta estructura muscular se observó tejido conectivo que envía trabéculas hacia el centro del parénquima dividiéndolo en lóbulos y lobulillos glandulares, que dan sostén a los adenómeros. Estas observaciones se vieron tanto en ejemplares adultos como juveniles (**Fig. 13 C, D y E**). En la glándula de veneno izquierda de ejemplar adulto se observó además adenómeros con estructura compatible a contenido de la secreción (glándula repleta de veneno) (**Fig. 13, F**).

Con mayor magnificación se observa la estructura de los adenómeros glandulares, los cuales estaban rodeados por tejido conectivo y en las caras internas se apreció múltiples folículos glandulares. En la Fig. **14 D y F**, se observan folículos glandulares con contenido de secreción.

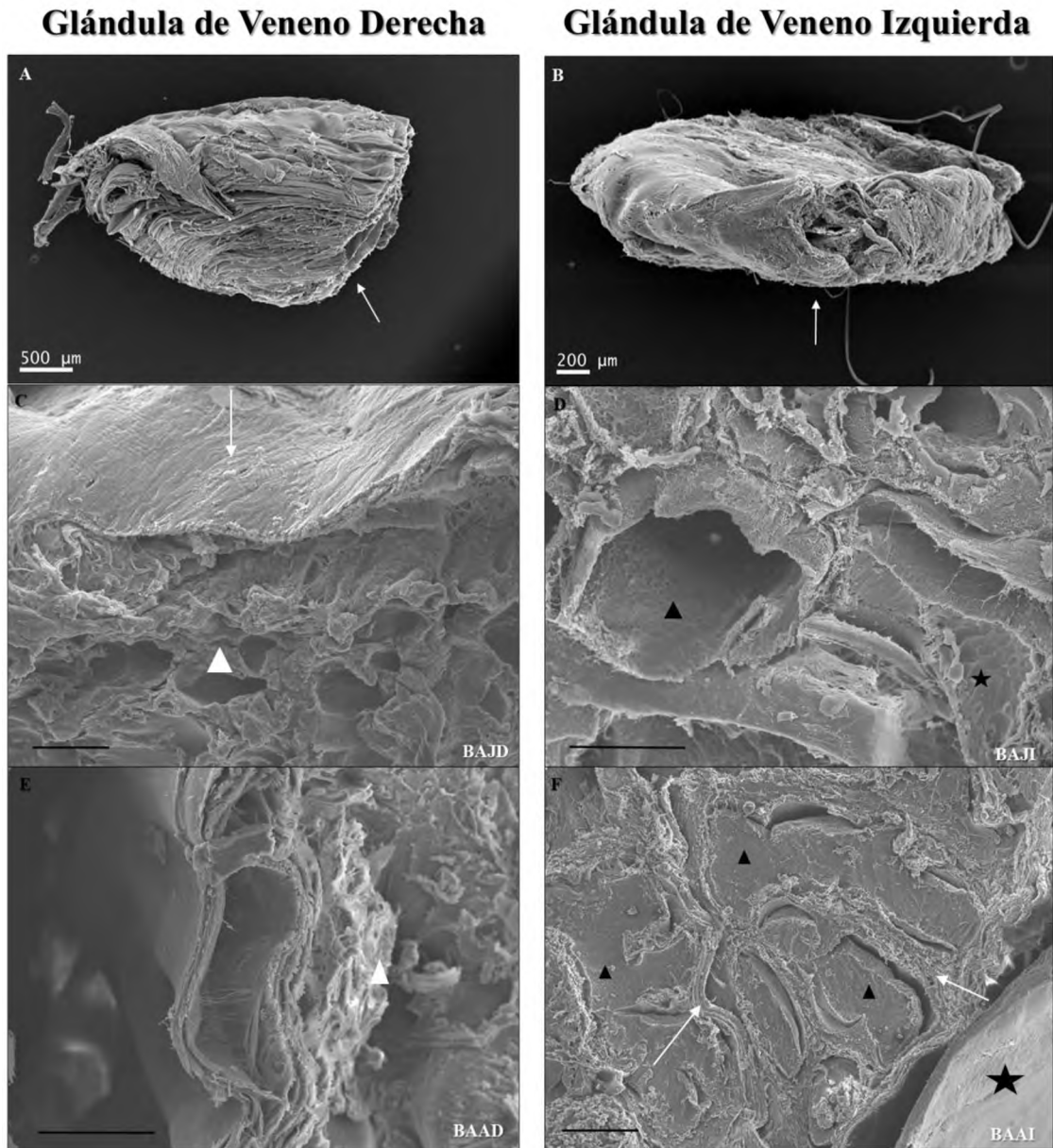


Fig. 13: Microfotografía de glándula de veneno de *B. alternatus*: **A)** Glándula derecha, **B)** Glándula izquierda; las flechas señalan la musculatura esquelética estriada asociada a la glándula: músculo compresor y músculo pterigoideo. **C)** BAJD: *B. alternatus* juvenil derecha: tejido conectivo denso (▲) y la flecha muestra el músculo compresor, **D)** BAJI: *B. alternatus* juvenil izquierda: adenómero repleto de veneno (★) y adenómero vacío (▲), **E)** BAAD: *B. alternatus* adulta derecha: tejido conectivo denso (▲), **F)** BAAI: *B. alternatus* adulta izquierda, adenómeros glandulares repletos de veneno (▲), músculo esquelético estriado (★), las flechas apuntan al tejido conectivo denso que divide al parénquima glandular en lóbulos y lobulillos. Barras: C, F: 100 µm; D, E: 50 µm.

