



Universidad Nacional del Nordeste

Facultad de Ciencias Veterinarias

Corrientes – Argentina

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN
MÓDULO DE INTENSIFICACIÓN PRÁCTICA

OPCIÓN: Clínica de Pequeños Animales

TEMA: Estudio morfológico de glándulas del veneno de serpientes *Bothrops diporus*

TUTOR EXTERNO: Lic en Ciencias Biológicas Benítez, María Emilia

TUTOR INTERNO: Dra Teibler, Gladys Pamela

RESIDENTE: Fernández Camila Eleana

E-MAIL: eleanafernandez59@gmail.com

-AÑO 2022-

Dedicatoria

Dedico este trabajo a todas aquellas personas a las que los ofidios le generan tanto admiración como un sinfín de interrogantes.

Agradecimientos

Agradezco a mi familia y amigos por formar parte de un apoyo incondicional y constante en mi vida.

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

Agradezco a la Doctora Gladys Pamela Teibler por ser mi guía en este proyecto de investigación y por inspirarme a ser una profesional aficionada, con vocación y dedicada a resolver interrogantes desde el área de animales silvestres.

Agradezco a la Licenciada en Cs Biológicas María Emilia Benítez por transmitirme sus conocimientos que colaboraron en gran medida para este trabajo.

Agradezco a la Facultad de Ciencias Veterinarias por brindarme la posibilidad de participar en la beca CIN y al Grupo Fauna Kuarahy por incentivar me a aprender sobre animales silvestres.

Agradezco con el alma a mis animales de compañía, sobre todo a Draco y Kirara, que me brindaron su amor incondicional todos los años de la carrera y me motivaron día a día a querer ser Médica Veterinaria.

Índice

Dedicatoria.....	Pág.2
Agradecimientos.....	Pág.3
Resumen... ..	Pág. 5
Introducción.....	Pág. 6
Materiales y Métodos.....	Pág. 13
Resultados.....	Pág. 15
Discusión.....	Pág.22
Conclusiones.....	Pág.24
Bibliografía.....	Pág.25

Resumen

Las serpientes del género *Bothrops*, familia *Viperidae*, popularmente conocidas como yarará, se caracterizan por poseer un aparato inoculador del veneno formado por las glándulas venenosas, los músculos que rodean las glándulas y los colmillos inyectoros, que accionan todo en conjunto. El aparato glandular situado a ambos lados de la cabeza, está conformado por las glándulas principales del veneno y glándulas accesorias estas últimas desembocan en un conducto que vierten el veneno en los colmillos inyectoros, correspondientes a una dentición especializada denominada Solenoglifa. El objetivo del presente trabajo fue analizar histológicamente las glándulas del veneno de serpientes del género *Bothrops diporus* (yarará chica), comparando entre un ejemplar adulto y un viborezno. La metodología de trabajo consistió primeramente en la identificación taxonómica y ontogénica de dos piezas cadavéricas, cedidas por el Centro Interactivo de Serpientes Venenosas de Argentina (CISVA) dependiente de la cátedra de Farmacología y Toxicología de la FCV-UNNE, de ejemplares de *Bothrops diporus* de distintos estadios ontológicos (recién nacidas y adultas). Luego se procedió a realizar la extracción de las glándulas del veneno y su análisis macroscópico y microscópico, con tinción Hematoxilina y Eosina, y PAS (Ácido Periódico de Schiff). La histología demostró la estructura glandular compuesta por adenómeros y los distintos tipos celulares que los conformaron, de manera que se analizó cada par de glándulas en correspondencia con el ejemplar determinado. Los resultados de este proyecto pueden contribuir con el análisis ontogenético de la herpetofauna venenosa local como así también contribuir al mejor entendimiento de la fisiopatología de la intoxicación ocasionadas por estas especies.

Introducción

En Argentina se registran 136 especies y subespecies de serpientes, de las cuales el 87% son inofensivas para el hombre y el 18% restante son potencialmente peligrosas porque pueden causar un accidente ofídico. En el nordeste argentino habita la mayor diversidad de ofidios y corresponde a la zona más abundante de serpientes venenosas del país (Patiño *et al.*, 2008). En el nordeste argentino se encuentran 18 especies de serpientes venenosas entre la familia *Viperidae* y *Elapidae*. Los vipéridos constituyen dos géneros: *Bothrops*, vulgarmente conocidas como yararás y *Crotalus*, correspondiente a las serpientes cascabel. Las corales pertenecen a la familia *Elapidae*, caracterizadas por poseer anillos completos e impares de colores negro, rojo y blanco, rodeando todo su cuerpo.

La mayoría de las especies de serpientes no presentan glándula del veneno o medios eficientes para su inoculación, por lo que sus mordeduras no representan un riesgo de envenenamiento y corresponden a individuos de la familia *Boidae* y *Colubridae*. Dentro del primer grupo se puede mencionar a ejemplares como las boas curiyú, que utilizan todo su cuerpo para asfixiar a sus presas, y si bien las culebras presentan toxinas venenosas que le sirven para cazar, raramente causan intoxicaciones en seres humanos. Las serpientes de la familia *Colubridae*, se encuentran excluidas del grupo de ofidios de importancia sanitaria ya que, a pesar de que algunas de ellas provocan envenenamientos, la mayoría de las veces causan cuadros clínicos leves y las boas solo provocan lesiones traumáticas, motivo por el cual tampoco son consideradas de importancia sanitaria (Giraudó, 2001).

Para la medicina veterinaria interesa poder caracterizar a aquellos individuos potencialmente peligrosos debido a que pueden causar un accidente ofídico, el cual es ocasionado por una serpiente que presenta glándulas del veneno y un mecanismo eficiente para su inoculación, de manera que sus toxinas generan daños graves y muchas veces letales para el organismo. Esto es posible en aquellas especies que presentan modificaciones en sus dientes y cráneo permitiéndoles inyectar veneno, y de acuerdo al tipo de dentición que presentan, se clasifican en aglifas, opistoglifas, proteroglifas y solenoglifas (Scrocchi *et al.*, 2006) (**Figura 1**).

Aglifas: no poseen aparato diferenciado de inoculación de veneno; presentan dientes sin ranuras y no están modificados para inyectar toxinas. Por ejemplo, las boas, algunas culebras y serpientes ciegas.

Opistoglifas: en posterior del maxilar superior presentan un diente agrandado que posee un canal semicerrado por donde corre el veneno y debido a su ubicación es más difícil que se produzcan envenenamientos por mordeduras estas serpientes. Muchas culebras presentan este tipo de dentición.

Proteroglifas: poseen un diente de gran tamaño en la parte anterior del maxilar que se mantiene constantemente erecto y en su interior recorre un canal que puede llegar a estar casi completamente cerrado. Esta dentición es característica de las corales y si bien sus mordeduras son muy peligrosas, la mansedumbre de las especies argentinas hace que los accidentes sean extremadamente raros.

Solenoglifas: es el tipo de dentición más especializada, ya que el diente inoculador está transformado en un tubo que permite inyectar eficientemente el veneno (Scrocchi *et al.*, 2006). Este se ubica anteriormente en la boca, está en posición horizontal durante el reposo y; en el momento de morder, un mecanismo de palancas formado por algunos huesos y músculos craneales, erecta el colmillo y lo dispone para inyectar, de manera que el movimiento del colmillo y la contracción de la glándula de veneno son voluntarios e independientes. Esta condición se presenta en yararás y cascabel.

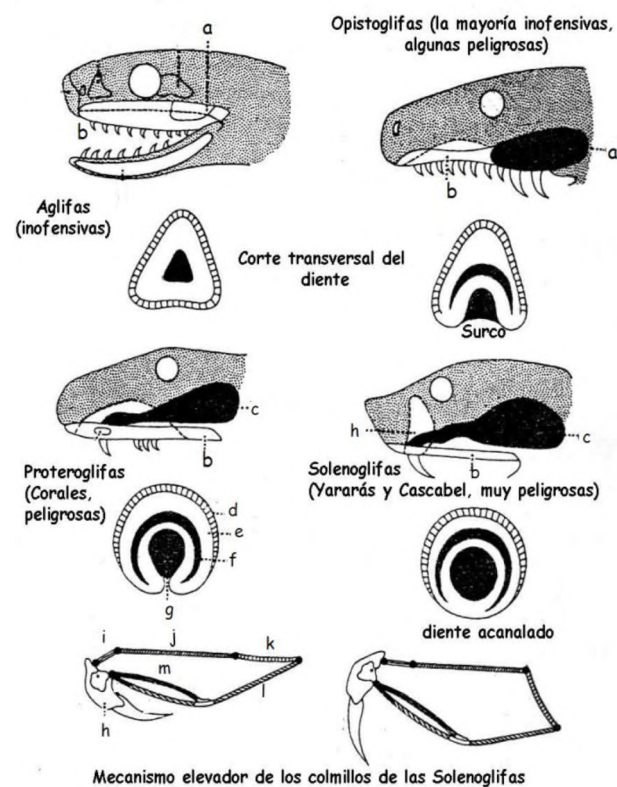


Figura 1: Tipos de dentición en serpientes. a: glándula de Duvernoy en culebras b: glándula supralabial c: glándula de veneno, d: esmalte, e: dentina, f: cavidad de la pulpa, g: canal del veneno, h: maxilar, i: prefrontal, j: frontal, parietal y escamoso, k: cuadrado, l: pterigoides, m: ectopterigoides.

La efectividad del veneno está relacionada con la capacidad para su inyección, como se ha mencionado anteriormente, pero también varía de acuerdo a las características glandulares. El veneno es secretado por glándulas especiales ubicadas a lo largo de la parte posterior del labio superior, que eliminan una mezcla de diferentes sustancias, algunas de función digestiva y otras tóxicas (Peichoto *et. al.*, 2014).

De acuerdo a la especie, estas glándulas varían en componentes del veneno, su toxicidad y su acción. La glándula de veneno de las culebras es homóloga a la de los vipéridos y elápidos, pero es anatómica y funcionalmente distinta debido a que no posee una cavidad central donde la secreción pueda ser almacenada, y el vaciamiento de la misma se realiza bajo un flujo de baja presión, ya que la glándula no está conectada a músculos especializados (Giraud *et al.*, 2009).

Los accidentes elapídicos son poco frecuentes y de baja letalidad; los autores relatan una frecuencia de accidentes por coral del 0,2% (de Roodt *et al.*, 2013.) Esto puede explicarse por el comportamiento no agresivo del animal, sus hábitos subterráneos y su dentición proteroglifa que hace menos eficaz la inoculación de la ponzoña condicionando el envenenamiento. En cambio, la mayoría de los accidentes ofídicos son causados por vipéridos de los cuales un 97% son ocasionados por serpientes del género *Bothrops* (Orduna *et al.*, 2011). Como se ha mencionado, la efectividad del envenenamiento se produce por una serie de factores, entre ellos la presencia y desarrollo de su aparato productor y los mecanismos que interfieren para su inyección.

La glándula venenosa es una glándula salival modificada; de forma ovoide, se halla situada a ambos lados de la cabeza, desde la parte posterior del maxilar superior hasta la comisura labial. Está asociada 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). En serpientes del género *Bothrops* la glándula se adelgaza en su porción anterior para convertirse en conducto primario, el cual después de un corto trayecto, sufre una dilatación y cambios en su estructura histológica que lo transforman en glándula accesoria. Esta glándula, 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. A partir de esta estructura, sigue luego un conducto que vierte el producto de secreción en el colmillo inyector, llamado conducto secundario (Patiño, 2002). La glándula del veneno es una glándula tubuloacinar que está rodeada por un tejido fibroso denso vascularizado, el cual emite septos que dividen el parénquima en varias regiones de orientación irregular, separan y sirven de soporte a los túbulos secretores (Bacha *et al.*,

2001). Dichos túbulos son largos y convergen de la región dorsal posterior a la región ventral anterior de la glándula, y están revestidos por un único 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. (Parpinelli *et al.*, 2013).

A pesar de que algunas serpientes puedan ocasionar accidentes ofídicos, el veneno les permite inmovilizar y digerir sus presas, así como defenderse de depredadores. Además, estas toxinas fueron utilizadas en la medicina humana tanto para la fabricación de drogas e investigación, como para generar los sueros antiofídicos, siendo éste el único tratamiento frente a sus mordeduras. La existencia de estos animales es importante debido a que presentan un rol fundamental en el control de roedores que transmiten graves enfermedades al hombre, cuyo impacto sanitario puede ser mayor al ofidismo (Giraud *et al.*, 2008). Inclusive algunos ofidios se alimentan de otras serpientes venenosas, interviniendo en su control poblacional. Sin embargo, debido al temor que causa su veneno y a su apariencia tan diferente a la de los animales con los que tenemos mayor contacto, se han tejido más mitos sobre las serpientes, que sobre cualquier otro grupo de animales. Debemos despojarnos de todos los prejuicios que tengamos sobre estos individuos y descubrir un maravilloso grupo de animales, que sufre diariamente la persecución implacable del hombre, en parte por su mala reputación, o por el tráfico de cueros y como mascotas. Desde la ciencia se puede aportar a la población con conocimientos que permitan valorar a estos animales y brindar información relevante para la comunidad, desde conocer su modo de vida hasta la forma de actuar ante accidentes ofídicos.