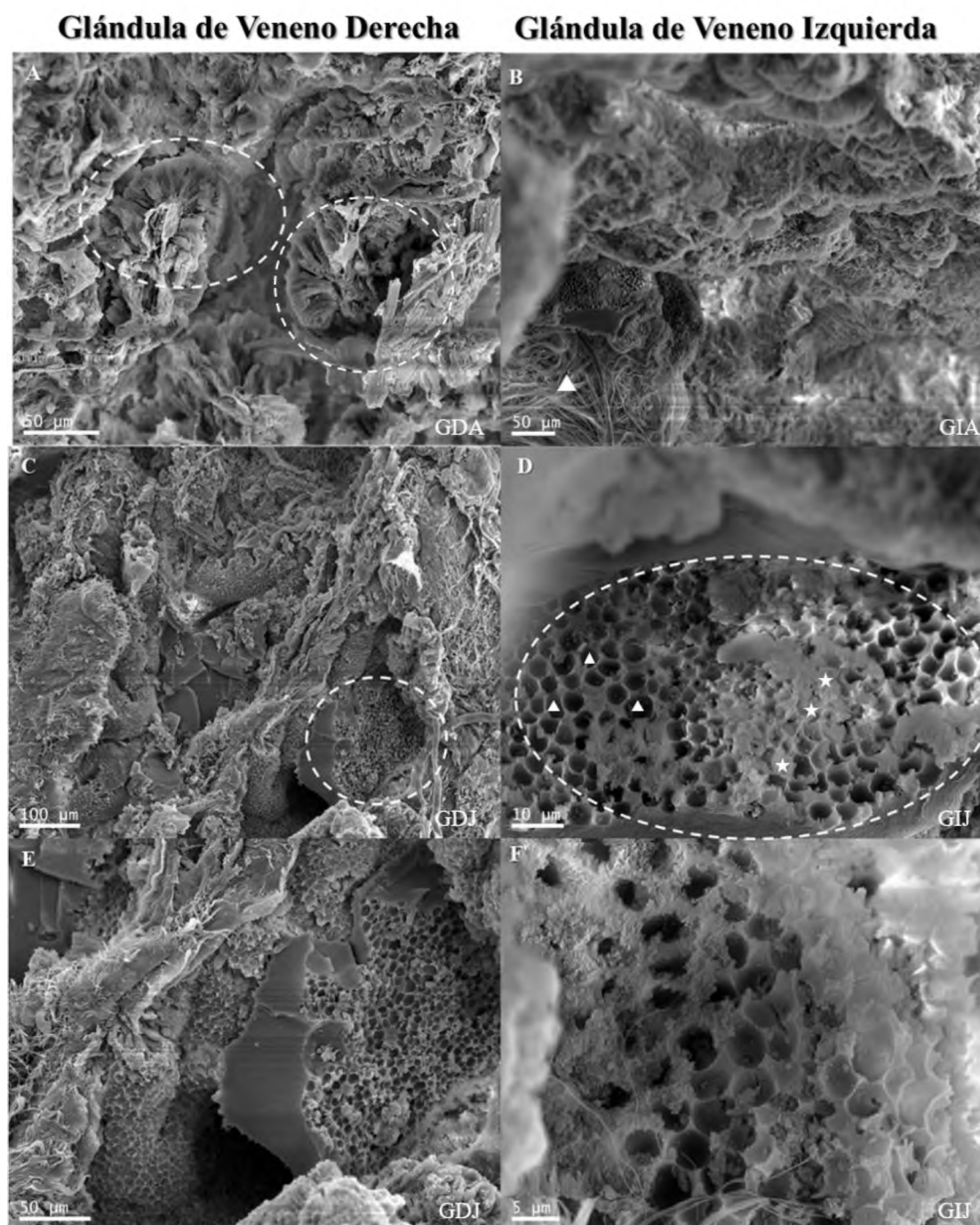


Fig. 14: MEB de Glándula de Veneno *B. alternatus*: **A)** Glándula derecha de ejemplar adulto (GDA): las líneas de puntos indican los adenómeros; **B)** Glándula izquierda de ejemplar adulto (GIA): tejido conectivo interlobular (▲); **C)** Glándula DCHA juvenil (GDJ): las líneas de puntos indican los acinos glandulares que constituyen el parénquima, **D)** Glándula izquierda juvenil (GIJ): las líneas de puntos señalan los adenómeros con estructura compatible a secreción glandular, vacíos (▲) y repletos (★), **E)** y **F)** Mayor magnificancia de C y E.

4. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se utilizó la técnica de Kochva y Gans (1966) modificada, lo cual permitió el abordaje, extracción y conservación del tejido glandular sin modificar su arquitectura morfológica para el posterior análisis histológico.

Si bien existen vastos estudios sobre la caracterización bioquímica y biológica del veneno *Bothrops alternatus*, son escasos los estudios sobre las características morfológicas e histológicas de las glándulas productoras de veneno del género *Bothrops* en Argentina.

Los aspectos morfológicos de las glándulas de veneno de *B. alternatus* juvenil del NEA estudiadas en esta beca de investigación, coincidió con lo descrito por (Parpinelli *et al.*, 2013), que indica que las glándulas son de forma ovoide y se sitúan a ambos lados de la cabeza, desde la parte posterior del maxilar superior hasta la comisura labial. Por otro lado, estas estructuras se describen como órganos parenquimatosos que poseen una cápsula de tejido conectivo que emite trabéculas hacia el interior, dividiéndolos en lóbulos y lobulillos, semejante a lo observado por Gopalakrishnakone (1985).