El estudio de las glándulas del veneno se puede considerar una forma de acercarnos a estos individuos, conocer sobre su anatomía y su relación con la ponzoña que producen. El objetivo del estudio fue analizar la morfología e histología de las glándulas de veneno de serpientes *Bothrops diporus*, vulgarmente conocidas como yarará chica, comparando entre un ejemplar adulto y un viborezo. Esto permite que sus resultados sean un nuevo aporte y se sumen a los numerosos estudios concernientes a la producción del veneno debido a sus múltiples propiedades benéficas. Es relevante ampliar el conocimiento histológico que se tiene sobre las glándulas productoras de veneno de estas serpientes, lo cual puede tener

implicancias en el ámbito de la investigación básica y aplicada y también para los actuales avances científicos a nivel toxinológicos de la misma.

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 de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Nordeste, con colaboración de los laboratorios de Patología General y Sistemática, de Histología y Embriología y el Servicio de Diagnóstico Histopatológico y Citológico del Área de Diagnóstico Complementario del Hospital Escuela Veterinario correspondiente a la facultad antes mencionada, ubicada en el Campus Sargento Cabral en la Capital de Corrientes.

Materiales y Métodos

Animales

El estudio fue realizado con piezas cadavéricas formoladas, de ejemplares de *Bothrops diporus* aportados por el Centro Interactivo de Serpientes Venenosas de Argentina (CISVA), perteneciente a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNNE. Se procedió en primer lugar a la identificación taxonómica y ontogénica de 1 ejemplar viborezno y 1 adulto. Además, se procedió a registrar la longitud hocico cloaca (LHC o SLV en inglés) mediante el uso de la técnica de análisis morfométricos y sexado utilizando un catéter (Varela, 2002) y se registró el peso corporal.

El estudio de las glándulas de veneno de *B. diporus* 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”, a cargo de la Lic. En Cs. Biológicas María Emilia Benítez. Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNNE y número de protocolo 0079 (se adjunta el comprobante).

Técnica de extracción de las glándulas del veneno

Para realizar la toxoadenectomía (Randall, 2018) de serpientes yarará se utilizó la técnica de Kochva y Gans modificada. La misma consiste en realizar un primer corte transversal desde la línea media hasta lateral de la articulación temporo-mandibular, luego una segunda incisión longitudinal hacia craneal hasta el colmillo, levantando de esta manera la piel y dejando expuesta la glándula productora del veneno (Figura 2 y 3).



Figura 2: Técnica de Kovcha y Gans modificada aplicada en *B. diporus* adulto.

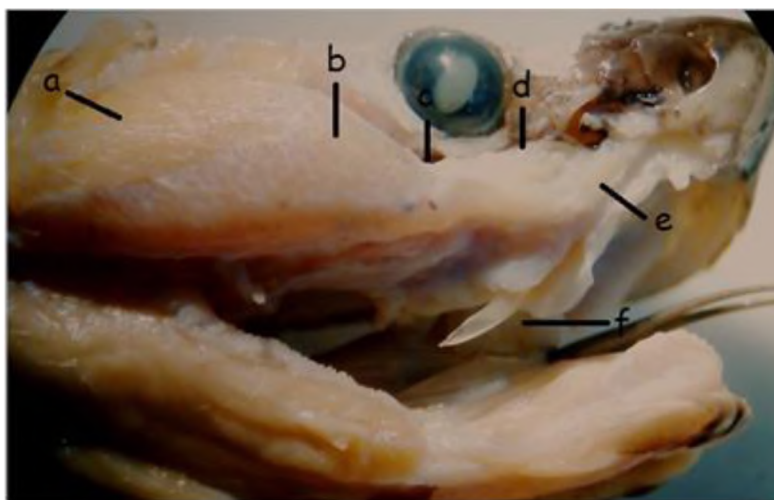


Figura 3: a: musculatura estriada, b: glándula principal del veneno, c: conducto primario, d: glándula accesoria del veneno, e: conducto secundario, f: colmillo inyector.

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. Todas las actividades fueron registradas fotográficamente.

Procesamiento histológico

Debido a que la pandemia de SARS- COV 19 impidió el desarrollo de distintas áreas de la universidad, el procesamiento histológico se realizó en dos instancias. La primera se realizó de forma manual (Figura 4) en el laboratorio de Toxicología de la

Cátedra de Farmacología y posteriormente en el año 2021 se continuó en el laboratorio de Diagnóstico Histopatológico y Citológico del Hospital Escuela.

El procesamiento histológico 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



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

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 realizó con el microscopio Cart Zeiss Primo Star.

Resultados

Los resultados obtenidos permitieron describir la morfología de las glándulas de venenos. El ejemplar viborezno presentó una longitud corporal total de 34 cm y desde el hocico hasta la cloaca (LHC) de 30 cm, siendo su peso corporal de 21 g. La yarará adulta midió una longitud corporal total de 98 cm, su LHC fue 86 cm y peso corporal de 350 g (Figura 5).

Las glándulas de veneno de ambos ejemplares estaban compuestas por dos regiones secretoras unidas por un conducto primario corto; presentaron una porción anterior pequeña, la glándula accesoria y una glándula principal de mayor tamaño. Todas presentaron una forma ovalada y superficie lisa. El análisis morfológico de las glándulas del veneno del ejemplar más joven fue realizado bajo los mismos parámetros tanto para la derecha como para la izquierda. La primera tuvo un tamaño de 0.5 cm de largo y 0,3 cm de ancho y su peso fue de 0,02 g; y el tamaño de la glándula izquierda fue de 0,5 cm de largo y 0,3 cm de ancho, con un peso de 0,01 g.

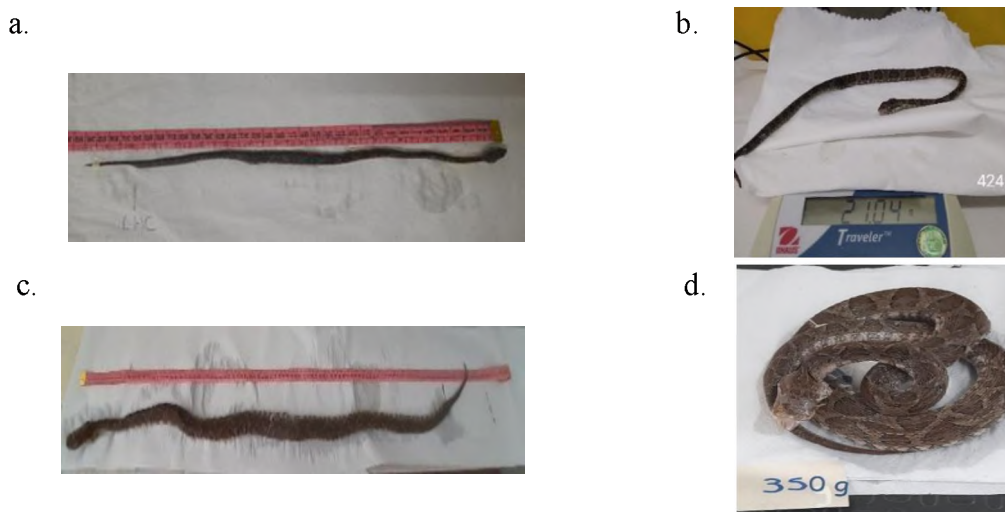


Figura 5: Análisis morfológico de *B. diporus* viborezo (a y b) y adulto (c y d).

Por otra parte, los datos obtenidos para la serpiente *B. diporus* adulta fueron los siguientes: la glándula del veneno izquierda pesó 0.23 g con un tamaño de 2.5 cm de largo, 0.5 cm de ancho; la glándula derecha tuvo un peso de 0.21 g, 3 cm de largo y 0.5 cm de ancho. Ambas glándulas presentaron un color castaño claro (Figura 6).

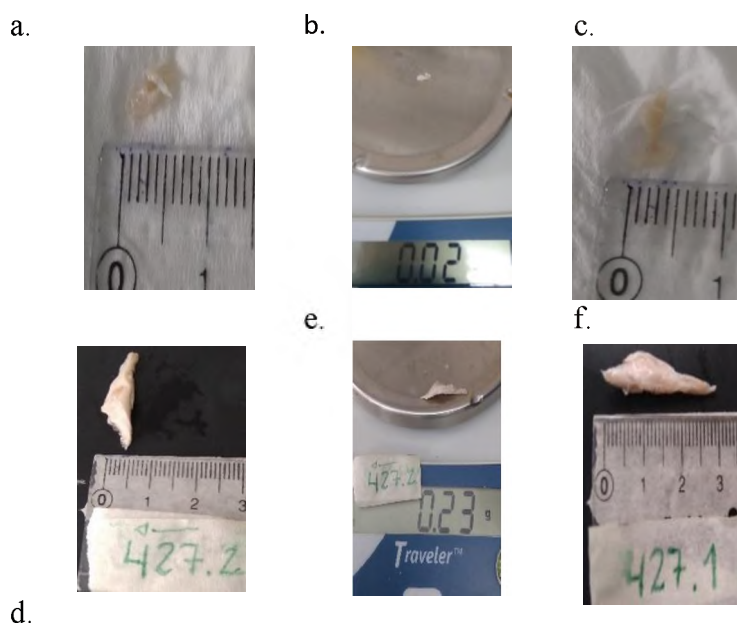


Figura 6: Análisis morfológico de: glándula del veneno derecha (a y b) e izquierda (c) de *B. diporus* viborezo; glándula del veneno izquierda (d y e) y derecha (f) de *B. diporus* adulto.

El estudio histológico demostró la estructura glandular compuesta por adenómeros y los distintos tipos celulares que los conformaron, de manera que se analizó cada par de glándulas en correspondencia con el ejemplar determinado.

En el análisis microscópico de las glándulas del veneno de ambos individuos se observaron las unidades secretoras rodeadas por una cápsula de tejido conjuntivo denso, la cual 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 (Figura 7). Por otra parte, rodeando externamente a la cápsula, se observaron haces de fibras musculares estriadas esqueléticas, correspondiente al músculo compresor, dispuestas en diferentes sentidos (Figura 8).

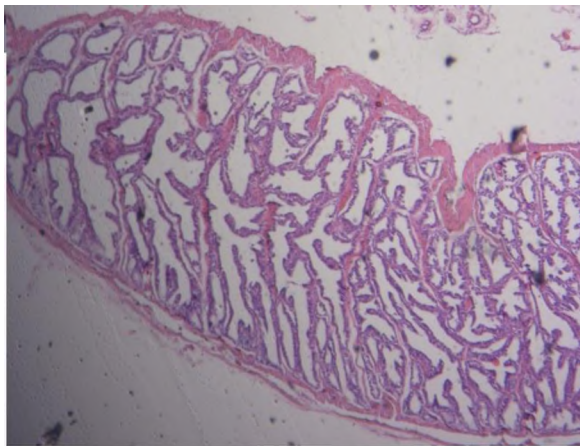


Figura 7: Fotomicrografía de glándula del veneno derecha de *B. diporus* viborezno. Se observa la estructura glandular sin veneno, rodeada por la cápsula de tejido conectivo que emite trabéculas hacia el interior. (Tinción: H-E, 100x)

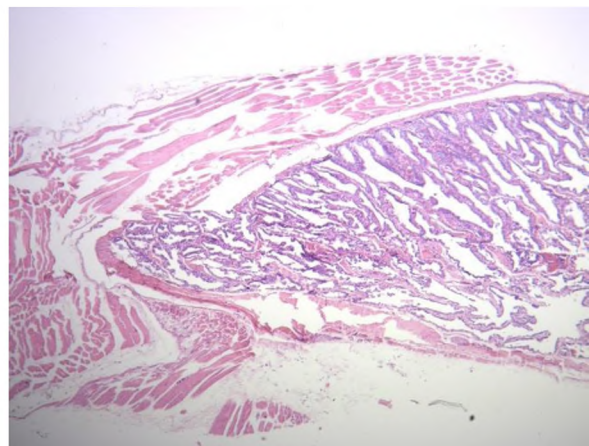


Figura 8: Fotomicrografía de corte longitudinal glándula del veneno izquierda de *B. diporus* viborezno. Se observa a la derecha la glándula con adenómeros vacíos y a la izquierda al músculo compresor. (Tinción hematoxilina eosina, 40x)

La histología de ambas glándulas del veneno de *B. diporus* viborezno demostró que estaban compuestas por adenómeros vacíos de veneno. Estos acinos glandulares presentaron dos tipos celulares: las células principales con núcleo homogéneo y en su base las células horizontales. El primer tipo celular mencionado presentó forma cilíndrica lo que indica proceso de síntesis de secreción (Figura 9 y 10).