Los resultados histológicos obtenidos por microscopía óptica a partir del ejemplar juvenil de *B. alternatus*, demostraron que la parte principal de la glándula venenosa es exocrina y multicelular, de tipo tubuloalveolar, formada por túbulos ramificados dispuestos alrededor de un lumen central, en el que cantidades considerables de veneno pueden ser almacenadas. Los túbulos están revestidos por un epitelio de células seromucosas cilíndricas de citoplasma acidófilo. Esta descripción concuerda con lo descrito por varios autores (Gennaro *et al.*, 1963; Kochva y Gans, 1965, 1966; Odor, 1965). La tinción de dichas células demostró intensa reacción al PAS. Esto corresponde a lo descrito por Parpinelli (2013), que explica que la secreción de las células seromucosas está compuesta por un complejo carbohidrato-proteínas (mucopolisacáridos neutros y radicales α -amino, triptófano, cistina, cisteína y arginina). Ello se corresponde con la naturaleza mucosa de los venenos de serpientes, cuyos componentes se pueden clasificar de forma muy general y atendiendo criterios fármaco-cinéticos, en toxinas o enzimas (Duque *et al.*, 2007). En particular, el veneno de serpiente de la familia Viperidae está compuesto por varias proteínas, todas ellas pertenecen a un pequeño grupo de familias de proteínas, incluyendo, entre las más abundantes, las metaloproteinasas dependientes de Zn^{+2} (svMPs), Serinoproteinasas (svSP), Fosfolipasas (PLA₂), L-amino ácido oxidasa (LAO), entre otras (León *et al.*, 2011).