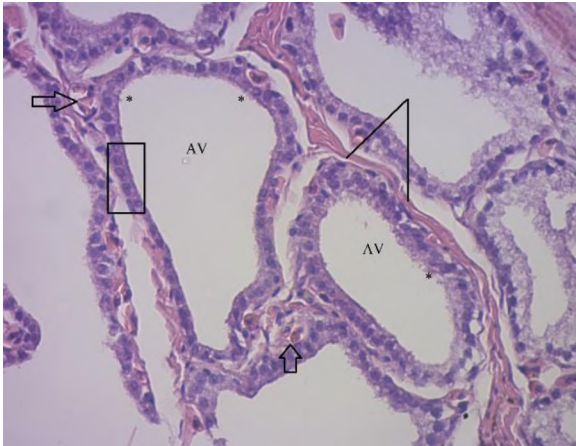


Figura 9: Fotomicrografía de corte longitudinal de glándula del veneno izquierda de *B. diporus viborezno*. Línea: trabéculas, AV: adenómeros vacíos, cuadro: células principales cúbicas, *: gránulos de secreción, punta de flecha: glóbulos rojos nucleados. (Tinción

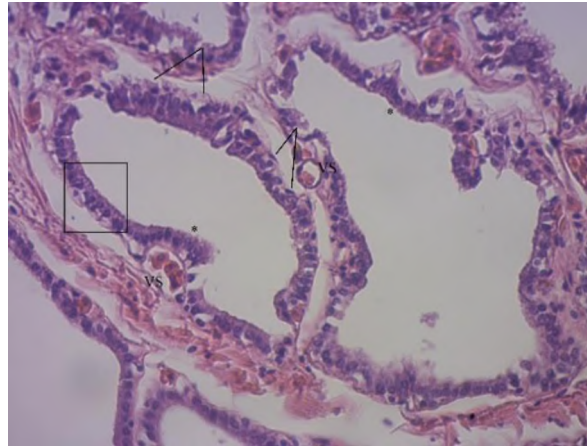


Figura 10: Fotografía histológica de corte longitudinal de glándula del veneno derecha de *B. diporus viborezno*. VS: Vasos sanguíneos, cuadro: células principales, línea: células horizontales, *: gránulos de secreción. (Tinción hematoxilina eosina, 400x).

La fotomicrografía de ambas glándulas teñidas con tinción PAS arrojaron datos similares, las trabéculas presentaron coloración PAS positivo, así como la membrana basal de las células principales (Figura 11 y 12).

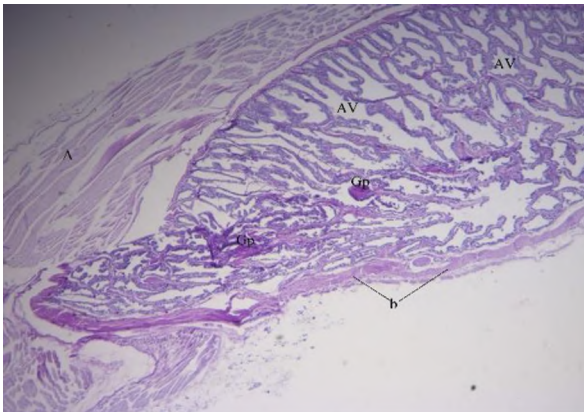


Figura 11: Fotomicrografía de corte longitudinal de glándula del veneno izquierda de *B. diporus viborezno*. Obsérvese las trabéculas de la cápsula PAS positivas. A: músculo compresor, b: tejido conectivo capsular, Gp: gránulos PAS positivo. AV: adenómeros vacíos. (Tinción PAS, 100x).

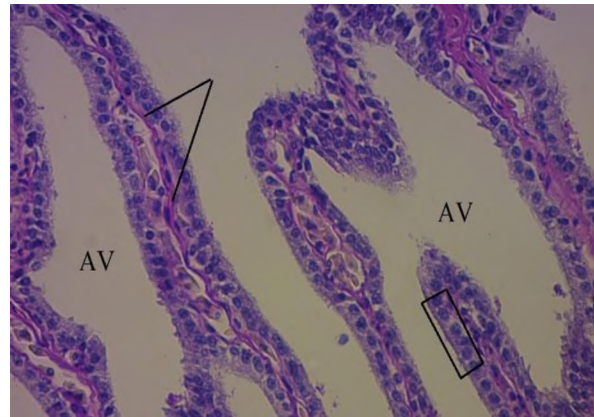


Figura 12: Fotomicrografía de corte longitudinal de glándula del veneno derecha de *B. diporus viborezno*. Se observan las células principales cúbicas (cuadro), los adenómeros vacíos (AV), las trabéculas de tejido conectivo capsular (líneas) y la membrana basal celular PAS positivos. (Tinción PAS, 400x).

En cuanto a la histología de los aparatos glandulares de *B. diporus* adulto demostró que ambos poseían mayor cantidad de adenómeros con secreción en comparación del ejemplar viborezno. Como se revela en las figuras 13 y 14, la glándula principal del veneno derecha presentó gran cantidad de adenómeros con contenido, mientras que la glándula opuesta presentó en mayor proporción acinos glandulares vacíos. Se pudo evidenciar en ambas glándulas la presencia de células principales y horizontales que constituían a los túbulos secretores, y un enramado de trabéculas que los separaban entre sí. La histología de las glándulas derecha e izquierda evidenció que presentaban células principales aplanadas (Figura 15 y 16). Las trabéculas de tejido conectivo capsular y membrana basal de la glándula del veneno izquierda demostraron una coloración PAS positivo, así como el contenido presente en algunos adenómeros, mientras que otros acinos glandulares con menos veneno, presentaron coloración PAS negativo. En la glándula contralateral la reacción PAS positivo fue más evidente, debido a que los acinos glandulares presentaron mayor cantidad de veneno, el cual contiene mucopolisacáridos que se evidencian al generar una coloración púrpura, y en menor proporción se evidenciaron adenómeros PAS negativo. Esta glándula derecha también reveló la reacción PAS positiva en trabéculas de tejido conectivo y membrana basal de células principales. (Figura 17 y 18).

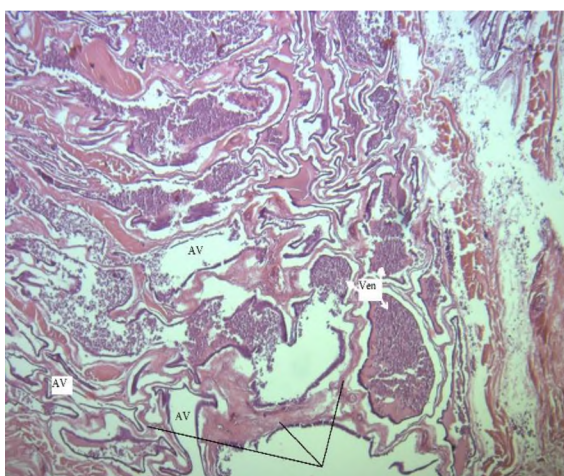


Figura 13: Fotomicrografía de corte longitudinal de glándula del veneno izquierda de *B. diporus* adulto. Se observan adenómeros vacíos (AV) y con veneno (Ven), rodeados de trabéculas de tejido conectivo capsular (líneas), (Tinción HE, 40x.).

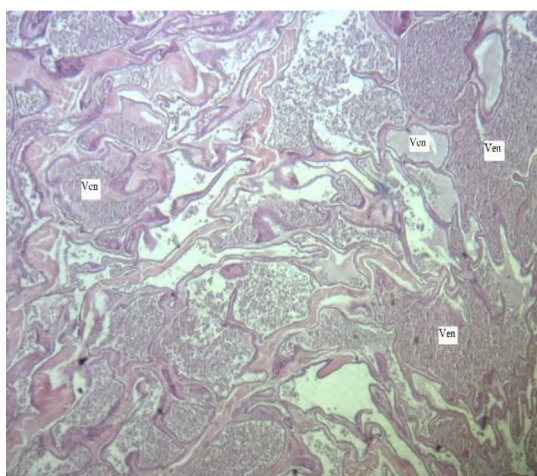


Figura 14: Fotomicrografía de corte longitudinal de glándula del veneno derecha de *B. diporus* adulto. Se observan mayor cantidad de adenómeros con veneno (Ven) a comparación con la glándula opuesta (Tinción HE, 40x.).

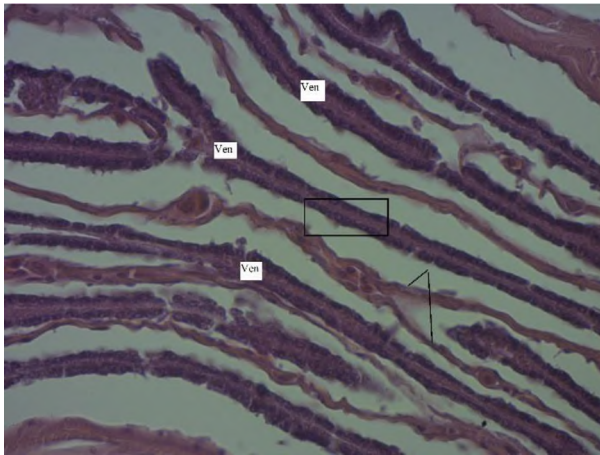


Figura 15: Fotomicrografía de corte longitudinal de glándula del veneno izquierda de *B. diporus* adulto. Cuadro: células principales aplanadas, línea: trabéculas de tejido conectivo, Ven: veneno. (Tinción: HE, 400x).

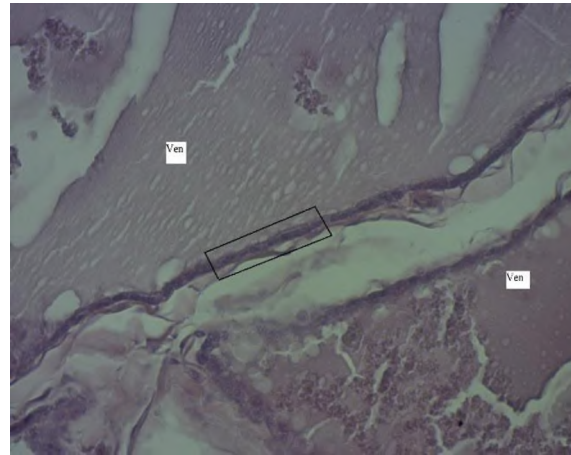


Figura 16: Fotomicrografía de corte longitudinal de glándula del veneno derecha de *B. diporus* adulto. Se observan las células principales aplanadas (cuadro) y el contenido (Ven) de los adenómeros. (Tinción HE, 400x).

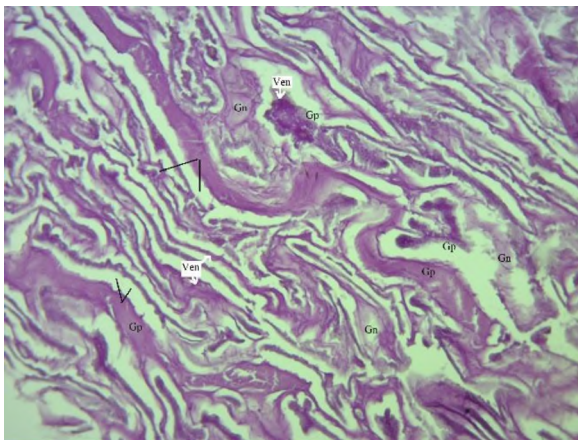


Figura 17: Fotomicrografía de corte longitudinal de glándula del veneno izquierda de *B. diporus* adulto. Se observan las trabéculas de tejido conectivo (líneas) y veneno (Ven) PAS positivos (Gp). Adenómeros con menor contenido presentaron gránulos PAS negativos (Gn). (Tinción PAS, 400x).

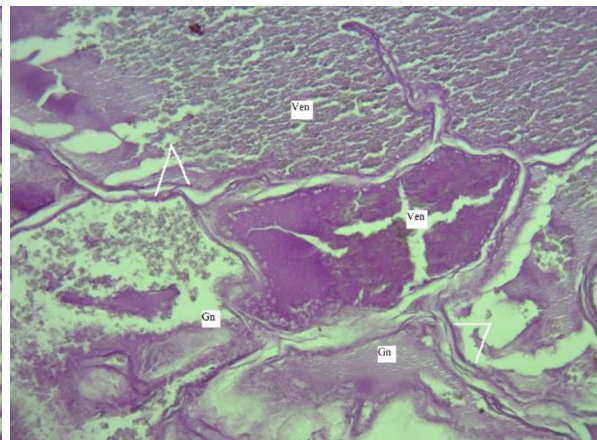


Figura 18: Fotomicrografía de corte longitudinal de glándula del veneno derecha de *B. diporus* adulto. Se observan las trabéculas de tejido conectivo (líneas) y adenómeros con veneno (Ven) PAS positivos. Gn: Gránulos PAS negativos. (Tinción PAS, 400x).

En este trabajo se pudo realizar el análisis histomorfométrico sobre el ejemplar *B. diporus* viborezno, que permitió obtener valores de área glandular de 2,5 y 2,6 mm² para la glándula derecha e izquierda, respectivamente. En cuanto a las células secretoras alveolares de la porción glandular derecha se registró una altura de 8,1 µm y un diámetro nuclear de 4,3 µm, mientras que la porción glandular izquierda presentó una altura epitelial de 8,88 µm y un diámetro nuclear promedio de 4,29 µm. Además, la relación entre el parénquima y estroma glandular y su perímetro fue de 0,21 mm² por cada µm de perímetro para la glándula derecha y 0,27 mm² para la porción glandular izquierda (Tabla 1).