Por medio de la Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), en la glándula de veneno del estadio juvenil se observaron adenómeros de estructura compatible con secreción glandular. En tal sentido, las células que constituyen los adenómeros pueden exhibir variaciones morfológicas de acuerdo a la extracción (ordeñadas) o no del veneno, es decir, las células no ordeñadas poseen una morfología que varían entre cúbicas y planas, y después de 4 y 8 días posterior a la extracción del veneno, son de forma cilíndrica; indicando con ello actividad de síntesis (Carneiro *et al.*, 1991). Esta condición celular no pudo ser determinada en este trabajo por utilizar ejemplares cadavéricos.

5. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos a partir del análisis morfológico realizado en las glándulas del aparato inoculador de veneno de serpientes *B. alternatus*, coinciden con lo descrito por diferentes autores de distintas regiones geográficas, siendo análogas a las especies pertenecientes a la familia Viperidae.

Se concluye que la caracterización histológica por MO y MEB de las glándulas del veneno de *B. alternatus* permitieron ampliar el conocimiento sobre la morfología del aparato venenoso y aportar valiosa información que contribuye a la toxicología ofídica, una problemática importante en la región del NEA.

Asimismo, resaltamos que este tipo de trabajos genera en los estudiantes compromiso y responsabilidad de promocionar estrategias orientadas a la conservación de la biodiversidad y la bioculturalidad, vista desde la perspectiva inter y transdisciplinar, dirigidas a producir cambios a nivel local, y/o regional frente a las prácticas académicas, como ésta aquí presentada, que además aborda la educación para la conservación de la ofidiofauna del NEA.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aritio, Luis Blas. (1997). Atlas Temático Zoología Vertebrados. Barcelona, España. Idea Books, S.A, pp. 47.
- Carneiro, S. M.; Pinto, V. R.; Jared, C.; Lula, L. A. B.; Faria, F. P. y Sesso, A. (1991). Morphometric studies on venom secretory cells from *Bothrops jararacussu* (Jararacucu) before and after venom extraction. *Toxicon*. 29 (6), pp. 569-580.
- Duque O. J. F., Sánchez A., Fierro L., Garzón S. & Castaño R. S. (2007). Venenos de serpientes y moléculas antiveneno. *Rev. acad. Colomb. cienc.* XXXI (118), 110-133.
- Fry B.G., y Wüster W. (2004). Montaje de un Arsenal: Origeny evolución del proteoma del veneno de serpiente inferido de Análisis filogenético de secuencias de toxinas. *Biología Molecular Evolution* 21(5) pp. 870-883.
- Gennaro, J. F., Jr., Callahan, W. P. III, Lorincz, A. F. (1963). The anatomy and biochemistry of a mucus secreting cell type present in the poison apparatus of the pit viper *Ancistrodon piscivorus piscivorus*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 106, pp. 463-471.
- Giraudo, A. (2014). Diversidad e historia natural de serpientes de interés sanitario del nordeste argentino / Diversity and natural history of snakes with health interest from northeastern Argentina, Instituto Nacional de Medicina Tropical, pp. 9–68.
- Giraudo, A.; Arzamendia, V.; Bellini, G.; Bessa, C.; Calamante, C.; Cardozo, G.; Chiaraviglio, M.; Constanzo, M.; Etchepare, E.; Di Cola, V.; Di Pietro, D.; Kretschmar, S.; Palomas, S.; Nenda, S.; Rivera, P.; Rodríguez, M.; Scrocchi, G.; Williams, J. (2012). Categorización del estado de conservación de las Serpientes de la República Argentina. *Cuadernos de Herpetología*, 26, pp. 303-326.
- González, Karen Yamila. (2021). Potencia necrotizante del veneno de ejemplares juveniles de *Bothrops alternatus*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura – UNNE. Corrientes, Argentina.
- Gopalakrishnakone, P. (1985). Light and electron microscopic study of the venom apparatus of the saw scaled viper *Echis carinatus*. *The Snake*. 17, pp. 10-14.
- Kochva, E.; Gans, C. (1966). Histology and histochemistry of venom glands of some crotaline snakes. Pp. 506-515.

- Kochva, E., Gans, C. (1965). The venom gland of *Vipera palaestinae* with comments on the glands of some other viperines. *Acta Anat. (Basel)* 62, pp. 365-401.
- Lee M.S.Y.; Scanlon, J.D. (2002). Snake Phylogeny Based on Osteology, Soft Anatomy and Ecology. *Biol Rev Camb Philos Soc* 77, pp. 333-401.
- León G., Sánchez L., Hernández A., Villalta M., Herrera M., Segura A., Estrada R. y Gutiérrez J. M., (2011). Immune Response Towards Snake Venoms. *Inflammation & Allergy – Drug Targets*. 10 (5), 1-4.
- Nori, J., Carrasco, P. A., & Leynaud, G. C. (2014). Venomous snakes and climate change: ophidism as a dynamic problem. *Climatic Change*, 122(1), pp. 67–80.
- Odor, D. L. (1965). The poison gland of the cottonmouth moccasin, *Ancistrodon p. piscivorus*, as observed with the electron microscope. *J. Morph.* 117, pp. 115-134.
- Orduna, T. A.; Lloveras, S. C.; Roodt, A. R.; García, S. I.; Hass, A. I.; Moreno, I.; Penna, A. N.; Sagardoyburu, S. (2007) Guía de prevención, diagnóstico, tratamiento y vigilancia epidemiológica de los envenenamientos ofídicos. Ministerio de Salud Presidencia de la Nación. Pp. 7.
- Orduna, T; Espinosa, M; Martino, O. (2011) Ofidismo y Aracnidismo. En: *Infectología y enfermedades infecciosas*, 1º ed. Journal, Buenos Aires, pp.1098-1101.
- Parpinelli, AC; Lopes, A; Sala, M A; Paulo, JM; Issa & López V. P. (2013). *Int. J. Morphol. Estudio Morfológico e Histoquímico de Glándulas Cefálicas de Bothrops alternatus (Ophidia, Viperidae)*. 31(3) pp.1026-1033.
- Patiño C.B.S. (2002). Serpientes Venenosas. Grupo de Estudio de Animales Silvestres (Boletín GEAS). Vol. II.
- Pough F.H., Janis C.M. & J.B. Heiser. (1999). *Vertebrate Life*. Fifth Edition. Prentice Hall Inc., Simon & Shuster Inc. New Jersey. Pp.733.
- Scrocchi, G.J; Moreta, J.C. & Kretzschmar, S. (2006). Serpientes del Noroeste Argentino. Fundación Miguel Lillo. Tucumán.
- Uetz, P. (2000). How many reptile species?. *Herpetological review*, 31 (1), pp.13-15.

- Uetz, P. (2018). The reptile data base. <http://www.reptile-database.org/>. Consultado el 4 de noviembre de 2022.
- Varela N. (2002). Evaluación clínica de reptiles. Bol GEAS 3: pp. 1-11.
- Vidal, N. (2002). Colubroid Systematics: Evidence for an Early Appearance of the Venom Apparatus Followed by Extensive Evolutionary Tinkering. J Toxicol Toxin Rev 21, pp. 21-41.
- Weinstein, S. A.; Smith, T. L.; Kardong, K. V.; (Año). Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles. Pp. 66-84.
- Young, B. A.; Blair, M.; Zahn, K. y Marvin, J. (2001). Mechanics of venom expulsion in *Crotalus*, with special reference to the role of the fang sheath. The anatomical record. 264, pp. 415-426.