Tabla 1: Análisis histomorfométrico de glándulas derecha e izquierda de *B. diporus* viborezno

Parámetros	Glándula del veneno derecha	Glándula del veneno izquierda
Área glandular (mm ²)	2,5	2,6
Células secretoras alveolares:		
Altura (µm)	8,1	8,88
Diámetro nuclear	4,3	4,29
Relación parénquima, estroma glandular y perímetro/1000 µm	0,21	0,27

Durante el año 2019 formé parte del equipo de trabajo, en el cual me encuentro inserta, que realizó el análisis de fotomicrografías de microscopía electrónica de barrido (MEB) de los adenómeros de ambas glándulas de un ejemplar *B. diporus* adulto. Debido a problemas técnicos y sumados a la pandemia de COVID 19, se imposibilitó la utilización de todo el equipamiento necesario para realizar este análisis. Sin embargo, se lo menciona ya que complementa la investigación sobre morfología toxicológica de yararás. A través del MEB, se observaron acinos glandulares con veneno y las células componentes de los túbulos colectores, rodeados por septos de tejido conectivo capsular (Figura 19, y 20). Las fotomicrografías de MEB permitieron revelar la estructura histológica de las glándulas del veneno que coinciden con en este trabajo. Los resultados obtenidos por morfología macroscópica e histología fueron comparados con la bibliografía de otros autores nacionales e internacionales.

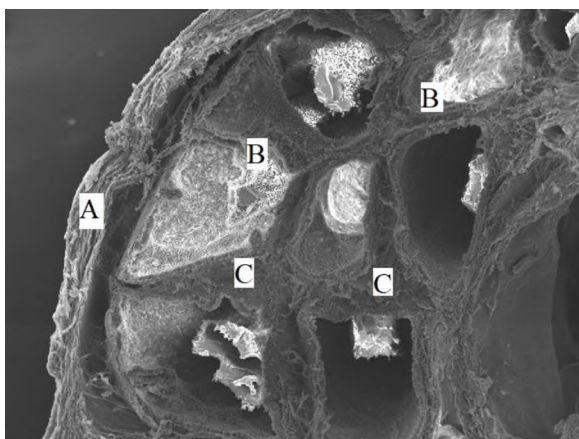


Figura 19: Fotomicroscopía electrónica de barrido de corte longitudinal de glándula del veneno de *B. diporus* adulto. A: cápsula de tejido conectivo. B: adenómeros con veneno. C: trabéculas capsulares (Magnificancia x80).

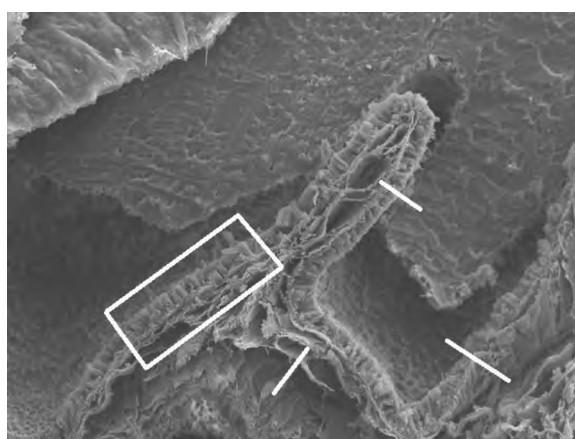


Figura 20: Fotomicroscopía electrónica de barrido de corte longitudinal de glándula del veneno de *B. diporus* adulto. Obsérvese las células principales cilíndricas (cuadro) y las trabéculas de tejido conectivo que rodean al túbulo secretor (líneas) (Magnificancia x80).

Discusión

La técnica de Kovcha y Gans (1966), para la extracción de glándulas de veneno de serpientes sugiere la disección desde el borde ventral del maxilar superior hacia la superficie latero-ventral de la órbita ocular. En el presente trabajo se utilizó una variante de esta técnica, que facilitó el acceso y la extracción de la glándula sin modificar su arquitectura morfológica. Mediante esta práctica se pudo realizar la disección de ambos órganos de manera íntegra, con sus distintos componentes anatómicos para el posterior análisis histológico. Estos resultados coincidieron con los descritos por Parpinelli (2013) en serpientes del mismo género del Brasil.

Las observaciones realizadas en las glándulas de veneno tanto de *B. diporus* viborezo y adulto, demostraron que son órganos parenquimatosos, donde los adenómeros son de forma tubular y ramificados, tal como lo reportan (Kochva y Gans, 1966). La glándula principal presentó un estroma grueso y uno fino, el primero representado por una cápsula de tejido conectivo general denso irregular proporcionándole soporte, nutrición e inervación al parénquima. En las glándulas derecha e izquierda del ejemplar adulto se observó que el producto de secreción localizado en los adenómeros ligeramente vacíos presentó aspecto granular PAS negativo y en los adenómeros llenos de secreción su aspecto fue homogéneo PAS positivo. Esto corresponde con Parpinelli *et al.* (2013) el cual indica 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), el cual reacciona con la tinción PAS. Las trabéculas emitidas por el tejido conectivo capsular y la membrana basal de las células principales también evidencian PAS positivo debido a que contienen los compuestos químicos antes mencionados. La bibliografía establece que el citoplasma es basófilo en las células de la porción anterior de la glándula, y un citoplasma heterogéneo en el resto de las porciones, es decir en el polo basal es acidófila y en el polo apical es basófilo; los núcleos se observaron en su mayoría esféricos y heterocromáticos. (Álvarez *et al.*, 2014).

El análisis realizado en ambos individuos *B. diporus* no reveló diferencias significativas en las características celulares de las distintas porciones del aparato glandular. Con respecto a los músculos que rodean al aparato glandular, se observó que cada fibra muscular estriada esquelética presentó las características histológicas propias de los reptiles, es decir, de forma cilíndrica y alargada, con un sarcoplasma acidófilo y de aspecto heterogéneo debido a la presencia de las estriaciones transversales. Los núcleos se observaron dispuestos en todo el sarcoplasma, siendo de formas planas y heterocromáticos, coincidente con lo que determina Zago (1971).

La bibliografía citada menciona que los adenómeros poseen tres tipos de células: células principales, células ricas en mitocondrias y células horizontales (Gopalakrishnakone, 1985). Las células principales poseen microvellosidades, gránulos densos y vacuolas pálidas en la región supra nuclear y en el ápice de la célula (Warshawsky *et al.*, 1973). En ambos ejemplares se observó tinción PAS-positiva en la membrana plasmática apical de las células altas, como indica Kochva y Gans (1966). Según Warshawsky *et al.*, (1973), los acinos glandulares también se componen de células ricas en mitocondria, que poseen glucógeno y microvellosidades, siendo su función concentrar el producto de secreción. En el presente trabajo no se observaron estas estructuras. Sin embargo, se diferenciaron las células horizontales, localizadas entre la superficie basal de las células principales y la membrana basal. Algunos autores afirman que tienen actividad fagocítica y su contracción permite la expulsión del veneno (Gopalakrishnakone, 1985), lo que sugiere una fase temprana de una célula secretora. Las células principales varían morfológicamente de acuerdo a la extracción o no del veneno, es decir, las células de las glándulas no ordeñadas poseen una morfología que varían entre cúbicas y planas, y después

de algunos días post-ordeño son de forma cilíndrica; indicando con ello actividad de síntesis (Carneiro *et al.*, 1991); estas características fueron observadas en los ejemplares utilizados para este trabajo.

Conclusiones

Se concluyó que la técnica de Kochva y Gans (1966) modificada que se utilizó en el trabajo, permitió un mejor abordaje del tejido glandular de serpiente del Género *Bothrops*, conservando la pieza anatómica para posteriores usos. Las características macroscópicas observadas fueron similares a las pertenecientes a las serpientes de la familia Viperidae citadas por otros autores de otras regiones geográficas. El análisis histológico en ambos ejemplares reveló a los acinos glandulares rodeados de tejido conjuntivo denso, que converge hacia el centro de la glándula de forma irregular, separándose en lóbulos y, estos a su vez, en lobulillos, conformados por distintos tipos celulares. Con los resultados obtenidos por morfometría se realizó la comparación entre glándula derecha e izquierda para analizar la funcionalidad glandular y no se encontraron diferencias significativas para los datos analizados. Las experiencias realizadas permitieron ampliar el conocimiento sobre la toxicología ofídica y generar descripciones histológicas sobre la composición, estructura y las características del tejido glandular y de la secreción de la especie *Bothrops diporus*, en estado juvenil y adulto, y evaluadas y analizadas por la microscopía convencional (MO), apoyada ésta por las tinciones de H&E y PAS. Sin embargo, se recomienda ampliar el campo de estudio y realizar una comparación con mayor cantidad de ejemplares de distintos estadios ontogénicos. Se concluye que la caracterización histológica y morfométrica de las glándulas del veneno de *B. diporus* posibilita tener una visión holística de la problemática ofídica en la región, teniendo en cuenta que las serpientes del género *Bothrops* son las responsables de más del 95% de los accidentes ofídicos en Argentina. Los resultados de este proyecto pueden contribuir con el análisis ontogenético de la herpetofauna venenosa local como así también contribuir al mejor entendimiento de la fisiopatología de la intoxicación ocasionadas por estas especies. Igualmente se recomienda complementar el estudio con microscopía electrónica y a la par de exhortar a otras áreas científicas para seguir uniendo esfuerzos en las continuas investigaciones que actualmente se realizan en torno a las numerosas propiedades benéficas del veneno de las serpientes.

Bibliografía

- ÁLVAREZ, JOHILMER; NORIEGA, JOSÉ; PÉREZ MIRLENY; PUZZAR, SPIRIDIONE; MOGOLLÓN, ALEZANDER. 2014. Descripción histológica del parénquima de la glándula principal de veneno de la serpiente *Crotalus durissus cumanensis*. Revista del Colegio de Médicos Veterinarios del Estado Lara. Urb. Nueva Segovia, calle 4, Barquisimeto, Estado Lara, Venezuela. Año 4. Número 2. Volumen 8. Pág. 47 - 53.
- BACHA, W; BACHA, L. M. 2001. Atlas Color de Histología Veterinaria. Ed. Intermedica, segunda edición.
- 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): 569-580.
- DE ROODT, AR; DE TITTO, E; DOLAB, JA; CHIPPAUX, JP. 2013. Envenoming by coral snakes (*Micrurus*) in Argentina, during the period between 1979-2003. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 55, 13-18.
- GIRAUDO, A.R. 2001. Diversidad de serpientes de la selva Paranaense y del Chaco húmedo. Taxonomía, biogeografía y conservación. Literature of Latin America, Buenos Aires, Argentina.
- GIRAUDO, AR; ARZAMENDIA, V; LÓPEZ, SM; QUAINI, R; PRIETO, Y; LEIVA, LA; REGNER, SA, URBAN, JM. 2008. Serpientes venenosas de Santa Fe, Argentina: conocimientos sobre su historia natural aplicados para la prevención de ofidismo. *Rev. FABICIB* 12: 69-89.

- GIRAUDO, AR; ARZAMENDIA, V. 2009. Serpientes venenosas del nordeste argentino: Identificación y prevención de ofidismo. Curso dictado en el Instituto Nacional de Limnología y Asoc. Cienc. Nat. Litoral, Santa Fe. 8 páginas.
- GOPALAKRISHNAKONE, P. 1985. Light and electron microscopic study of the venom apparatus of the saw scaled viper *Echis carinatus*. *The Snake*. 17: 10-14.
- KOVCHA; Gans. 1966. Histology and Histochemistry of Venom Glands of Some Crotaline Snakes. *Copeia*, vol. (3).
- ORDUNA, T; ESPINOSA, M; MARTINO, O. 2011 Ofidismo y Aracnidismo. En: *Infectología y enfermedades infecciosas*, 1º ed. Journal, Buenos Aires, p.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):1026-1033.
- PATIÑO C.B.S. 2002. Serpientes Venenosas. Grupo de Estudio de Animales Silvestres (Boletín GEAS). Vol. II.
- PATIÑO; STELLA. 2008. Serpientes Venenosas. Grupo de Estudio de Animales Silvestres. (Boletín GEAS). Vol. 3.
- PEICHOTO, ME; SALOMÓN, OD. 2014. La Problemática del Ofidismo en la Región Nordeste de Argentina: Una Mirada Científica Integradora. 1º edición. Puerto Iguazú, INMET.
- RANDALL ARGUEDAS. 2018. Uso del Término “Toxoadenectomía para Denominar la Técnica Quirúrgica de Remoción de las Glándulas de Veneno de la Familia Viperidae y Elapidae. *Fauna LAB. Revista Electrónica de Veterinaria* 19(6).

- SCROCCHI, G.J; MORETA, J.C. & KRETZSCHMAR, S. 2006. Serpientes del Noroeste Argentino. Fundación Miguel Lillo. Tucumán.
- VARELA, N. 2002. Evaluación clínica de reptiles. Bol GEAS 3: 1-11
- WARSHAWASKY, H.; HADDAD, A.; GONCALVES, R. P.; VALERI, V. y DE LUCCA, F. L. 1973. Fine structure of the venom gland epithelium of the south american rattlesnake and radioautographic studies of protein formation by the secretory cells. American Journal of Anatomy 138: 79-120.
- 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. 264:415-426.
- ZAGO, D. A. 1971. Estudo morfológico e histoquímico de glândulas salivares relacionadas com a evolução da função venenosa nos ofídios. Tese de Doutorado, Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo,