



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE  
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIOCÊNCIAS**

**CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LAS PARASITOSIS QUE AFECTAN A LOS  
COLÚBRIDOS EN CAUTIVERIO: POSIBLE CORRELACIÓN CON LAS  
PROPIEDADES DE SUS VENENOS**

**MARÍA LUCÍA BUSTOS**

Foz do Iguaçu

2019



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS  
DA VIDA E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIOCÊNCIAS**

**CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LAS PARASITOSIS QUE AFECTAN A LOS  
COLÚBRIDOS EN CAUTIVERIO: POSIBLE CORRELACIÓN CON LAS PROPIEDADES  
DE SUS VENENOS**

**MARÍA LUCÍA BUSTOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dra. María Elisa Peichoto.

Coorientador: Prof. Dra. Gladys Pamela Teibler.

Foz do Iguaçu

2019

MARÍA LUCÍA BUSTOS

**CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LAS PARASITOSIS QUE AFECTAN A LOS  
COLÚBRIDOS EN CAUTIVERIO: POSIBLE CORRELACIÓN CON LAS PROPIEDADES  
DE SUS VENENOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

**BANCA EXAMINADORA**



---

Dra. María Elisa Peichoto  
Orientador  
UNILA



---

Prof. Dr. Flávio Luiz Tavares  
UNILA



---

Prof. Dra. Sanely Lourenço da Costa  
UNILA

Foz do Iguaçu, 05 de agosto de 2019.

Catálogo elaborado pela Divisão de Apoio ao Usuário da Biblioteca Latino-Americana  
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA

B982

Bustos, María Lucía.

Contribución al estudio de las parasitosis que afectan a los Colúbridos en cautiverio: posible correlación con las propiedades de sus venenos / María Lucía Bustos. - Foz do Iguaçu, PR, 2019.

106 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana. Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza. Programa de Pós-Graduação em Biociências. Foz do Iguaçu - PR, 2019.

Orientador: María Elisa Peichoto.

Coorientador: Gladys Pamela Teibler.

1. Cobras - Cativeiro. 2. Colubridae. 3. Parasitos. 4. Veneno. I. Peichoto, María Elisa. II. Teibler, Gladys Pamela. III. Universidade Federal da Integração Latino-Americana. IV. Título.

CDU 591.557.8+598.115

Dedico este trabajo a mis padres y a  
mis hermanas, María Virginia y María  
Florencia.

## AGRADECIMIENTOS

En vistas a la conclusión de esta maestría en Biociencias, quisiera agradecer a las personas que lo hicieron posible, que de una u otra forma me ayudaron y apoyaron en este hermoso camino de mucho aprendizaje, desafíos y crecimiento (tanto profesional como personal).

A mis padres, por enseñarme el valor del esfuerzo, del compromiso, por fomentar desde siempre mi afición al conocimiento, el leer “un poquito más”, la pasión por aprender y enseñar. Son mi modelo a seguir como profesionales y seres humanos, gracias por estar presentes todos los días y en cada minuto de mi vida. En esta hermosa etapa de crecimiento profesional espero retribuirles todo el amor que me dieron todos estos años, los amo con todas las fuerzas de mi corazón.

A mi orientadora, María Elisa Peichoto, por su paciencia, dedicación y ayuda desde antes del inicio de la maestría, además de ser una excelente profesional e investigadora considero que fuiste un gran apoyo en esta emocionante y enriquecedora travesía. Gracias por depositar tu confianza en mí, compartir tus conocimientos conmigo y contribuir a mi formación profesional.

A mi co-orientadora Pamela Teibler, por incentivar y alentarme siempre, por tener una solución simple a todos los problemas y por fomentar en mí el amor por la docencia. Sos un ejemplo de ser humano y profesional para mí, espero retribuir al menos en parte todo el cariño, paciencia y motivación que me transmitiste en todos estos años y que estés orgullosa de mí.

Agradezco a ambas (Elisa y Pamela) por ayudarme a conocer este fascinante mundo de las serpientes.

A mis tías, tíos, primas y primos amados, por enriquecer mis días con risas y con palabras de aliento, por esas reuniones de domingo que me llenan de energías para seguir.

A mis compañeros y amigos de la maestría: Allysson, Marcela, Gabriel, Ana y Luciana por haberme recibido tan bien en mi querido Foz do Iguaçu, por ayudarme a refrescar mi portugués, por las risas, las charlas, las “caronas” los consejos y los mates compartidos. Sin ustedes todo habría sido mucho más difícil, ¡gracias de corazón!

A mi amiga Marília por ser un apoyo, compañía y una consejera constante, por ayudarme tanto con estadística como con las dificultades del día a día en este mundo de la investigación, infinitas gracias por el aguante, las risas y los abrazos siempre.

A mis amigas/hermanas Paula y Solcyto, por la amistad de tantos años, por apoyarme, cuidarme y preocuparse siempre por mí. Soy una privilegiada por tenerlas en mi vida, gracias por acompañarme a cada paso de este camino, creyendo en mí y motivándome siempre a seguir.

A mis amigas/hermanas de Corrientes, Camencha, Cacho, Azu, Beba, Gi, Noe y Luz, por estar siempre presentes a pesar de los kilómetros que nos separan, por acortar distancias con video llamadas y por aguantar los audios eternos en los que les contaba mis preocupaciones, dudas y alegrías. Gracias por los años de amistad y por tanto cariño.

A Matías, Stefy y Karen y a todo el equipo del Centro Interactivo de Serpientes Venenosas de Argentina (CISVA) por ayudarme con las colectas de muestras, por compartir sus conocimientos conmigo, por los ricos mates de las mañanas y por su amistad, ¡muchísimas gracias!

A mi amiga Ale, gracias por mandarme las mejores energías todo el tiempo, por ayudarme con el inglés y por estar siempre presente.

A la M.V. Sara Ulon, por su ayuda y asesoramiento en epidemiología, ¡gracias por su buena disposición!

A la Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por la beca de estudios del programa de Demanda Social (DS).

Al Programa de Pos Graduación en Biociencias de la Universidad Federal de Integración Latinoamericana (UNILA) por darme la oportunidad de realizar la maestría, por los conocimientos adquiridos y por permitirme aprender muchísimo de los profesores e investigadores.

A las cátedras de Microbiología, Farmacología y Toxicología, al servicio de Histopatología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Nordeste, al Instituto Nacional de Medicina Tropical por la colaboración en las distintas etapas de la realización de este trabajo, y al Lic. Ariel López por su colaboración en el manejo y cuidado de los ofidios del INMeT.

***«La ciencia no sabe de países, porque el conocimiento le pertenece a la humanidad y es la antorcha que ilumina al mundo. La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de todo progreso».***

**Louis Pasteur**

***“La ciencia más útil es aquella cuyo fruto es el más comunicable”***

**Leonardo Da Vinci**

BUSTOS, María Lucía. **Contribución al estudio de las parasitosis que afectan a los colúbridos en cautiverio: posible correlación con las propiedades de sus venenos.** 2019. 106 páginas. Disertación de maestría del Programa de Pos-Graduación en Biociencias – Universidad Federal de Integración Latinoamericana, Foz do Iguaçu, 2019.

## RESUMEN

Actualmente muchas especies de colúbridos son mantenidas en cautiverio para la extracción periódica de veneno y su posterior estudio; en estas condiciones, son frecuentes las enfermedades provocadas por el estrés, y la morbi-mortalidad suele ser elevada. A pesar de la diversidad de parásitos descritos en ofidios, lo cierto es que la información sobre parásitos afectando a colúbridos aún es escasa. Así, este trabajo tuvo la intención de determinar la frecuencia y diversidad de parásitos afectando a colúbridos mantenidos en dos serpentarios de Argentina. Para tal fin se evaluaron, mediante examen clínico y análisis coproparasitológico seriado, 30 especímenes en total durante los primeros 90 días de cautiverio de cada uno de ellos, obteniéndose un 83% de animales positivos a parasitosis (considerando endoparásitos y ectoparásitos). Algunos parásitos fueron identificados a nivel de especie mediante su observación con microscopio óptico y/o microscopio electrónico de barrido. En los casos en los que se produjo la muerte de los ejemplares se realizó necropsia y análisis histopatológico de muestras de tejidos para determinar su causa y observar las lesiones a nivel sistémico posiblemente derivadas de la acción parasitaria. Además, se investigó la afectación estructural de la Glándula de Duvernoy causada por rabdítidos, y la posible consecuencia en su producto de secreción (veneno). En conjunto, este trabajo aporta información relevante en cuanto a la prevalencia y diversidad de parásitos que afectan a colúbridos de la región nordeste de Argentina, así como también a las posibles consecuencias que estas infestaciones pueden tener sobre su estado sanitario en general, y en particular, sobre la estructura/función de su aparato venenoso.

**Palabras clave:** Colúbridos. Parasitofauna. Ofidios. Cautiverio. Veneno.

**BUSTOS, María Lucía. Contribution to the study of the parasitosis that affect colubrid snakes in captivity: possible correlation with their venom properties.** 2019. 106 pages. Master's thesis of the Graduate Program in Biosciences - Federal University of Latin American Integration Foz do Iguaçu, 2019.

### **ABSTRACT**

Nowadays, many species of colubrid snakes are kept in captivity in order to be submitted periodically to venom extraction procedures and later studies; in these conditions, pathological events associated with stress are very common, and morbidity and mortality are often high in frequency. Despite the diversity of parasites described in ophidians, there are few reports about the parasite fauna in colubrids. This study addresses the frequency and diversity of parasites found in this group of snakes admitted to captivity in two serpentariums from Argentina. A total of 30 colubrid specimens were analyzed – by clinical examination and serial coproparasitological surveys - during their first 90 days of being in captivity. Twenty-five specimens (83%) were found to be positive for the presence of parasites (endoparasites and ectoparasites). Some parasites were identified to species level through optical and scanning electron microscopy observation. In cases of death, specimens were necropsied and histopathological exams were performed to determine its cause(s). In addition, we revealed some systemic lesions induced by endoparasites in colubrids, showing for the first time rhabditid-induced lesions in the Duvernoy's gland, as well as possible alterations caused by this taxon on venom features. Thus, this study contributes with useful information about the prevalence and diversity of parasites that affect colubrids from northeastern Argentina, and the consequences of these infestations on their health status and the structure/function of their venom system.

**Key words:** Colubrid snakes. Parasite fauna. Ophidia. Captivity. Venom.

## LISTA DE ILUSTRACIONES

<b>Figura 1</b> – Taxonomía de las serpientes.....	16
<b>Figura 2</b> – Principales tipos de dentición en ofidios.....	19
<b>Figura 3</b> – Biodiversidad parasitaria por especie de colúbrido.....	54
<b>Figura 4</b> – SDS-PAGE, gel 15 %, de venenos (2 µg) de especímenes de Lam infectado con rabdítidos y control.....	78
<b>Figura 5</b> – Tricina-SDS-PAGE de venenos (2 µg) de espécimen de Lam infectado con rabdítidos y control.....	79
<b>Figura 6</b> – SDS-PAGE, gel 12 %, de venenos (2 µg) de espécimen de Poo infectado con rabdítidos (pre- y post-tratamiento) y control. ....	80
<b>Figura 7</b> – SDS-PAGE, gel 12%, de venenos (2 µg) de espécimen de Pp infectado con rabdítidos y control.....	81
<b>Figura 8</b> – Curva de actividad enzimática en función de la cantidad de veneno de Poo. ....	82
<b>Figura 9</b> – Curva de actividad enzimática en función de la cantidad de veneno de Pp. ....	82

## LISTA DE FOTOGRAFÍAS

<b>Fotografía 1</b> – Serpientes mantenidas en cautiverio en la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE, Corrientes y en el Instituto Nacional de Medicina Tropical, Puerto Iguazú.....	29
<b>Fotografía 2</b> – Localización del corazón utilizando la medida LHC y registro de la medida.....	31
<b>Fotografía 3</b> – Técnicas de sexado por eversión de hemipenes y con catéter de punta roma.....	33
<b>Fotografía 4</b> – Técnica de enriquecimiento por flotación con solución azucarada de Sheater.....	37
<b>Fotografía 5</b> – Técnica de sedimentación común utilizando Solución de Dennis, Stone & Swanson.....	37
<b>Fotografía 6</b> - Técnica de sedimentación por centrifugación, técnica de Richie o técnica del formol-éter .....	38
<b>Fotografía 7</b> - Extracción de veneno en un ejemplar de <i>Leptophis ahaetulla marginatus</i> .....	41
<b>Fotografía 8</b> - Observación e identificación de ectoparásitos (garrapatas) .....	44
<b>Fotografía 9</b> - Observación macroscópica de nematodos adultos del ejemplar 003 ( <i>Leptophis ahaetulla marginatus</i> ).....	45
<b>Fotografía 10</b> - Fotomicrografía por microscopía óptica de nematodos de <i>Leptophis ahaetulla marginatus</i> (003) .....	46
<b>Fotografía 11</b> - Fotomicrografía por microscopía electrónica de barrido de nematodos de <i>Leptophis ahaetulla marginatus</i> (003) .....	47
<b>Fotografía 12</b> - Fotomicrografía por microscopía electrónica de barrido de trematodos de <i>Leptophis ahaetulla marginatus</i> (007).....	48
<b>Fotografía 13</b> – Fotomicrografías de huevos y ooquistes de endoparásitos hallados en los exámenes coproparasitológicos.....	51
<b>Fotografía 14</b> – Alteraciones macroscópicas y microscópicas encontradas en espécimen de <i>Xenodon merremii</i> (Xm 2-16).....	61
<b>Fotografía 15</b> - Alteraciones macroscópicas y microscópicas encontradas en espécimen de <i>Philodryas patagoniensis</i> (Pp 3-18). .....	63

<b>Fotografía 16</b> - Fotomicrografía por microscopía electrónica de barrido de pentastómidos de <i>Philodryas patagoniensis</i> (Pp 3-18). .....	64
<b>Fotografía 17</b> - Alteraciones macroscópicas y microscópicas encontradas en espécimen de <i>Philodryas patagoniensis</i> (Pp 4-18). .....	66
<b>Fotografía 18</b> - Fotomicrografía por microscopía electrónica de barrido de pentastómidos de <i>Philodryas patagoniensis</i> (Pp 4-18). .....	67
<b>Fotografía 19</b> - Alteraciones macroscópicas y microscópicas encontradas en espécimen de <i>Leptophis ahaetulla marginatus</i> (LAM 4-17).....	69
<b>Fotografía 20</b> - Alteraciones macroscópicas encontradas en espécimen de <i>Erythrolamprus aesculapii</i> (014). .....	71
<b>Fotografía 21</b> - Alteraciones microscópicas encontradas en espécimen de <i>Erythrolamprus aesculapii</i> (014). .....	72
<b>Fotografía 22</b> – Fotomicrografía por microscopía electrónica de barrido de nematodos de <i>Erythrolamprus aesculapii</i> (014).....	74
<b>Fotografía 23</b> – Microfotografía de muestras de nematodos hembras de <i>Erythrolamprus aesculapii</i> (014).....	75
<b>Fotografía 24</b> – Fotomicrografía por microscopía electrónica de barrido de nematodos de <i>Erythrolamprus aesculapii</i> (014). .....	76
<b>Fotografía 25</b> – Observación de larvas y huevos de rabdítidos en el veneno de <i>P. olfersii aestivus</i> y <i>L. ahaetulla marginatus</i> .....	77

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> – Ectoparásitos y endoparásitos hallados, según especie de colúbrido.....	43
<b>Tabla 2</b> – Resultados de los análisis coproparasitológicos de cada espécimen del serpentario de la FCV - UNNE. ....	49
<b>Tabla 3</b> – Resultados de los análisis coproparasitológicos de cada espécimen del serpentario del INMeT. ....	50
<b>Tabla 4</b> – Prevalencia de endoparásitos por especie de colúbrido... ..	52
<b>Tabla 5</b> – Biodiversidad parasitaria en relación con la especie de colúbrido. ....	53
<b>Tabla 6</b> – Tratamientos realizados y evolución de los especímenes mantenidos en el serpentario de la FCV – UNNE.....	55
<b>Tabla 7</b> – Tratamientos realizados y evolución de los especímenes mantenidos en el serpentario del INMeT.....	56
<b>Tabla 8</b> – Evolución de ejemplares que no recibieron tratamiento de acuerdo al análisis coproparasitológico... ..	58
<b>Tabla 9</b> – Hallazgos macroscópicos y microscópicos de Xm 2-16.....	60
<b>Tabla 10</b> – Hallazgos macroscópicos y microscópicos de Pp 3-18.....	62
<b>Tabla 11</b> – Hallazgos macroscópicos y microscópicos de Pp 4-18.....	65
<b>Tabla 12</b> – Hallazgos macroscópicos y microscópicos de LAM 4-17.....	68
<b>Tabla 13</b> – Hallazgos macroscópicos y microscópicos de 014.. ..	70

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

mg/kg: miligramos por kilo de peso corporal.

PO: administración por vía oral.

IM: administración por vía intramuscular.

rpm: revoluciones por minuto.

## SUMARIO

<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>16</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
<b>2.1 General.....</b>	<b>29</b>
<b>2.2 Específicos.....</b>	<b>29</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
<b>5 DISCUSIÓN.....</b>	<b>86</b>
<b>6 CONSIDERACIONES FINALES.....</b>	<b>94</b>
<b>7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>96</b>

## 1 INTRODUCCIÓN

### 1.1 Referencial teórico

#### 1.1 Conociendo a los ofidios

La taxonomía de las serpientes y las familias de serpientes presentes en Sudamérica se encuentran esquematizadas en la Figura 1.

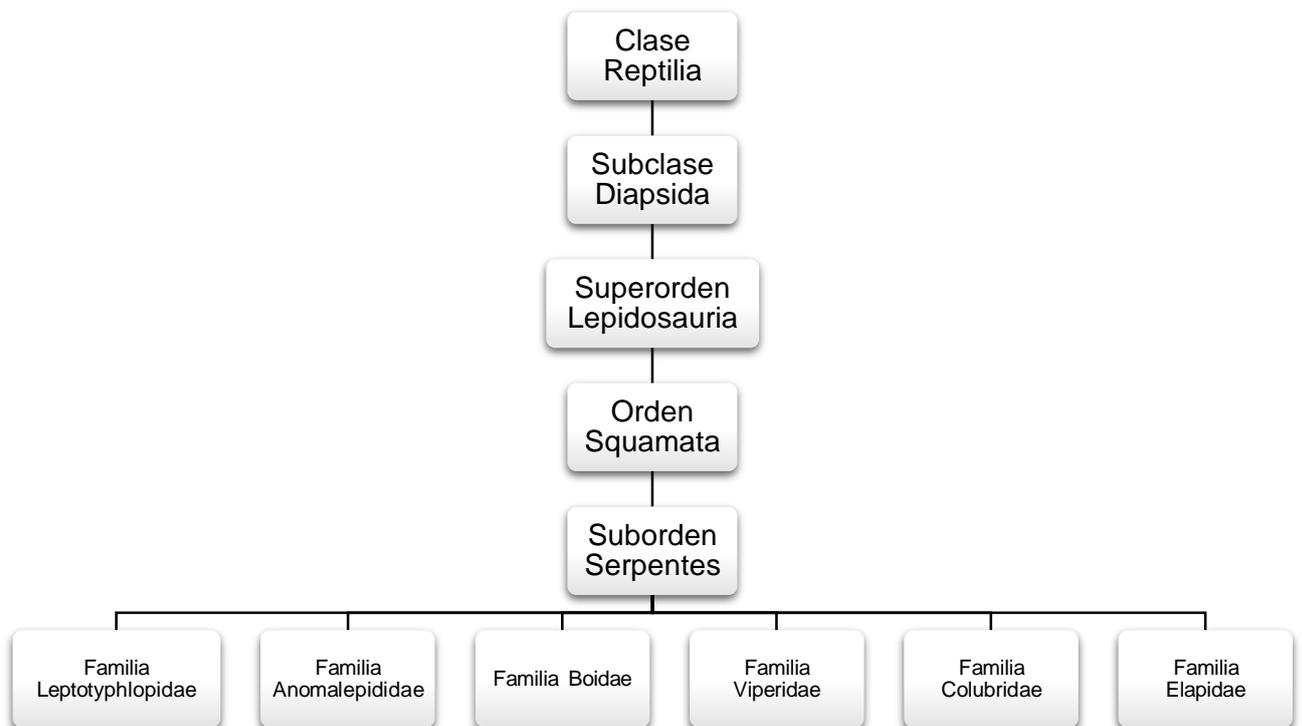


Figura 1. Taxonomía de las serpientes (Carreira, 2005).

Con más de 1580 especies de serpientes, Sudamérica abarca más del 46% de la riqueza mundial, siendo el segundo continente con mayor abundancia de serpientes en el mundo, después de Asia (Giraudo, 2014). En Brasil están presentes representantes de nueve familias, 75 géneros y 321 especies (Cardoso *et al*, 2009). En el Nordeste Argentino habita la mayor diversidad de serpientes dentro de la Argentina, totalizando 109 especies y subespecies, un 80% de la riqueza total del país, y contiene la mayor riqueza y abundancia de serpientes de la Argentina. Si observamos la riqueza por provincias en el nordeste argentino, la mayor diversidad de especies corresponde a Misiones (77 especies y subespecies) y en segundo lugar Corrientes (70 especies y subespecies) (Giraudo, 2014).

Serpentes y reptilis significan “el que se arrastra”; estos animales evolucionaron a partir de un grupo de lagartos (saurios) y se caracterizan por la ausencia total de extremidades. Como también carecen de orificio auditivo, los ofidios no pueden escuchar sonidos que se desplazan en el aire, aunque sí perciben vibraciones del suelo, ya que un hueso del oído medio (*columela auris*) está conectado con la articulación mandibular. La sínfisis mandibular no se encuentra fusionada, y la mandíbula articula en forma laxa con el cráneo, por lo que pueden separarla de éste y realizar una gran apertura bucal, facilitando la ingestión de las presas. Algunas serpientes como las boas, pitones, cascabeles y yararás poseen órganos termorreceptores, ubicados en las escamas labiales en los dos primeros casos (Boidae), o representados por un orificio entre el ojo y las narinas, llamado foseta loreal, en las yararás y cascabeles (Viperidae) (Giraud, 2014). Los ofidios carecen de párpados. El sentido del olfato está bien desarrollado, la lengua capta las partículas aromáticas u odoríferas del ambiente y luego las conduce al órgano de Jacobson, un órgano sensitivo particular en el paladar que tiene función olfativa y gustativa a la vez (Melgarejo-Giménez, 2006).

Una característica distintiva de los reptiles es su piel seca, cubierta por escamas y casi desprovista de glándulas; esta particularidad los protege de la desecación, pero al mismo tiempo la piel es relativamente impermeable al agua y gases, por lo que la respiración es solo pulmonar. La muda o ecdisis de la piel (particularmente de la epidermis) en las serpientes se produce en una sola pieza, a diferencia de otros reptiles donde la piel se desprende en fragmentos (Brotons & Martínez-Silvestre, 2001). Es un proceso regulado por la glándula tiroidea que ocurre a intervalos regulares y depende de factores como la especie, edad, estado nutricional, presencia de parásitos, desequilibrios hormonales, infecciones, temperatura ambiental y humedad (Flores-Villela, 2007). Los ofidios son ectotermos como los anfibios, requiriendo de fuentes externas (principalmente la radiación solar) para obtener su temperatura corporal preferida (25° C), la cual se encuentra dentro de su zona de temperatura óptima preferida (23 a 30° C, Varela, 2002).

Los ofidios en general se alimentan de animales vivos, huevos, carroña y excepcionalmente pueden poseer una alimentación mixta (compuesta por animales y plantas) como es el caso de la culebra *Erpeton tentaculatum* (Bauchot, 1996). Para capturar su presa se valen de dos mecanismos: i) la constricción - usada por las boas, pitones y algunas culebras -, y ii) el aparato

venenoso. Este último reduce el riesgo de que la presa escape y/o cause lesiones al depredador (Mader, 2006).

De acuerdo a la morfología de su dentición, las serpientes se clasifican en aglifas, opistoglifas, proteroglifas y solenoglifas (Figura 2).

- Aglifas: (a: sin, glifo: ranura) no poseen dientes modificados para inyectar veneno, sí dientes macizos (serpientes ciegas, boas y varias culebras) (Giraud, 2014). Varios géneros de ofidios de la familia Colubridae que presentan este tipo de dentición poseen glándula de Duvernoy (Weinstein, *et al* 2011; Serapicos 2006).
- Opistoglifas: (opisto: atrás) estas serpientes se caracterizan por poseer un par de dientes alargados a cada lado, en la región posterior del maxilar superior, (con surcos incompletos) en los cuales desemboca una glándula salival modificada: la Glándula de Duvernoy. Ésta es una glándula encapsulada en tejido conectivo, compuesta por células serosas (exclusivamente o pueden tener células mucosas), organizada en lóbulos constituidos por túbulos secretores. Estos túbulos convergen hacia un lumen central uniéndose y formando un conducto excretor único, tapizado por células mucosas (Serapicos, 2006; Taub, 1967). La glándula de Duvernoy no presenta una capacidad significativa de almacenamiento de veneno y generalmente carece de una inserción directa de músculo estriado que les permita presurizar el fondo de la glándula, dificultando así el vaciado completo de ésta (Weinstein, *et al* 2011). Este tipo de dentición es observado en varios géneros de la familia Colubridae (Serapicos, 2006).
- Proteroglifas: (protero: adelante) Dentición en la que las presas o colmillos inoculadores están ubicadas en la región anterior y superior de la boca del animal. Estos dientes poseen un canal semicerrado para el paso del veneno y no son móviles. Cuando el colmillo penetra en los tejidos de la presa, la conexión con el conducto de la glándula se refuerza, generando así un sistema cerrado; esta característica sumada a la disposición de los músculos estriados mandibulares (que se insertan y actúan directamente sobre la glándula) permiten una secreción activa del

veneno. Además, a diferencia de las glándulas de Duvernoy, estas glándulas presentan una gran capacidad de almacenamiento del veneno. Los representantes de la familia Elapidae exhiben esta dentición (Giraudó 2014, Carreira 2005).

- Solenoglifas: (Solen: canal o tubo) Tienen dos grandes colmillos (a veces 4) en la parte anterior del maxilar, con un orificio interior completo para inocular veneno como una aguja hipodérmica. Los dientes en reposo permanecen paralelos al paladar, pero giran 90° en el momento de la mordida conectándose así con el ducto de descarga de la glándula venenosa. Este diseño permite que los colmillos sean mayores, y se logra así una inoculación más profunda del veneno. En estos ofidios el maxilar se redujo y perdieron los demás dientes. La glándula del veneno presenta las mismas características descritas para las serpientes de dentición proteroglifa. Los vipéridos (yarárás y cascabel) presentan este tipo de dentición (Giraudó, 2014).

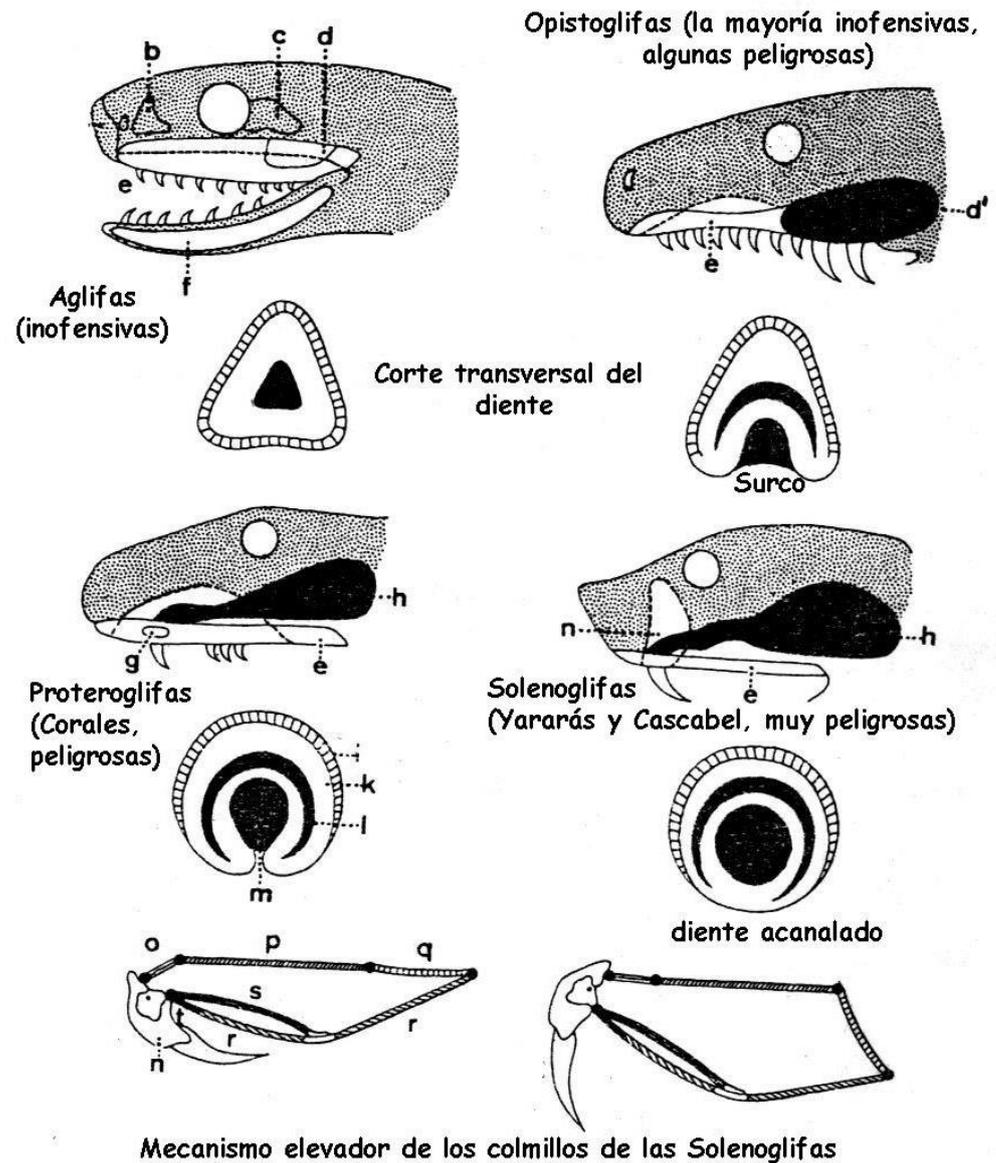


Figura 2: Principales tipos de dentición en ofidios: Aglifa, Opistoglifa, Proteroglifa, Solenoglifa. d: glándula de Duvernoy, e: glándula supralabial, h: glándula de veneno, i: esmalte, k: dentina, l: cavidad de la pulpa, m: canal del veneno, n: maxilar, o: prefrontal, p: frontal, parietal y escamoso, q: cuadrado, r: pterigoides, s: ectopterigoides. Fuente: Giraudo, 2014.

Las serpientes son parte de la cadena trófica de los ecosistemas y tienen un papel fundamental en la ecología y biodiversidad del medio ambiente como depredadores de pequeños mamíferos (principalmente roedores) y también como presas, al ser una importantísima fuente de alimentos para aves rapaces y mesomamíferos. Además, cumplen un rol sanitario ya que los roedores ocasionan enormes pérdidas a la agricultura y transmiten graves enfermedades al hombre

como leptospirosis o hantavirus, entre otras, cuyo impacto sanitario puede ser mayor al ofidismo (Giraudó y col., 2008).

## 1.2 Familia Colubridae

Esta familia abarca cerca del 65% de todas las especies de ofidios conocidas (Zaher *et al*, 2009), de distribución mundial, salvo en la Antártida, el Polo Norte, Madagascar y algunas islas oceánicas (Vitt & Caldwell, 2014). La mayor parte de los representantes de esta familia se encuentra distribuida en Centroamérica y Sudamérica, de México al extremo sur de América del Sur (Uetz, 2018 y Cadle & Greene, 1993). Su distribución en Sudamérica abarca casi toda la superficie, excepto parte de la región patagónica de Argentina y las regiones Aysén y Magallanes de Chile (Vitt & Caldwell, 2014). Ninguna especie presenta siquiera vestigios de miembros posteriores y todas retienen sólo el pulmón derecho y pulmón traqueal desarrollado. Consumen generalmente anfibios, lagartijas, peces, roedores y pequeñas aves, mientras que algunos ofidios más específicos basan su dieta en el consumo de caracoles y otros moluscos. En cuanto a los ambientes que pueden ocupar, hay especies acuáticas, arborícolas, arbóreo-acuáticas, fosoriales y planeadoras (Parker, 1977).

Esta familia Incluye especímenes con denticiones opistoglifas y aglifas. Varias especies opistoglifas secretan veneno muy activo, siendo tan peligrosas para los humanos como los ofidios de la familia Viperidae (Cej, 1993). Estudios recientes evidenciaron que en Sudamérica los accidentes ofídicos causados por colúbridos involucran principalmente a los géneros *Oxyrhopus*, *Thamnodynastes* y *Philodryas*, este último con diversas especies como *P. aestiva* (Puerto y França, 2009), *P. baroni* (Kuch & Jesberger. 1993), *P. patagoniensis* (Araújo & Santos, 1997) y *P. olfersii* (Araújo & Santos, 1997). También fueron reportados accidentes con colúbridos de los géneros *Apostolepis*, *Boiruna*, *Chironius*, *Clelia*, *Helicops*, *Hydrodinastes*, *Erythrolamprus*, *Xenodon* (Weinstein et al., 2011). Posiblemente la alta frecuencia de accidentes con el género *Helicops*, por ejemplo, se deba al encuentro con estos animales al realizarse actividades como la pesca, donde las extremidades inferiores pueden encontrarse desprotegidas. Y en el caso de algunos colúbridos que presentan patrones de coloración muy llamativos, el accidente ocurre al intentar manipularlas (Weinstein et al., 2011), como es el caso de *Erythrolamprus aesculapii* (Menegucci, 2019),

*Philodryas baroni* (Sánchez, 2014) y *Oxyrhopus guibei* (Souza, 2007), que son actualmente muy comunes en el comercio ilegal de mascotas.

### 1.3 Venenos de colúbridos

Relevamientos epidemiológicos a lo largo principalmente de las últimas décadas y el conocimiento científico reciente han aportado informaciones importantes sobre la capacidad de envenenamiento de las culebras, principalmente aquellas que son opistoglifas (Weinstein *et al.*, 2011, 2013). Si bien ha habido controversias sobre la función de la secreción de la glándula de Duvernoy, asignándose primariamente las funciones de lubricación, digestión y antiputrefacción de las presas e higiene de los dientes, se ha comprobado que cumple también una función en paralizar y matar a las presas, en varios casos con eficacia similar a la de los venenos de vipéridos y elápidos (Giraud, 2014; Solórzano, 2004). La secreción (veneno) de esta glándula posee, en algunas especies, una toxicidad suficiente como para producir daños locales severos y eventualmente también complicaciones sistémicas, ya que exhibe diversas actividades tóxicas, tales como proteolítica, hemorrágica, fibrinolítica, edematizante, necrotizante, entre otras (Peichoto, 2014). La acción proteolítica es particularmente significativa en el veneno de algunas especies opistoglifas, siendo la principal responsable de las manifestaciones locales y sistémicas del envenenamiento. Por ejemplo, en el caso del veneno de la culebra *Philodryas patagoniensis*, su actividad proteolítica – la cual está directamente relacionada con su capacidad para inducir fenómenos hemorrágicos tanto locales como sistémicos – supera ampliamente a la exhibida por el veneno de *Bothrops alternatus*, conocida popularmente como yarará grande (Acosta *et al.*, 2003; Peichoto *et al.*, 2005; Peichoto *et al.*, 2006).

En Brasil, *Philodryas olfersii* es la principal especie responsable de los accidentes causados por colúbridos (Correia *et al.*, 2010), algunos de considerable gravedad, habiéndose reportado incluso un caso de muerte (Salomão & Di Bernardo, 1995). El veneno de este ofidio presenta particularmente una alta actividad hemorrágica, fibrinolítica, edematizante (Rocha & Furtado, 2007; Peichoto *et al.*, 2007a) y dermonecrótica (Rocha & Furtado, 2007), y son principalmente enzimas proteolíticas las responsables de estos efectos.

#### 1.4 Eventos patológicos que afectan a ofidios en cautiverio

En condiciones de cautiverio se debe priorizar el bienestar animal, y así las serpientes deben ser mantenidas bajo condiciones controladas de alimentación, luz, temperatura, humedad y espacio físico; llevándose a cabo la limpieza y desinfección del recinto de forma periódica, además de monitoreos sanitarios sistemáticos (Serapicos, 2002; Rodríguez & Varela, 2014). Sin embargo, a pesar de todo el empeño y esfuerzo que se coloque para lograr la mayor sobrevivencia de los individuos en cautiverio, se sabe que la morbi-mortalidad de los ofidios suele ser elevada. La ausencia de gradientes de temperatura, la dificultad de realizar baños de sol periódicamente y el manejo constante expone a las serpientes a estrés crónico (Braz et al., 2012). Las alteraciones en la humedad relativa del ambiente pueden provocar deshidratación y disecdisis (baja humedad) o proliferación de hongos y bacterias (en casos donde la humedad sea muy alta) (Mader, 2006). Las variaciones de temperatura también son un factor importante de estrés, ya que las temperaturas muy bajas dificultan la actividad normal de las enzimas gástricas, pancreáticas y hepáticas, conduciendo a alteraciones en el apetito, en la digestión y asimilación de la dieta (Frye, 1991); y las temperaturas muy elevadas producen inapetencia y también alteraciones en la reproducción (Santos, 2006). La regulación del fotoperiodo de manera inapropiada puede llevar a que los ofidios recusen alimentarse, a una vitelogénesis anormal, además de hacer a las serpientes más susceptibles al estrés, debido a alteraciones en la respuesta inflamatoria y en la producción de anticuerpos (Mitchell, 2004). Otro factor a considerar es el manejo de los animales por el personal, el cual puede influir en la propagación de algunas infecciones/infestaciones al no realizar correctamente la desinfección o antisepsia de las superficies, de los implementos utilizados para manipular a los animales, o de los recintos donde se los mantiene en cautiverio (Atanaskova, 2011).

La causa más común de muerte de ofidios en cautiverio se relaciona con su dificultad para adaptarse a su entorno, lo que se denomina "síndrome de maladaptación" (Mader, 2006), el cual es definido como los efectos patológicos del estrés en un animal mantenido en cautividad. Los agentes estresores pueden ser clasificados como somáticos (sonidos, olores, presión atmosférica, frío y efectos de agentes químicos), psicológicos (ansiedad, miedo), comportamentales (superpoblación, disputas jerárquicas, falta de contacto con animales de su misma especie, cambios en el ritmo biológico) o variados

(malnutrición, parasitosis, infecciones, cirugías, inmovilización, restricción química o física y confinamiento) (Fowler, 2012). Los ofidios que lo padecen presentan anorexia, emaciación (aunque estén correctamente alimentados), fragilidad de tejidos, excesiva carga parasitaria, úlceras intestinales, crecimiento reducido, fallas reproductivas y susceptibilidad incrementada a diversas infecciones (inclusive con organismos que normalmente son inocuos).

Cabe mencionar que en algunos procesos infecciosos, como por ejemplo la estomatitis ulcerativa, producida por una combinación de un mal manejo y agentes infecciosos (*Salmonella* spp, *Citrobacter freundii*, etc), se pueden generar placas purulentas o abscesos infraorbitarios o submandibulares que pueden llegar a comprimir las glándulas del veneno, alterando mecánicamente la producción y exteriorización de éste (Carriquiriborde, 2010). Similar situación se da con la infección por bacterias del género *Mycobacterium*, que ocasionan lesiones granulomatosas localizadas en el tejido celular subcutáneo y en la cavidad oral de los reptiles, las cuales pueden adquirir dimensiones considerables; o en la Enfermedad Fúngica de las Serpientes (EFS) cuyo agente causal es *Ophidiomyces ophiodiicola*, productor de una inflamación granulomatosa severa, llegando a causar deformaciones faciales y una gran compresión de la glándula (Mader, 2014). Algunos de estos agentes infecciosos pueden ingresar por el canal de los dientes opistoglifos y llegar, mediante el conducto, a la glándula de Duvernoy, lo cual puede alterar su producción o las características de los componentes del veneno. Como agente vírico, el Herpesvirus produce degeneración y necrosis del epitelio columnar glandular, e infiltración inflamatoria de la submucosa; estas lesiones están asociadas a una disminución en la producción de veneno (Jacobson, 2007).

Las parasitosis en animales silvestres mantenidos en condiciones de cautiverio se encuentran asociadas a una diversidad de factores que los tornan más susceptibles a varias enfermedades infecciosas, entre ellas las producidas por parásitos, que en vida libre generalmente no representan mayor riesgo, pero en cautiverio pueden producir lesiones graves y en algunos casos la muerte de los animales (Atanaskova, 2011). Las parasitosis pueden afectar la supervivencia del huésped y a su reproducción en forma directa a través de sus efectos patológicos (pérdidas sanguíneas, daño tisular, disminución de la tasa reproductiva, malformaciones congénitas) o indirectamente (provocando una inmunodepresión en el huésped y afectando su capacidad de supervivencia) (Thawait, 2014). Los

parásitos tienen una estrecha relación natural con el modo y el tipo de alimentación del hospedador ya que si deben ingresar al sistema digestivo lo harán directamente a través del alimento ingerido, el cual puede a su vez ser un huésped intermediario en su ciclo evolutivo (Quiroz, 2005). Además, la susceptibilidad a la parasitosis también está relacionada a enfermedades concomitantes, disponibilidad de huéspedes intermediarios, estado nutricional y edad del huésped (McFarlen, 1991). El análisis de muestras fecales constituye en la actualidad una de las herramientas más utilizadas en el seguimiento higiénico-sanitario de poblaciones silvestres y cautivas en todo el mundo (Roca, 2012). En el caso de los reptiles, las heces muestran ciertas diferencias comparadas con las del resto de animales, como la cantidad de heces que puede ser obtenida, que en reptiles es muy pequeña para los análisis de laboratorio y en su composición se puede encontrar uratos, restos de alimentos y tierra que dificultan el diagnóstico rápido y efectivo; por estas razones los procedimientos y actividades presentan ventajas y limitaciones específicas (Thawait, 2014; Wolf, 2014).

A pesar de la diversidad de parásitos descritos en ofidios, en la literatura son escasos (y en algunos casos se encuentran desactualizados) los estudios sobre las parasitosis que afectan a colúbridos mantenidos en cautiverio en Sudamérica. Silva (1999, 2005, 2007) describió endoparasitosis por trematodos de los géneros *Ochetosoma* (en un ofidio del género *Chironius*) y *Haplometroides* (en una serpiente del género *Phalotris*) luego de necropsias realizadas en dichos colúbridos, mantenidos en cautiverio en el sur de Brasil. Lenis (2009) realizó el hallazgo de trematodos del género *Ochetosoma* en necropsias de varios especímenes de colúbridos de los géneros *Leptophis*, *Chironius* y *Leptodeira*, mantenidos en cautiverio en Colombia. Artigas (1988) realizó el hallazgo de trematodos del género *Zeferinella* en necropsia realizada en un ejemplar de *Erythrolamprus* mantenido en cautiverio en São Paulo, Brasil. Con respecto a los nematodos, Vicente *et al* (1993) informaron el hallazgo en Brasil de *Rhabdias* en colúbridos del género *Liophis*, *Philodryas* y *Oxyrhopus*, *Strongyloides* en *Mastigodryas*, y nematodos diaphanocephalídeos del género *Kalicephalus* en colúbridos de los géneros *Xenodon*, *Clelia*, *Erythrolamprus* y *Leptophis*, todos diagnosticados en necropsias realizadas en dichos ofidios mantenidos en cautiverio. Barrella *et al* (2009) describieron nematodos del género *Rhabdias* observados al realizar la necropsia de un colúbrido del género *Spilotes*, en Brasil; y Peichoto *et al* (2016) efectuaron el hallazgo de nematodos del género *Hexametra*

en la necropsia llevada a cabo en un ejemplar de *Oxyrhopus*, mantenido en cautiverio en Misiones, Argentina. En un trabajo publicado por Lainson *et al* (1991) se reportaron coccidios del género *Caryospora* en colúbridos mantenidos en cautiverio de los géneros *Spilotes* y *Oxyrhopus*, en el norte de Brasil. Regner *et al* (2015) hallaron una baja incidencia de coccidios (géneros *Eimeria* e *Isospora*) en colúbridos de los géneros *Pantherophis* y *Lampropeltis* mantenidos en cautiverio en Buenos Aires, Argentina. En cuanto a ectoparásitos, Nascimento *et al* (2017) observaron garrapatas del género *Amblyomma* en dos colúbridos del género *Xenodon*, mantenidos en cautiverio en un zoológico en el norte de Brasil. A pesar del aparente gran número de parásitos descritos, lo cierto es que la información aún es escasa si se considera que existen más de 1.000 especies de colúbridos en el continente sudamericano (Junqueira-de-Azevedo *et al*, 2016, Zaher *et al*, 2009) y que cada especie es susceptible a determinados parásitos.

**Justificativa**

El grupo de trabajo en el que se encuentra insertada esta tesina posee una amplia experiencia en el estudio de los venenos de colúbridos, que es un área que aún se encuentra en desarrollo a nivel mundial. Para conseguir analizar y estudiar estos venenos en profundidad, especímenes de este grupo de ofidios son mantenidos en cautiverio, donde ocurre una adaptación del animal a las nuevas condiciones ambientales, pudiendo desarrollar enfermedades derivadas de las prácticas de manejo inadecuadas, del estrés o de una combinación de ambos. Así, aprovechando los recursos disponibles en el grupo de trabajo, este estudio viene a contribuir con el conocimiento de las parasitosis que afectan a colúbridos mantenidos en cautiverio. Asimismo, considerando que algunas enfermedades no solo agravan el estado general del espécimen, sino también pueden alterar la cantidad y/o calidad del veneno producido, se intentará establecer una posible correlación entre parasitosis afectando a colúbridos y las propiedades de sus venenos.

**Pregunta Norteadora e Hipótesis**

A pesar de que es rica la biodiversidad parasitaria de colúbridos mantenidos en cautiverio que influyen en su estado sanitario, sólo alguna(s) parasitosis pueden incidir sobre algunas características de sus venenos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 General**

- Analizar la frecuencia y biodiversidad parasitaria de colúbridos mantenidos en cautiverio.
- Evaluar la existencia de una posible influencia de las endoparasitosis sobre las propiedades cualitativas y/o cuantitativas del veneno.

### **2.2 Específicos**

- Determinar la frecuencia y biodiversidad de parasitosis en colúbridos mantenidos en cautiverio.
- Investigar la participación de las parasitosis en los casos en que, eventualmente, se produjera la muerte de un espécimen.
- En caso(s) que sea(n) posible(s), establecer una correlación entre parasitosis y características exhibidas por el veneno del espécimen en cuestión.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

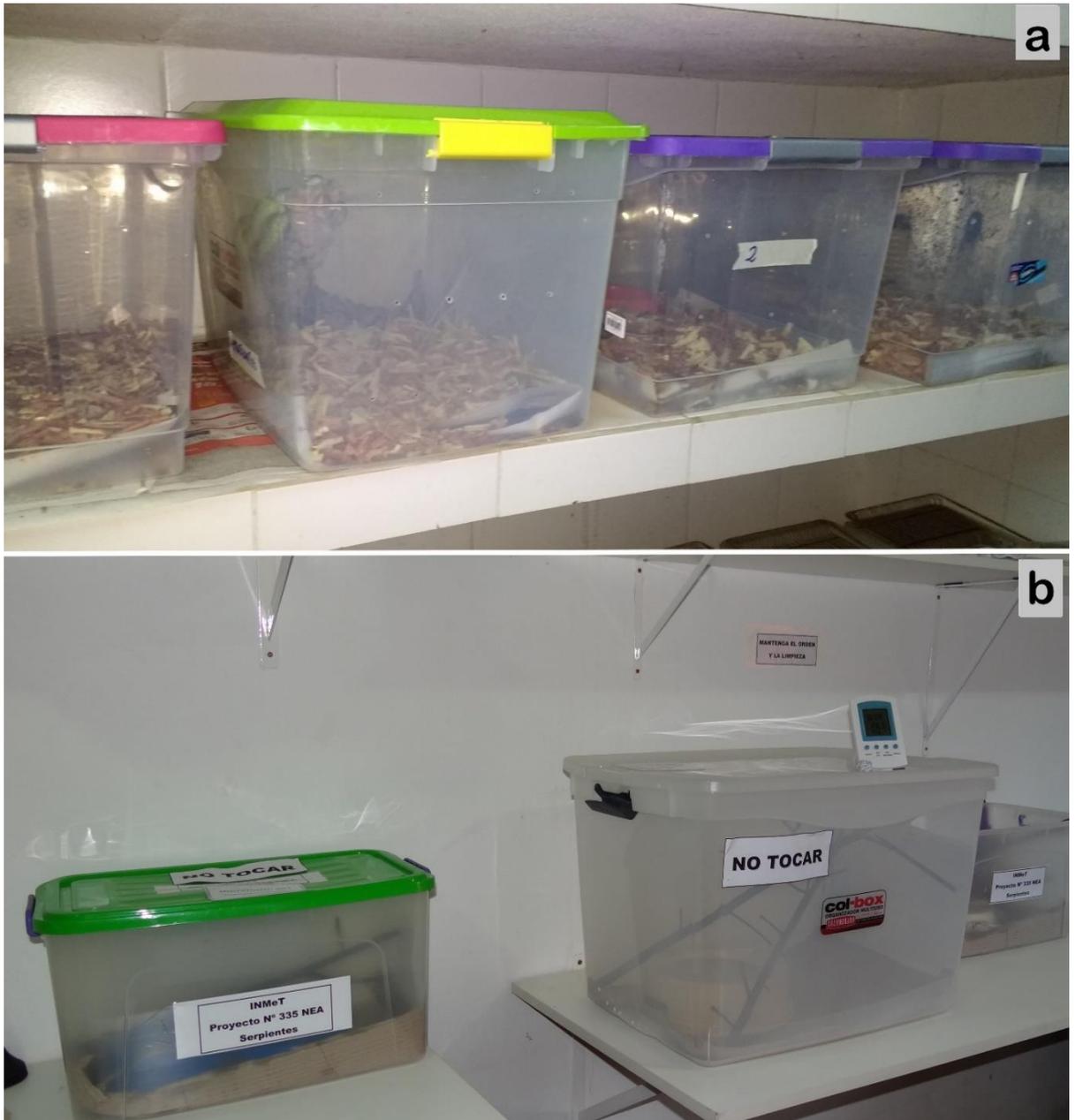
**3.1** Se trata de un estudio descriptivo, donde se incluyeron individuos adultos y activos de especies de colúbridos que fueron admitidos al serpentario de las siguientes instituciones:

- Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV) de la Universidad Nacional del Nordeste – (UNNE) en Corrientes, Argentina. Los especímenes de este grupo provienen de actividades de rescate solicitados por la comunidad de diversas áreas de la provincia de Corrientes, forman parte del plantel de especímenes del Centro Interactivo de Serpientes Venenosas de Argentina (CISVA) en el marco del Programa de Extensión “Universidad en el medio” (Resolución N° 109/18) y proyectos de investigación llevados a cabo por la cátedra de Farmacología y Toxicología y subsidiados por la Secretaría General de Ciencia y Técnica y por la Secretaría de Extensión Universitaria. Los colúbridos mantenidos en cautiverio son destinados al uso exclusivo en investigación científica (desarrollo de tesinas, doctorados, maestrías) y en actividades de extensión.

- Instituto Nacional de Medicina Tropical (INMeT) en Puerto Iguazú, Misiones, Argentina. Los especímenes de este grupo fueron capturados en el Parque Nacional Iguazú (Argentina), según permiso de investigación NEA 335 de la Administración de Parques Nacionales, y mantenidos luego en cautiverio para la extracción periódica de sus venenos (objeto de estudio en diversos proyectos de investigación).

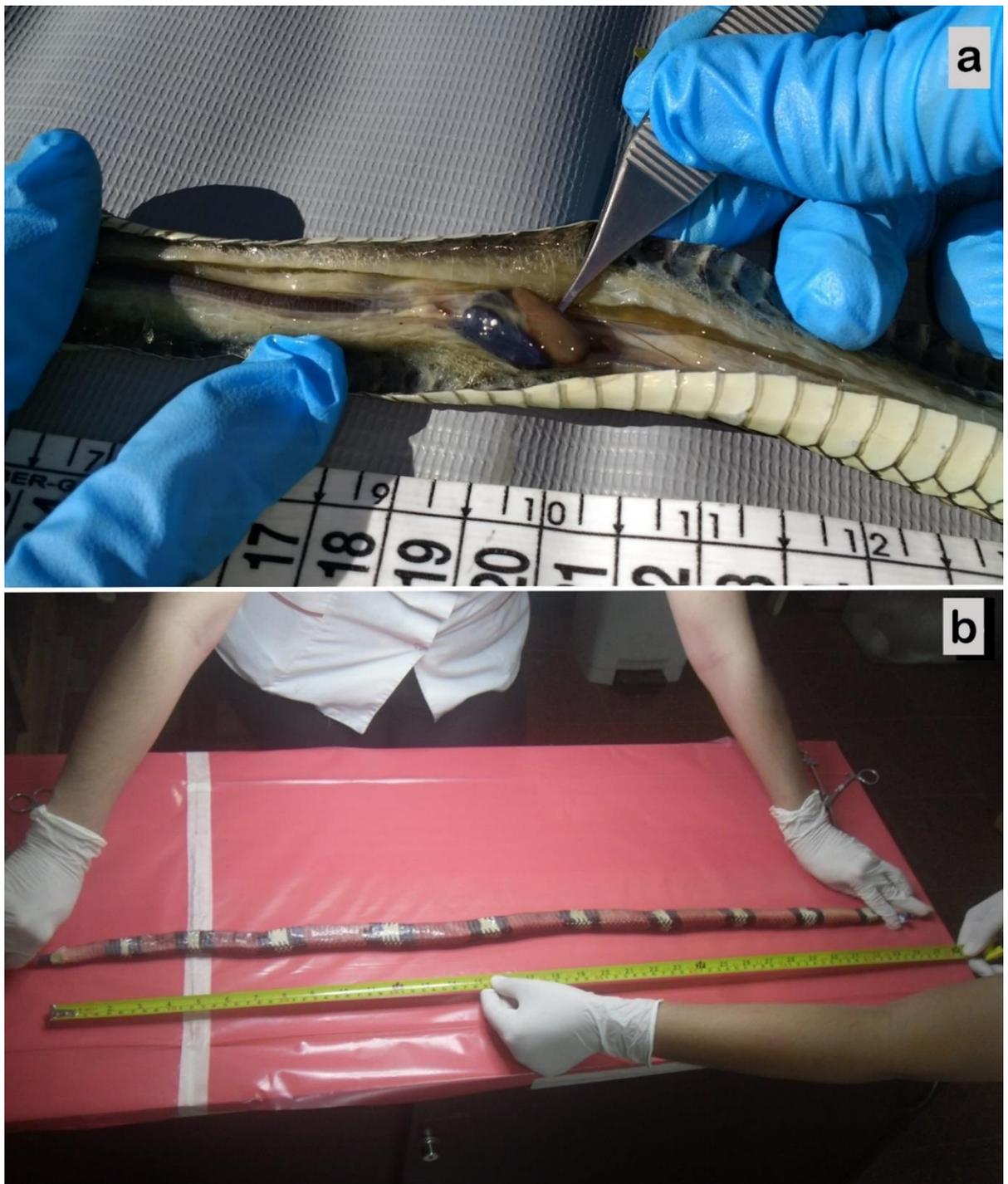
Ambos grupos de ofidios fueron mantenidos en un régimen de tipo intensivo, siguiendo el protocolo de manutención descrito por Braz *et al.* (2012) (Fotografía 1). Todos los especímenes fueron sometidos a un baño con yodopovidona al 1% (Mader, 2006, Varela, 2002) al ser admitidos en el serpentario. Los animales fueron alimentados mensualmente con ratones (*Mus musculus*) con un peso correspondiente al 10% del peso vivo del animal (aproximadamente) en el serpentario de la UNNE, y con una mezcla semilíquida de pescado y huevos (en una cuantía en mililitros también de

aproximadamente el 10% del peso vivo del animal) administrados a través de una sonda gástrica, en el caso del INMeT. El proyecto fue presentado y aprobado por el Comité de Ética y Bioseguridad (CEB) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Nordeste (FCV-UNNE) el 3 de agosto de 2018 (Protocolo N° 0078).



Fotografía 1. Serpientes mantenidas en cautiverio en recintos individuales de plástico en: a) Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE, Corrientes; b) Instituto Nacional de Medicina Tropical, Puerto Iguazú. Imágenes del autor.

**3.2 Examen clínico:** La evaluación clínica periódica se realizó de acuerdo con la metodología establecida por Varela (2002), considerando los métodos de contención, la historia clínica de los animales, la reseña (especie, sexo, edad, peso y tamaño), anamnesis (datos sobre la procedencia del animal) y examen físico completo. La identificación de las especies de colúbridos fue basada en las claves taxonómicas de Giraud (2004). La determinación del estado de desarrollo biológico se realizó mediante la inspección. También fue registrada la medida longitud hocico - cloaca (LHC) para cada ejemplar, utilizando análisis morfométricos. Esta técnica consiste en realizar una medida por la parte ventral del animal desde la parte más craneal de la boca hasta la cloaca y la medida en centímetros es expresada como porcentaje 100; así los órganos internos se localizan a un determinado porcentaje: corazón, 22 - 35%; pulmones, 25 - 60%; sacos aéreos, 45 - 85%; hígado, 35 - 60%; estómago, 45 - 65%; bazo, páncreas y vesícula biliar, 60 - 70%; intestino delgado, 65 - 80%; riñones, 65 - 90%; colon, 80 - 100% (Fotografía 2).

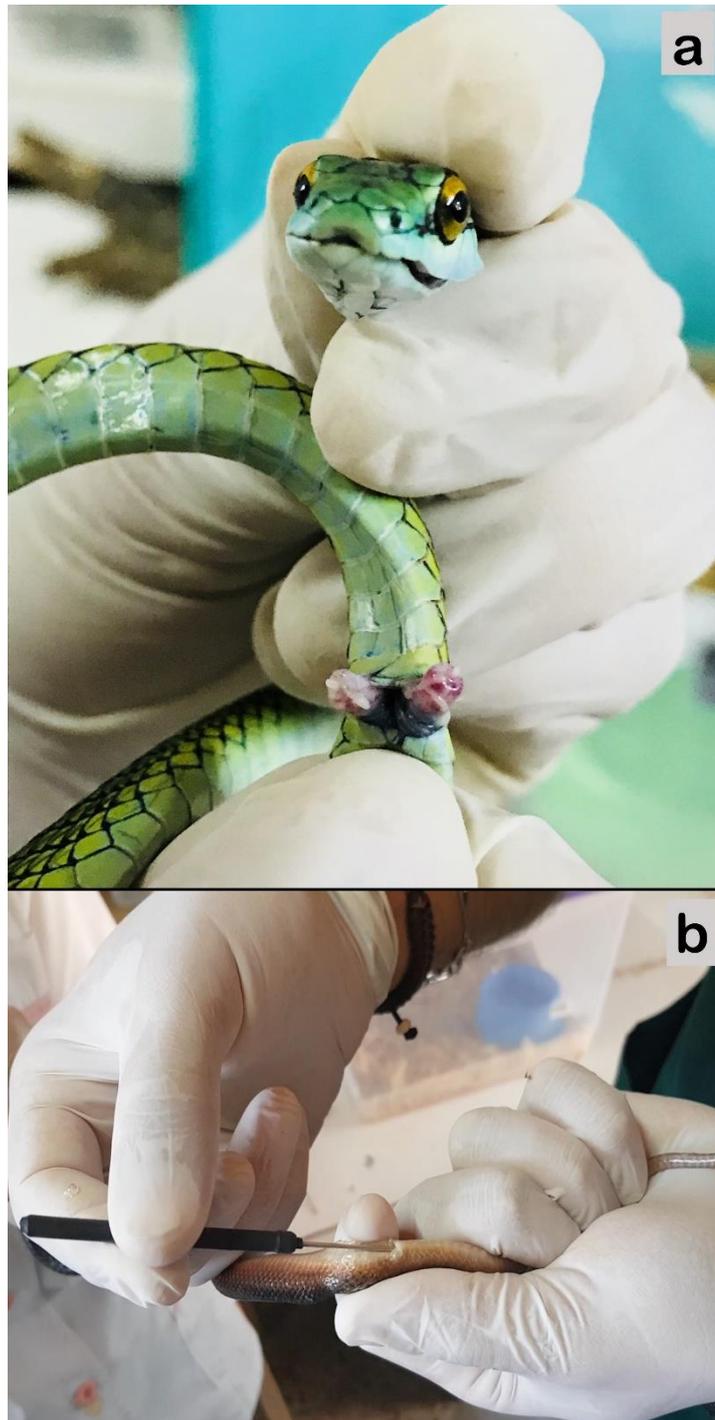


Fotografía 2. a) Localización del corazón a 25% de la LHC. b) Registro de la medida LHC en un ejemplar de *Erythrolamprus aesculapii*. Imágenes del autor.

**3.2.1** Técnicas especiales: palpación, auscultación, percusión, restricción, transiluminación, examen de la cavidad bucal, comprobación del tono muscular, inspección oftalmológica.

Técnica para la determinación del sexo en reptiles: Las serpientes no presentan un dimorfismo sexual evidente; algunos caracteres sexuales secundarios pueden ser orientativos (como el mayor número de escamas ventrales y

subcaudales en los machos, y la cola más larga, ya que allí se alojan los hemipenes). En este trabajo se utilizaron dos técnicas de sexado tal como propuesto por Divers (1996). En especímenes pequeños se utilizó la técnica de eversión de los hemipenes, realizando presión cuidadosa en la base de la cola, o inyectando solución salina; y en ofidios de mayor tamaño se utilizó la técnica de sexado por medio de una sonda o catéter de punta roma, que ingresa en la cloaca, y de acuerdo a cuántas escamas subcaudales abarca el ejemplar es macho (si abarca de 5-15 escamas) o hembra (si no abarca más de 1-3 escamas) (Fotografía 3).



Fotografía 3. a) Técnica de eversión de hemipenes en un ejemplar de *Leptophis ahaetulla marginatus*. b) Técnica de sexado con catéter de punta roma en un ejemplar de *Mussurana bicolor*. Imágenes del autor.

**3.3 Examen parasitológico:** Se utilizaron las siguientes técnicas:

**3.3.1 Observación macroscópica de ectoparásitos:** se procedió a la realización de una inspección minuciosa de todo el cuerpo del animal con

ayuda de la palpación, ya que la mayoría de los ectoparásitos se localizan entre las escamas. Luego se extrajeron los ectoparásitos con una pinza (realizando suave tracción en sentido caudal para permitir la liberación de sus piezas bucales) y fueron observados con la ayuda de una lupa estereoscópica para clasificarlos de acuerdo a sus características morfológicas, utilizando claves taxonómicas.

**3.3.2 Observación macroscópica de estadios adultos de parásitos en materia fecal:** se llevó a cabo la observación de la coloración de la cutícula y características morfológicas, así como también mediciones que pueden auxiliar en la identificación (Cordero del Campillo, 2001).

**3.3.3 Examen microscópico:**

**3.3.3.1 De parásitos adultos recuperados en materia fecal:** los parásitos adultos fueron lavados con solución fisiológica y luego observados al microscopio óptico, a fin de identificar estructuras características que ayuden a su clasificación taxonómica.

Algunos parásitos adultos fueron también observados con Microscopio Electrónico de Barrido (MEB). Para tal fin, los parásitos colectados fueron fijados en formol tamponado al 10% y luego deshidratados con alcohol y acetona, para posteriormente ser secados por el método de punto crítico y finalmente metalizados con una fina capa de oro (Microscopio modelo JEOL 5800 LV con un voltaje de aceleración de campo de 15 Kv).

**3.3.3.2 De heces:**

Los análisis coproparasitológicos fueron realizados siguiendo el protocolo descrito por Mader (2006), desde el periodo de admisión al cautiverio y por el término de 90 días en total. Fueron colectadas muestras de materia fecal (sin uratos) que se colocaron en medio conservante (formol al 10%). Las colectas fueron realizadas en forma seriada a fin de obtener un volumen suficiente para los ensayos, así como también cubrir un período de tiempo suficiente que ayude a la detección de estructuras parasitarias eliminadas de modo intermitente (por ejemplo, la puesta de los helmintos es irregular y la emisión de ooquistes es discontinua).

Los elementos parasitarios a menudo están muy diluidos en las deposiciones/muestras para ser identificados fácilmente mediante exámenes realizados con su concentración natural. Es por ello que para el diagnóstico parasitológico se utilizan métodos que concentran (o enriquecen) los elementos parasitarios, los cuales se describen a continuación:

- Técnica de flotación: Esta técnica concentra los elementos parasitarios y los separa del detrito de las deposiciones que dificulta la observación. Se utilizan soluciones con una densidad un poco superior a la de los elementos parasitarios de manera que éstos floten y puedan ser recogidos de la superficie. La solución azucarada de Sheater y la solución sobresaturada de cloruro de sodio (Solución de Willis) son las más utilizadas. Esta técnica se utiliza para la identificación de huevos que presentan cámara de aire (huevos de nematodes), huevos de pentastómidos y ooquistes de protozoarios.

La técnica descrita por Barriga (2002) consiste en homogeneizar la materia fecal con 15 mililitros de la solución de Sheater o Willis, filtrar el homogenado con un colador fino de té para remover las partículas grandes, y verter el filtrado en un tubo o frasco de vidrio hasta que la superficie del líquido forme un menisco en la boca del tubo. Luego se deposita un cubreobjetos limpio en la boca del tubo de modo que haga contacto con el líquido, pero sin formar burbujas. A medida que los huevos asciendan se pegarán al cubreobjetos. Dejar reposar por 7 minutos (Fotografía 4). Levantar el cubreobjetos en posición horizontal de modo que quede una gota de suspensión colgando de él, colocarlo sobre un portaobjetos y llevarlo al microscopio para examinarlo.

- Técnica de sedimentación: La técnica de sedimentación es utilizada para el diagnóstico de huevos compactos y sin cámara de aire (cestodes, trematodes, acantocéfalos). Se basa en la concentración de elementos parasitarios por la acción de la gravedad, y se lleva a cabo suspendiendo las heces en agua corriente, agua destilada o solución salina y dejando que se verifique un asentamiento natural, o bien se puede acelerar el proceso mecánicamente por medio de la centrifugación. La técnica de sedimentación común o simple utilizada fue la descrita por Barriga (2002), la cual consiste en mezclar la muestra de heces con 200 mililitros de agua corriente y algunas gotas de solución detergente de Dennis, Stone & Swanson (DSS), luego filtrar la suspensión con un colador fino de té 2 o 3 veces para remover las partículas más gruesas. Verter el filtrado en una copa cónica y dejarlo reposar por 15

minutos, los huevos sedimentarán y gran parte de los detritos flotará. Luego se realiza la remoción del sobrenadante sin levantar el sedimento, para eliminar los detritos. A continuación, se resuspende el sedimento en 200 mililitros de agua corriente, dejando reposar 15 minutos nuevamente y luego se repite el procedimiento de remover el sobrenadante, sin eliminar el sedimento. Se realiza una leve agitación del sedimento y con una pipeta se remueven unas gotas pasándolas a un portaobjetos, para observar al microscopio. Este método es simple pero lento y no es muy eficiente, ya que puede no detectar parasitosis leves (Fotografía 5).

Existen varias técnicas de sedimentación especial, la utilizada en este caso fue la técnica de sedimentación por centrifugación del formol-éter o técnica de Richie, descrita por Barriga (2002), la cual consiste en homogeneizar la muestra de heces con 10 mililitros de agua corriente y algunas gotas de solución de DSS sin formar espuma para remover más detritos. Filtrar la suspensión a través de doble capa de gasa colocada en la boca de un embudo. Este procedimiento puede realizarse 2 o 3 veces, dependiendo de la cantidad de detritos que contenga la materia fecal. Luego se recoge la suspensión en un tubo cilindro-cónico para centrifuga de 15 mililitros. Se agregan 2 mililitros de éter y se agita el tubo para homogeneizar, posteriormente centrifugar a 1500 rpm por 5 minutos. Descartar el sobrenadante y agregar 5 mililitros de formol al 10% y agitar vigorosamente por 30 segundos. Volver a centrifugar por 2 minutos a 1500 rpm, luego descartar el sobrenadante con un golpe seco y con una pipeta tomar una pequeña cantidad del sedimento y colocarlo en una placa de Petri o portaobjetos, agregando algunas gotas de lugol para que facilite la observación de los huevos. Posteriormente observar en microscopio (Fotografía 6).

Los resultados de los análisis coproparasitológicos fueron expresados utilizando una escala de cruces, que indican infestaciones con carga parasitaria baja (una cruz, observación de 1-2 huevos u ooquistes por campo), infestación leve (dos cruces, 4 a 7 huevos/ooquistes por campo), infestación moderada (8 a 12 huevos/ooquistes) y cargas parasitarias muy altas (4 cruces, 10-15 o más huevos u ooquistes por campo) siempre considerando el campo microscópico observado con aumento 400x (Quiroz, 2005).



Fotografía 4. Técnica de enriquecimiento por flotación con solución azucarada de Sheater. Imagen del autor.



Fotografía 5. Técnica de sedimentación común utilizando Solución de Dennis, Stone & Swanson. Imagen del autor.



Fotografía 6. Pasos de la técnica de sedimentación por centrifugación, técnica de Richie o técnica del formol-éter. Imágenes del autor.

**3.4 Técnica de necropsia:** Se utilizó la metodología aplicada por Martínez-Silvestre (2001).

**3.4.1 Examen externo:** evaluación de la condición nutricional y del grado de hidratación del animal, continuando con la observación del estado de la piel, de la cavidad oral, ojos, narinas y cloaca; para finalizar se realiza una palpación cuidadosa en busca de traumas, masas o tumefacciones.

**3.4.2 Examen interno:** Para realizar el examen interno de una serpiente, el animal es posicionado en decúbito dorsal. Se practica una incisión en la línea media ventral, desde la cloaca cranealmente hasta el espacio intermandibular, luego la piel es luego desplazada a los lados en todo el cuerpo del animal, exponiendo el tejido subcutáneo y muscular.

Para el examen de la cavidad oral se incide por la articulación temporomandibular, permitiendo examinar la lengua, la glotis, el esófago proximal y la tráquea. La cavidad celómica es examinada luego de la incisión en la línea media ventral, separando el tejido subcutáneo y muscular, observando todos los órganos *in situ*; las serpientes con buena condición corporal presentan cuerpos grasos en la cavidad celómica. El timo y la glándula tiroideas se encuentran localizados cranealmente al corazón. Las vísceras de la cavidad

celómica se retiran totalmente, para realizar un examen detallado y organizado de todos los órganos. Utilizando la tracción en sentido caudal desde la laringe, la tráquea y el esófago, se van separando de la cavidad cortando el tejido conectivo y sosteniendo los bordes de la tráquea y esófago con unas pinzas con garra. Todas las vísceras se retiran y son dispuestas en una mesa de disección. Se inicia la inspección con el corazón, se realiza una incisión en el vértice y se continua hasta las aurículas y grandes vasos, para visualizar el endocardio y las válvulas cardíacas. Posteriormente es examinada la tráquea, los bronquios y el pulmón. La tráquea se abre con ayuda de una tijera en dirección caudal hasta el pulmón (que termina en un gran saco aéreo). Se observa la luz traqueal y del pulmón en busca de secreciones, nódulos o material extraño, y se toman muestras del pulmón que involucren diferentes regiones. Luego se continúa con el hígado, que es un órgano alargado, de color café, con la vesícula biliar localizada distalmente. En el examen del hígado deben buscarse cambios de coloración, tamaño, forma, presencia de masas o nódulos, y deben realizarse diversos cortes del parénquima. El bazo cortado a la mitad para su muestreo, con la finalidad de que el formol penetre en el parénquima. Algunas especies de serpientes presentan el bazo y el páncreas fusionados (esplenopáncreas). El tracto gastrointestinal de las serpientes es una estructura simple compuesta por el estómago, intestino delgado e intestino grueso. Deben ser muestreadas varias secciones del intestino para su estudio histopatológico. Para examinar la mucosa del tracto gastrointestinal, se corta el mesenterio con una tijera y posteriormente se abre desde el estómago hasta el intestino grueso. Se buscan alteraciones en la coloración, engrosamiento de las paredes intestinales o de los pliegues estomacales, como también parásitos gastrointestinales. Los riñones son multilobulados, de color café oscuro y los uréteres se conectan directamente con el urodeum en la cloaca. Se examinan los riñones, y si presentan alteraciones de coloración o tamaño; luego incidir con bisturí para determinar cambios en la consistencia o la presencia de uratos. Las glándulas adrenales son estructuras alargadas, delgadas, de color café amarillento, localizadas entre el mesorquio y mesovario en machos y hembras, y deben ser colectadas con los riñones. En los machos, los testículos son alargados y se localizan entre el páncreas y el riñón; en las hembras, los ovarios se localizan cerca del páncreas. Es importante examinar los oviductos en busca de gravidez o presencia de huevos.

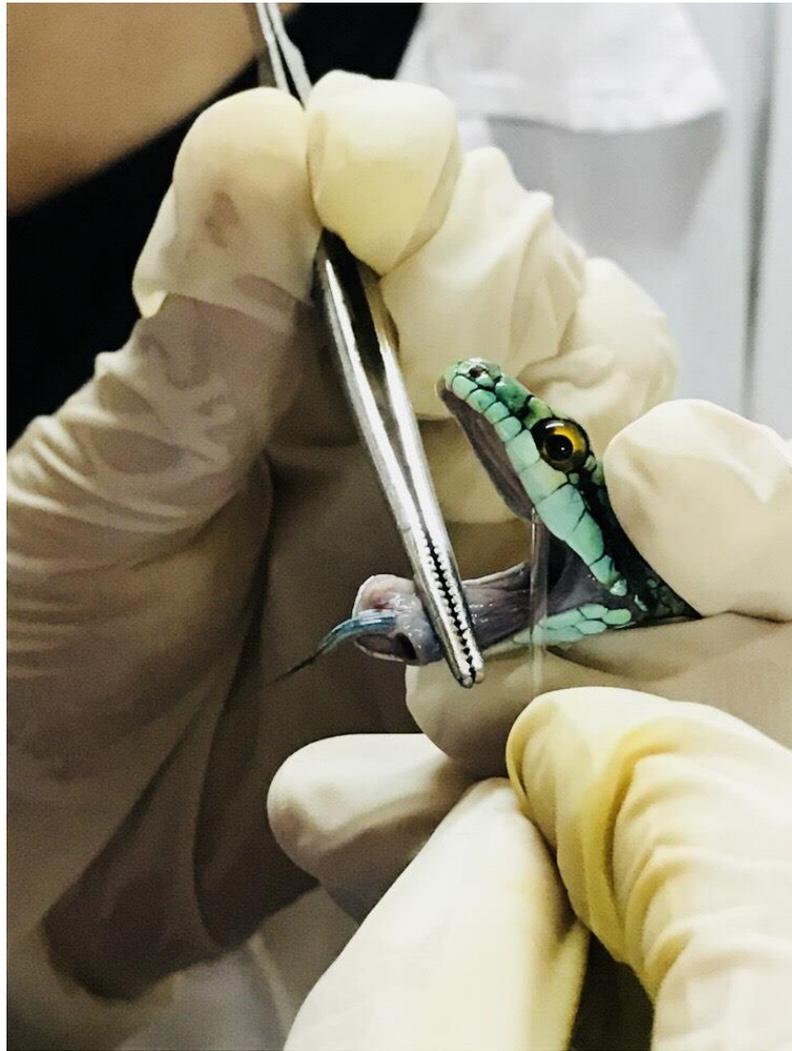
**3.5 Análisis histopatológico:** Las muestras de tejidos (y eventualmente endoparásitos) obtenidas en necropsias fueron fijadas en formol tamponado al 10%, y luego procesadas por técnicas clásicas histopatológicas, cortadas con micrótopo tipo Minot a 5  $\mu\text{m}$ , y finalmente coloreadas con tinción de Hematoxilina-Eosina (H-E) y eventualmente otras tinciones especiales como azul de toluidina (Prophet *et al*, 1995).

**3.6 Observación microscópica de parásitos adultos recuperados en necropsia:**  
Se procedió de modo similar a lo descrito en el ítem 3.3.3.1.

### **3.7 Caracterización de venenos de colúbridos**

#### **3.7.1 Veneno de colúbridos**

La extracción fue realizada mensualmente, 3 semanas luego de la alimentación, siguiendo la metodología descrita por Ferlan *et al.* (1983) (Fotografía 7). Luego de cada procedimiento, se desinfectaron los colmillos con solución de yodo povidona al 1% para prevenir infección bacteriana.



Fotografía 7. Extracción de veneno en un ejemplar de *Leptophis ahaetulla marginatus* siguiendo la metodología descrita por Ferlan *et al* (1983). Imagen del autor.

### 3.7.2 Determinación de la concentración de proteínas

El contenido proteico se determinó mediante fluorimetría (Qubit 2.0, Life Technologies).

### 3.7.3 Perfil proteico

Se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) de acuerdo al método de Laemmli (1970). En el caso de venenos de colúbridos constituidos principalmente por componentes de baja masa molecular, se realizó electroforesis con Tricina (Tricina-SDS-PAGE) usando geles resolutivos de 16,5% (Schägger y von Jagow, 1987). En ambos casos, las muestras se analizaron en condiciones reductoras (con 2-mercaptoetanol) y no reductoras (sin 2-mercaptoetanol). Los geles se tiñeron con nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) según procedimiento descrito previamente (Blum *et al*, 1987).

#### **3.7.4 Actividad proteolítica**

Se utilizó un ensayo sobre azocaseína previamente descrito (Wang & Huang, 2002). En forma resumida, la mezcla de reacción compuesta por 90  $\mu\text{L}$  de azocaseína 5 mg/mL y 10  $\mu\text{L}$  de solución de veneno, se incubarán a 37 °C durante 90 min. Posteriormente, la reacción se detendrá mediante adición de 200  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético 5% (m/v) a TA. Después de centrifugar a 12.500 g durante 5 min para remover el material sin hidrolizar, se mezclarán 150  $\mu\text{L}$  del sobrenadante con un volumen equivalente de NaOH 0,5 M, y se determinará la absorbancia a 450 nm. Con el fin de trazar una curva de concentración-actividad, se testearán diluciones seriadas de cada una de las muestras de veneno. La actividad específica se expresará en unidades/mg de proteína, definiéndose una unidad de actividad enzimática como la cantidad de proteína capaz de causar un incremento de 1 unidad de absorbancia por min a 450 nm.

## 4 RESULTADOS

**4.1** Para la realización de este proyecto se evaluaron en total 30 ejemplares de colúbridos, 18 en la FCV-UNNE y 12 en el INMeT. En la Tabla 1 se muestran las especies de colúbridos comprendidas en este trabajo. De los ejemplares de la FCV – UNNE, 15 fueron diagnosticados con parasitosis y 3 presentaron resultados negativos, mientras que de los especímenes evaluados en el INMeT, 10 presentaron parasitosis y en 2 de ellos no se encontraron parásitos.

Tabla 1. Ejemplares con ectoparásitos y/o endoparásitos distribuidos según especie de colúbrido.

<b>Especie</b>	<b>Tamaño muestral</b>	<b>N° de especímenes con endoparásitos</b>	<b>N° de especímenes con ectoparásitos</b>
<i>Xenodon merremii</i>	3	3 (100%)	-
<i>Philodryas olfersii aestivus</i>	3	2 (67%)	-
<i>Philodryas patagoniensis</i>	6	6 (100%)	1 (17%)
<i>Leptophis ahaetulla marginatus</i>	7	5 (71%)	-
<i>Tamnodynastes strigatus</i>	1	1 (100%)	-
<i>Mussurana bicolor</i>	1	1 (100%)	-
<i>Oxyrhopus guibei</i>	2	2 (100%)	-
<i>Philodryas olfersii olfersii</i>	3	3 (100%)	-
<i>Erythrolamprus aesculapii</i>	1	1 (100%)	-
<i>Sibynomorphus ventrimaculatus</i>	1	1 (100%)	-
<i>Chironius bicarinatus</i>	1	-	-
<i>Oxyrhopus petolaris</i>	1	-	-
<b>Total</b>	30	25 (83%)	1 (3%)

### 4.2 Examen parasitológico:

#### 4.2.1 Observación macroscópica de ectoparásitos

Se realizó el hallazgo de un ectoparásito hematófago en un ejemplar de *Philodryas patagoniensis* del serpentario de la FCV-UNNE, el cual fue extraído con pinzas para ser observado en lupa y evaluar diferentes características

taxonómicas que permitieron su identificación. La garrapata colectada fue identificada como un ejemplar hembra y presentó las siguientes características:

Escudo semi-triangular con ornamentaciones más pálidas en la base y en el área escapular, y puntillado abundante en el área detrás de los ojos; espolones en las coxas I a IV pequeños y no salientes, dentición del hipostoma 3/3. Así, se clasificó taxonómicamente como perteneciente al género *Amblyomma* especie *dissimile*, según la clave de Robinson (1926) (Fotografía 8).



Fotografía 8. a) Ejemplar de *Philodryas patagoniensis* afectada por ectoparasitosis (flecha). b) Observación con lupa para clasificar al parásito. Ejemplar hembra. Imágenes del autor.

**4.2.2 Observación macroscópica de endoparásitos adultos:** 9 nematodos adultos (6 hembras y 3 machos) fueron recuperados de la materia fecal del ejemplar con número de identificación 003 (*Leptophis ahaetulla marginatus*) en los cuales se aplicaron análisis morfométricos obteniéndose una longitud de 2 a 5 centímetros para las hembras y 2 a 4 centímetros para los machos (Fotografía 9).

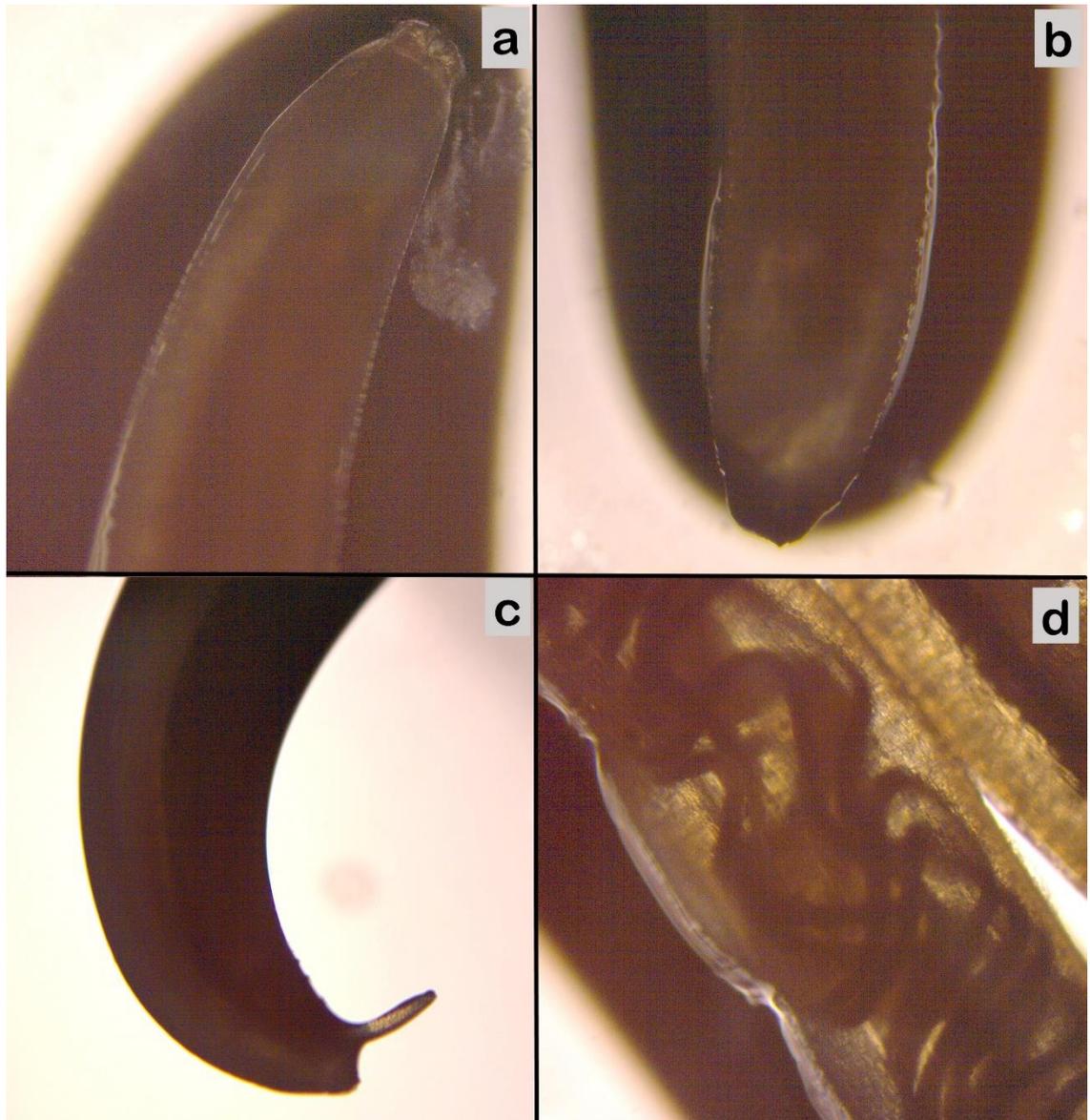


Fotografía 9. Observación macroscópica de nematodos adultos del ejemplar 003 (*Leptophis ahaetulla marginatus*) del INMeT. Se observan dos machos en la parte superior y una hembra en la parte inferior de las fotografías.

#### 4.2.3 Examen microscópico

##### 4.2.3.1 Observación microscópica de endoparásitos adultos

Los nematodos recuperados del ejemplar 003 fueron observados al microscopio óptico identificándose estructuras del extremo anterior y posterior de machos y hembras (Fotografía 10).



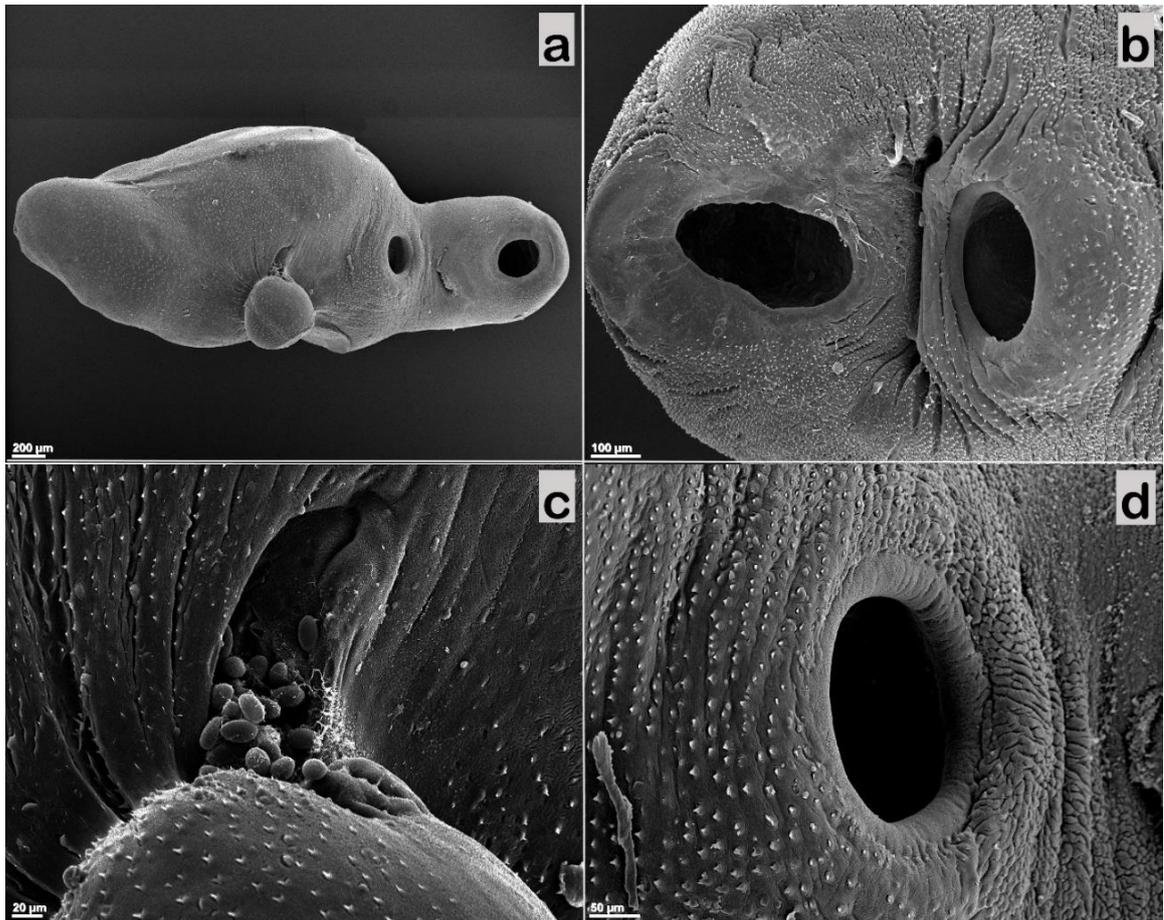
Fotografía 10. Fotomicrografía por microscopía óptica de nematodos de *Leptophis ahaetulla marginatus* (003). a) Extremo anterior, se observan los 3 labios que caracterizan a los ascáridos. b) Extremo posterior de la hembra. c) Extremo posterior del macho, se observan las espículas. D) Útero de la hembra.

Los mismos nematodos se observaron también con MEB con el fin de observar con mayor detalle las espículas, las papilas pre-cloacales y características distintivas del extremo anterior (Fotografía 11).



Fotografía 11. Fotomicrografía por microscopía electrónica de barrido de nematodos de *Leptophis ahaetulla marginatus* (003). a) Extremo anterior, se observan los 3 labios característicos de los parásitos de la familia Ascarididae. 100x. b) Detalle del extremo anterior, se observan las papilas labiales. 300x. c) Extremo posterior de la hembra, se observa la apertura cloacal. 90x. d) Extremo posterior del macho, se distingue una hilera de papilas pre-caudales. 90x. Imágenes del autor.

En el caso del espécimen con número de identificación 007 (*Leptophis ahaetulla marginatus*, del INMeT) fueron encontrados 3 parásitos adultos compatibles con trematodes de la subclase Digenea en la cavidad bucal, y fueron posteriormente observadas con MEB (Fotografía 12).



Fotografía 12. Fotomicrografía por microscopía electrónica de barrido de trematodos de *Leptophis ahaetulla marginatus* (007). a) Parásito adulto de la subclase *Digenea*, se observan las ventosas oral y ventral. 33x. b) Detalle de las ventosas, se distinguen algunas papilas sensoriales entre ambas. 100x. c) Se observa la cutícula con espinas características y la salida de huevos por el poro genital. 300x. d) Detalle del tegumento, que presenta pequeños engrosamientos de la cutícula en forma de espinas, rodeando la ventosa ventral. 200x.

#### 4.2.3.2 Examen parasitológico microscópico en materia fecal

En las tablas 2 y 3 se muestran los resultados del análisis coproparasitológico semicuantitativo realizado al momento de la admisión al cautiverio de cada ejemplar.

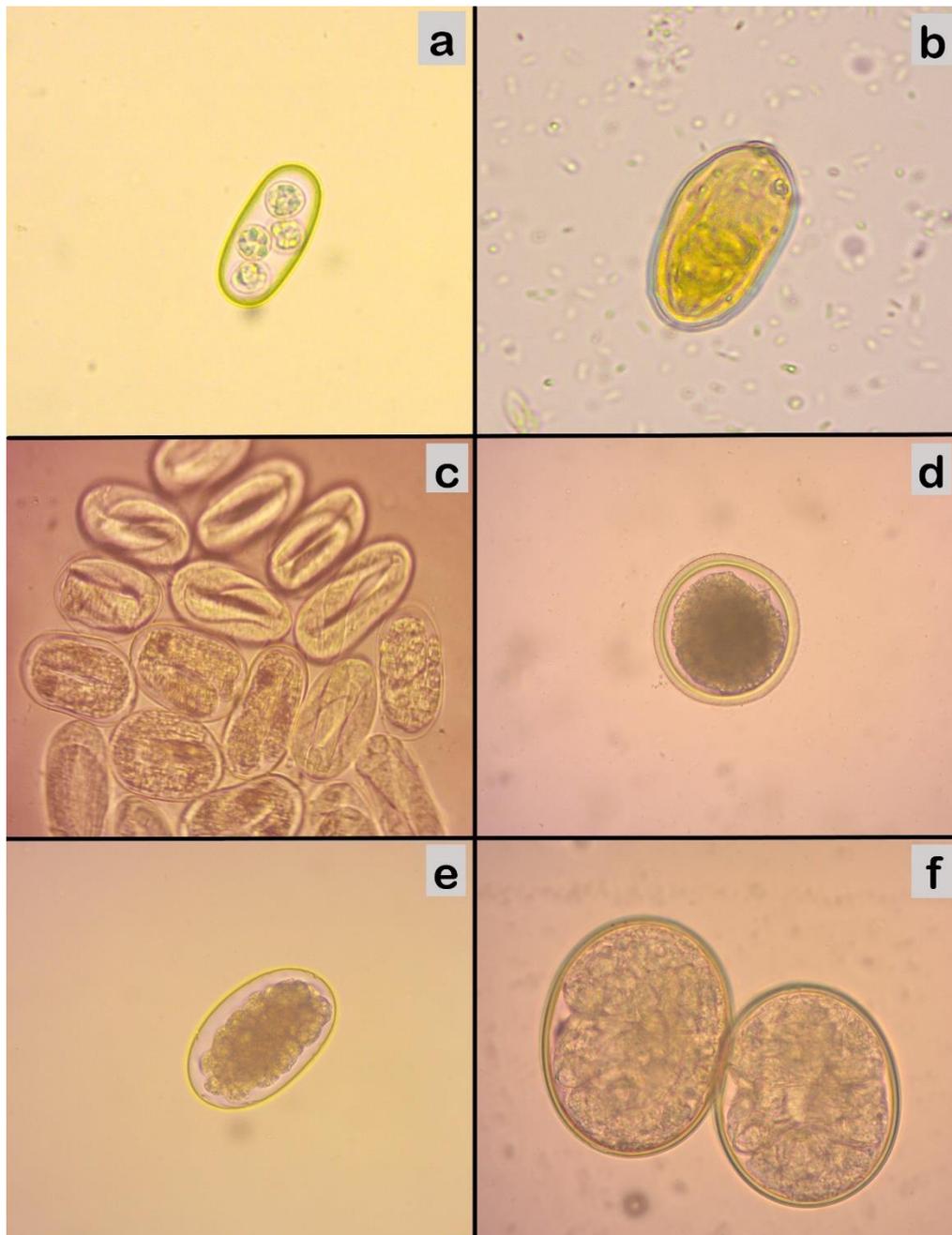
Tabla 2. Resultados del análisis coproparasitológico de muestras de especímenes mantenidos en el serpentario de la FCV - UNNE.

Código del espécimen	Especie	Ooquistes de coccidios	Huevos de digeneos	Huevos de rabdítidos	Huevos de ascáridos	Huevos de diaphanocephalídeos	Huevos de pentastómidos
Xm 1-16	<i>Xenodon merremii</i>	(++)	-	(+++)	(+)	-	(+)
Xm 2-16	<i>Xenodon merremii</i>	-	(++)	-	-	-	-
Xm 1-17	<i>Xenodon merremii</i>	-	(++)	(++)	-	-	-
POL 1-15	<i>Philodryas olfersii aestivus</i>	(++++)	-	(+)	-	-	-
POL 2-15	<i>Philodryas olfersii aestivus</i>	-	(++)	(+++)	-	-	-
POL 2-18	<i>Philodryas olfersii aestivus</i>	-	-	-	-	-	-
Pp 1-17	<i>Philodryas patagoniensis</i>	-	-	(++++)	(++++)	-	(++)
Pp 3-18	<i>Philodryas patagoniensis</i>	-	-	(++)	(+)	-	(+++)
Pp 4-18	<i>Philodryas patagoniensis</i>	-	(+)	-	(++)	-	(+++)
Pp 5-18	<i>Philodryas patagoniensis</i>	(++++)	-	(+++)	-	(+++)	-
Pp 6-18	<i>Philodryas patagoniensis</i>	-	-	(++)	-	(++++)	(+++)
Pp 1-19	<i>Philodryas patagoniensis</i>	(+)	-	(+++)	-	-	-
LAM 3-17	<i>Leptophis ahaetulla marginatus</i>	-	-	-	-	-	-
LAM 4-17	<i>Leptophis ahaetulla marginatus</i>	-	-	(++)	-	(+)	-
TD 1-15	<i>Thamnodynastes strigatus</i>	(++)					
MB 1-17	<i>Mussurana bicolor</i>	-	-	(+)	-	-	-
OG 1-18	<i>Oxyrhopus guibei</i>	-	-	(+++)	-	-	-
CB 1-19	<i>Chironius bicarinatus</i>	-	-	-	-	-	-

Tabla 3. Resultados del análisis coproparasitológico de muestras de especímenes mantenidos en el serpentario del INMeT.

Código del espécimen	Especie	Ooquistes de Coccidios	Huevos Digeneos	Huevos de Rabdítidos	Huevos de Ascáridos
001	<i>Leptophis ahaetulla marginatus</i>			(+++)	
002	<i>Leptophis ahaetulla marginatus</i>	-	-	-	-
003	<i>Leptophis ahaetulla marginatus</i>			-	(++)
005	<i>Leptophis ahaetulla marginatus</i>	(++)		-	(+)
007	<i>Leptophis ahaetulla marginatus</i>		(++)	(++)	-
011	<i>Philodryas olfersii olfersii</i>			(+++)	(+)
012	<i>Philodryas olfersii olfersii</i>			(++)	(++++)
015	<i>Philodryas olfersii olfersii</i>			-	(+)
006	<i>Oxyrhopus guibei</i>			-	(+)
013	<i>Oxyrhopus petolaris</i>			-	-
014	<i>Erythrolamprus aesculapii</i>			(+)	(++++)
016	<i>Sibynomorphus ventrimaculatus</i>				(++++)

En la fotografía 13 se muestran los huevos y ooquistes de diferentes taxones parasitarios encontrados en muestras de MF de colúbridos comprendidos en este estudio.



Fotografía 13. a) Fotomicrografía de oquiste tipo *Eimeria* de Coccidios (medida: 38  $\mu\text{m}$ ). 400x. b) Fotomicrografía de huevo de digeneos. Medida: 48  $\mu\text{m}$ . 400x. c) Fotomicrografía de huevos de rabdítidos (medida: 72  $\mu\text{m}$ ). 400x. d) Fotomicrografía de huevo de ascáridos (medida: 92  $\mu\text{m}$ ). 400x. e) Fotomicrografía de huevo de diaphanocephalídeos (medida: 71  $\mu\text{m}$ ). 400x. f) Fotomicrografía de huevos de pentastómidos (medida: 110  $\mu\text{m}$ ). 400x. Imágenes del autor.

Se calculó la prevalencia de cada taxón de endoparásitos por especie de colúbrido. Los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Prevalencia de endoparásitos por especie de colúbrido.

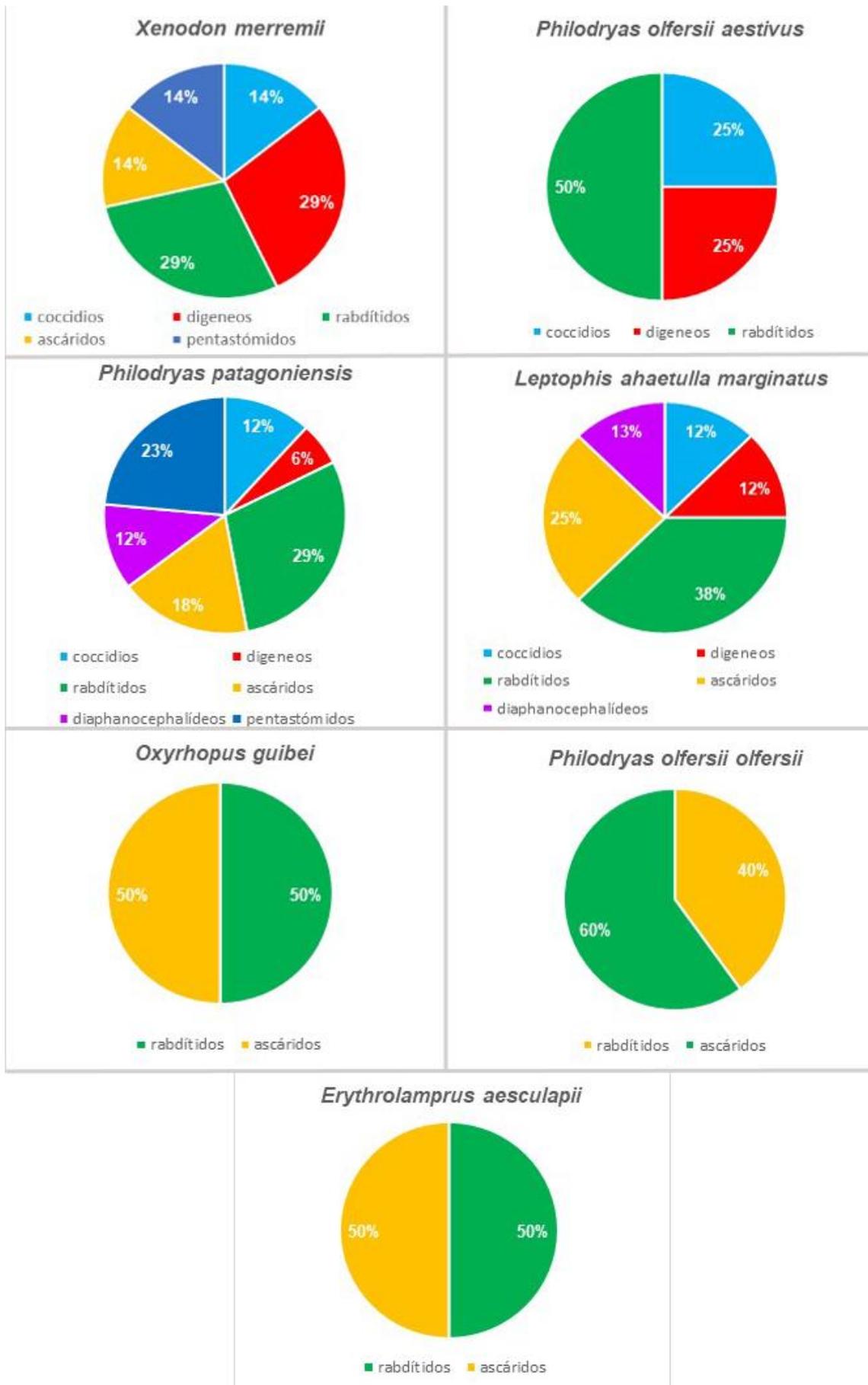
Especie de colúbrido	Tamaño muestral	coccidios	digeneos	rabdítidos	ascáridos	diaphanocephalídeos	pentastómidos
<i>X. merremii</i>	3	1 (33%)	2 (66%)	2 (66%)	1 (33%)	-	1 (33%)
<i>P. o. aestivus</i>	3	1 (33%)	1 (33%)	2 (66%)	-	-	-
<i>P. patagoniensis</i>	6	2 (33%)	1 (16%)	5 (83%)	3 (50%)	2 (33%)	4 (67%)
<i>L. ahaetulla marginatus</i>	7	1 (14%)	1 (14%)	3 (43%)	2 (28%)	1 (14%)	-
<i>T. strigatus</i>	1	1 (100%)	-	-	-	-	-
<i>M. bicolor</i>	1	-	-	1 (100%)	-	-	-
<i>O. guibei</i>	2	-	-	1 (50%)	1 (50%)	-	-
<i>P. o. olfersii</i>	3	-	-	2 (66%)	3 (100%)	-	-
<i>E. aesculapii</i>	1	-	-	1 (100%)	1 (100%)	-	-
<i>S. ventrimaculatus</i>	1	-	-	-	1 (100%)	-	-
<i>C. bicarinatus</i>	1	-	-	-	-	-	-
<i>O. petolarius</i>	1	-	-	-	-	-	-
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>6 (20%)</b>	<b>5 (17%)</b>	<b>17 (57%)</b>	<b>12 (40%)</b>	<b>3 (10%)</b>	<b>5 (17%)</b>

En la tabla 5 se muestra la biodiversidad parasitaria por individuo de cada especie, y en la figura 3 se encuentra esquematizada la biodiversidad parasitaria observada en cada especie.

Tabla 5. Biodiversidad parasitaria por individuo de cada especie de colúbrido comprendido en el estudio.

<b>Especie</b> Total (n=30)	<b>Número de taxones de parásitos por individuo</b> (Media $\pm$ Desv. Estándar cuando $n \geq 3$ )
<i>Xenodon merremii</i> (n= 3)	2,33 $\pm$ 1,53
<i>Philodryas olfersii aestivus</i> (n= 3)	1,33 $\pm$ 1,15
<i>Philodryas patagoniensis</i> (n= 6)	2,833 $\pm$ 0,41
<i>Leptophis ahaetulla marginatus</i> (n= 7)	1,14 $\pm$ 0,90
<i>Philodryas olfersii olfersii</i> (n= 3)	1,67 $\pm$ 0,58
<i>Oxyrhopus guibei</i> (n=2)	1
<i>Tamnodynastes strigatus</i> (n=1)	1
<i>Mussurana bicolor</i> (n=1)	1
<i>Sibynomorphus ventrimaculatus</i> (n=1)	1
<i>Erythrolamprus aesculapii</i> (n= 1)	2
<i>Chironius bicarinatus</i> (n=1)	0
<i>Oxyrhopus petolarius</i> (n=1)	0

Figura 3. Biodiversidad parasitaria por especie de colúbrido.



### Tratamientos y evolución

En algunos especímenes se realizó un tratamiento con fármacos endoparasiticidas y posteriormente se repitió el examen coproparasitológico para evaluar su evolución (Tablas 6 y 7).

Tabla 6. Tratamientos realizados y evolución de los especímenes mantenidos en el serpentario de la FCV – UNNE.

Código del espécimen	Especie	Tratamiento realizado	Evolución
Xm 1-16	<i>Xenodon merremii</i>	Febendazol 25 mg/kg / 7 días PO, 2 aplicaciones. Sulfadimetoxina 90 mg/kg/24 hs PO por 3 días.	Se repitió el análisis a las 2-3 semanas, siendo el resultado negativo.
Xm 2-16	<i>Xenodon merremii</i>	Praziquantel 8 mg/kg PO/14 días, 2 aplicaciones.	Murió a las dos semanas de iniciado el tratamiento.
Xm 1-17	<i>Xenodon merremii</i>	Praziquantel 8 mg/kg PO/14 días, 2 aplicaciones. Febendazol 25 mg/kg /7 días PO, 2 aplicaciones.	Se repitió el análisis a las 2-3 semanas, siendo el resultado negativo.
Pp 3-18	<i>Philodryas patagoniensis</i>	Febendazol 25 mg/kg /7 días PO, 2 aplicaciones.	Se repitió el análisis a las 2-3 semanas, siendo el resultado negativo.
TD 1-15	<i>Tamnodynastes strigatus</i>	Sulfadimetoxina 90 mg/kg/24 hs PO por 3 días.	Se repitió el análisis a las 2-3 semanas, siendo el resultado negativo.

Tabla 7. Tratamientos realizados y evolución de los especímenes mantenidos en el serpentario del INMeT.

Código del espécimen	Especie	Tratamiento realizado	Evolución
001	<i>Leptophis ahaetulla marginatus</i>	Febendazol 10% suspensión, 40 mg/kg PO, repetición a los 6 días.	A las 2-3 semanas se repitió el análisis, dando resultado negativo.
003	<i>Leptophis ahaetulla marginatus</i>	Febendazol 25 mg/kg/7 días PO (3 aplicaciones).	A las 2-3 semanas se repitió el análisis, dando resultado negativo.
005	<i>Leptophis ahaetulla marginatus</i>	Sulfametoxazol 25g/1000g, 2 dosis continuadas y 5 dosis día por medio, IM en músculo paravertebral.	A las 2-3 semanas se repitió el análisis, dando resultado negativo.
007	<i>Leptophis ahaetulla marginatus</i>	Febendazol 25 mg/kg/7 días PO (3 aplicaciones). Praziquantel 8 mg/kg PO/14 días.	Posteriormente todos los análisis dieron resultado negativo.
012	<i>Philodryas olfersii olfersii</i>	Febendazol 25 mg/kg/7 días PO (3 aplicaciones).	Posterior al tratamiento los análisis dieron resultado negativo.
014	<i>Erythrolamprus aesculapii</i>	Febendazol 25 mg/kg/7 días (3 aplicaciones).	Posterior al tratamiento se produjo la muerte del ejemplar

En algunos casos no fue realizado el tratamiento, por alguno de los siguientes motivos:

- A la evaluación clínica se constató que el espécimen se encontraba debilitado, deshidratado, o con alguna carencia nutricional (por lo cual no

respondería al tratamiento, o bien éste constituiría un factor agravante de su estado general);

- Por muerte del ejemplar;
- Por obtener una carga parasitaria leve/moderada en los análisis coproparasitológicos, considerando que muchas de las parasitosis son autolimitadas.

La evolución de los ejemplares que no recibieron tratamiento se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Evolución de ejemplares que no recibieron tratamiento de acuerdo al análisis coproparasitológico.

<b>Código del espécimen</b>	<b>Especie</b>	<b>Evolución</b>
POL 1-15	<i>Philodryas offersii aestivus</i>	Hubo una disminución significativa de la carga parasitaria en el siguiente análisis.
POL 2-15	<i>Philodryas offersii aestivus</i>	Hubo una disminución significativa de la carga parasitaria en el siguiente análisis.
Pp 1-17	<i>Philodryas patagoniensis</i>	Murió el día posterior al primer análisis, infelizmente no pudo realizarse la necropsia.*
Pp 4-18	<i>Philodryas patagoniensis</i>	Murió luego del primer análisis coproparasitológico.
Pp 5-18	<i>Philodryas patagoniensis</i>	Murió el día posterior al primer análisis, infelizmente no pudo realizarse la necropsia.*
Pp 6-18	<i>Philodryas patagoniensis</i>	Hubo una disminución significativa de la carga parasitaria en el siguiente análisis.
Pp 1-19	<i>Philodryas patagoniensis</i>	Hubo una disminución significativa de la carga parasitaria en el siguiente análisis.
LAM 4-17	<i>Leptophis ahaetulla marginatus</i>	Murió luego del primer análisis coproparasitológico.
MB 1-17	<i>Mussurana bicolor</i>	El siguiente análisis coproparasitológico dio resultado negativo.
OG 1-18	<i>Oxyrhopus guibei</i>	En el siguiente análisis la carga parasitaria se mantuvo igual.
006	<i>Oxyrhopus guibei</i>	El siguiente análisis coproparasitológico dio resultado negativo.
011	<i>Philodryas offersii offersii</i>	Hubo una disminución significativa de la carga parasitaria en el siguiente análisis.
015	<i>Philodryas offersii offersii</i>	El siguiente análisis coproparasitológico dio resultado negativo.
016	<i>Sibynomorphus ventrimaculatus</i>	El siguiente análisis coproparasitológico dio resultado negativo.

\* En dichos casos la muerte ocurrió en feriado y/o fin de semana, por lo cual el animal ya fue encontrado con un estado de autólisis avanzado, alterando los tejidos e imposibilitando hacer histopatología. Dependiendo de la humedad y temperatura, los cambios autolíticos en reptiles inician a las 12-24 horas de la muerte del animal (Jacobson, 2007).

### **4.3 Necropsia y análisis histopatológico de muestras de órganos**

Durante el período de análisis de cada ejemplar, se produjo la muerte de algunos de ellos, por lo que fue realizada la necropsia y análisis histopatológico de muestras de los órganos para establecer la *causa mortis* probable.

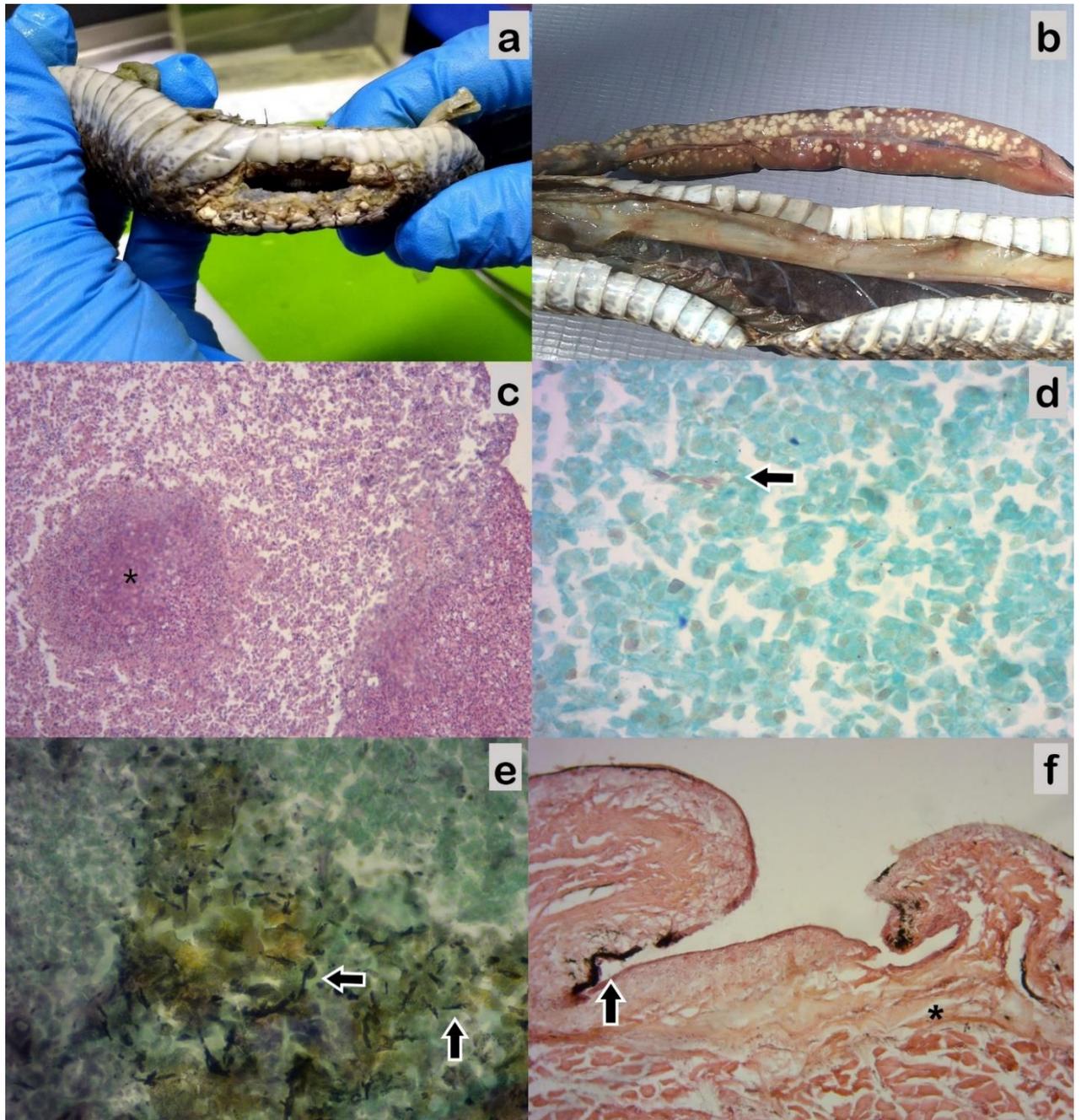
A continuación, se muestran los hallazgos microscópicos y macroscópicos encontrados en los siguientes ejemplares:

**4.3.1 Código del espécimen:** Xm 2-16 - *Xenodon merremii* (ejemplar macho): ver Tabla 9 y Fotografía 14.

Tabla 9. Hallazgos macroscópicos y microscópicos de Xm 2-16.

Órgano	<u>Hallazgos macroscópicos</u>	<u>Hallazgos microscópicos</u>
Hígado	Focos blanquecinos y aplanados, de 1-2 mm de diámetro	Focos de tejido necrótico e infiltrado inflamatorio de células mononucleares entre los hepatocitos. Algunas secciones fueron coloreadas con tinción de metenamina de plata de Grocott y mostraron elementos levaduriformes en los focos de necrosis.
Pulmón	No se evidenció ninguna alteración.	Neumonía granulomatosa difusa. Las secciones coloreadas con tinción de metenamina de plata de Grocott evidenciaron elementos fúngicos consistentes en hifas septadas entre agregados de macrófagos y cúmulos de detritos celulares necróticos.
Piel	Solución de continuidad costrosa, seca, no proliferativa, de 3 cm de largo y 1 cm de ancho en el tercio medio del cuerpo, y otra lesión consistente en decoloración y pérdida de brillo de las escamas, 3 cm posterior a la cloaca.	En las lesiones de piel se evidenció una dermatitis necroulcerativa multifocal con edema dermo-epidérmico extenso e infiltrado inflamatorio.

Causa mortis probable: Posible hepatopatía severa (crónica), dermatitis ulcerativa con posible infección.



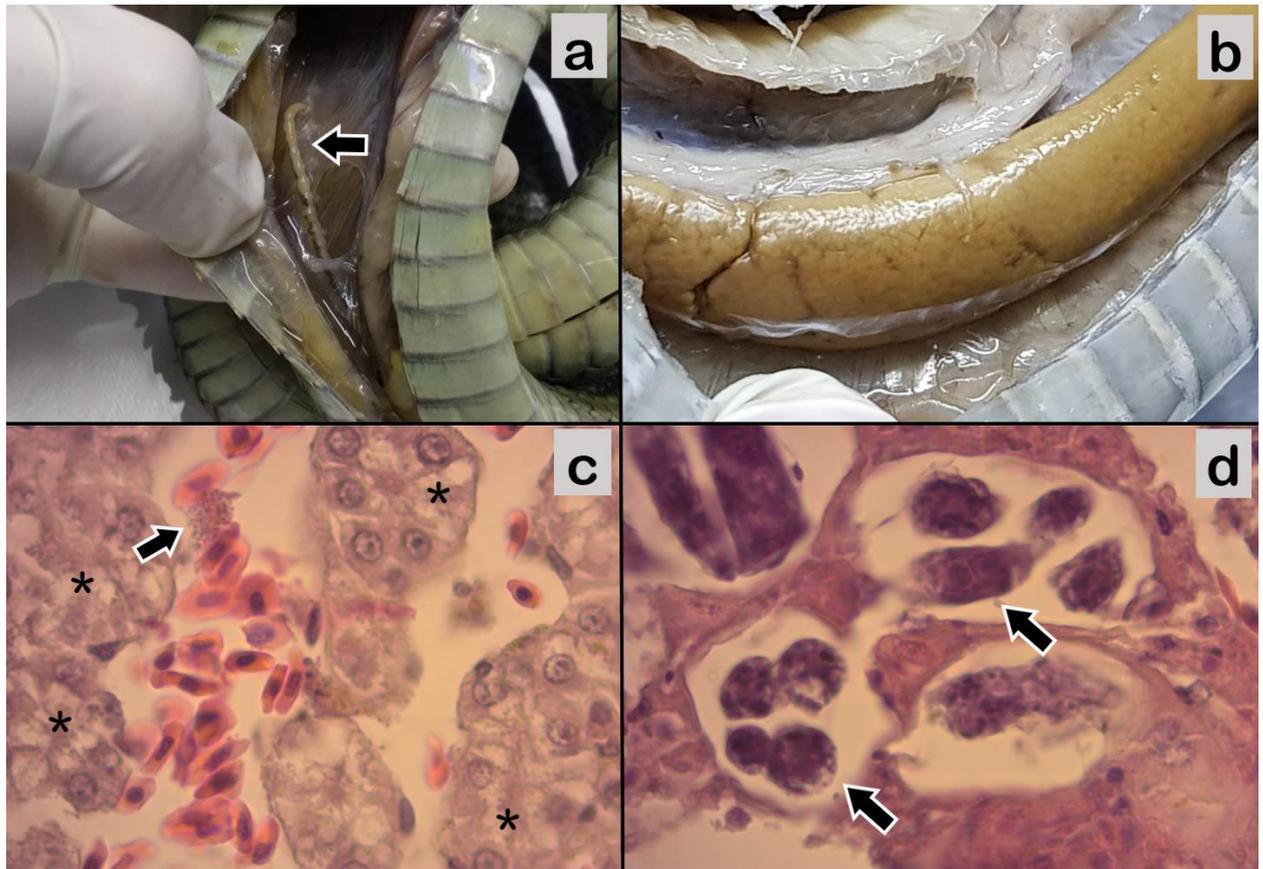
Fotografía 14. Alteraciones macroscópicas y microscópicas encontradas en espécimen de *Xenodon merremi* (Xm 2-16). a) Solución de continuidad costrosa observada en piel. b) Focos blanquecinos numerosos observados en toda la superficie hepática. c) Focos de tejido necrótico en el parénquima hepático (asterisco). Tinción H-E. 100x. d) Se observan elementos levaduriformes en los focos de necrosis (flecha) del parénquima hepático. Tinción de Grocott. 400x. e) Sección de pulmón coloreada con tinción de metenammina de plata de Grocott evidenciando elementos fúngicos consistentes en hifas septadas entre cúmulos de detritos celulares necróticos en pulmón (flechas). 400x. f) Corte histológico de piel. Se observa dermatitis necroulcerativa multifocal (flecha) con edema dermo-epidérmico extenso (asterisco). 100x. Tinción H-E. Imágenes del autor.

**4.3.2** Código del espécimen: Pp 3-18 - *Philodryas patagoniensis* (ejemplar hembra): ver Tabla 10 y Fotografía 15.

Tabla 10. Hallazgos macroscópicos y microscópicos de Pp 3-18.

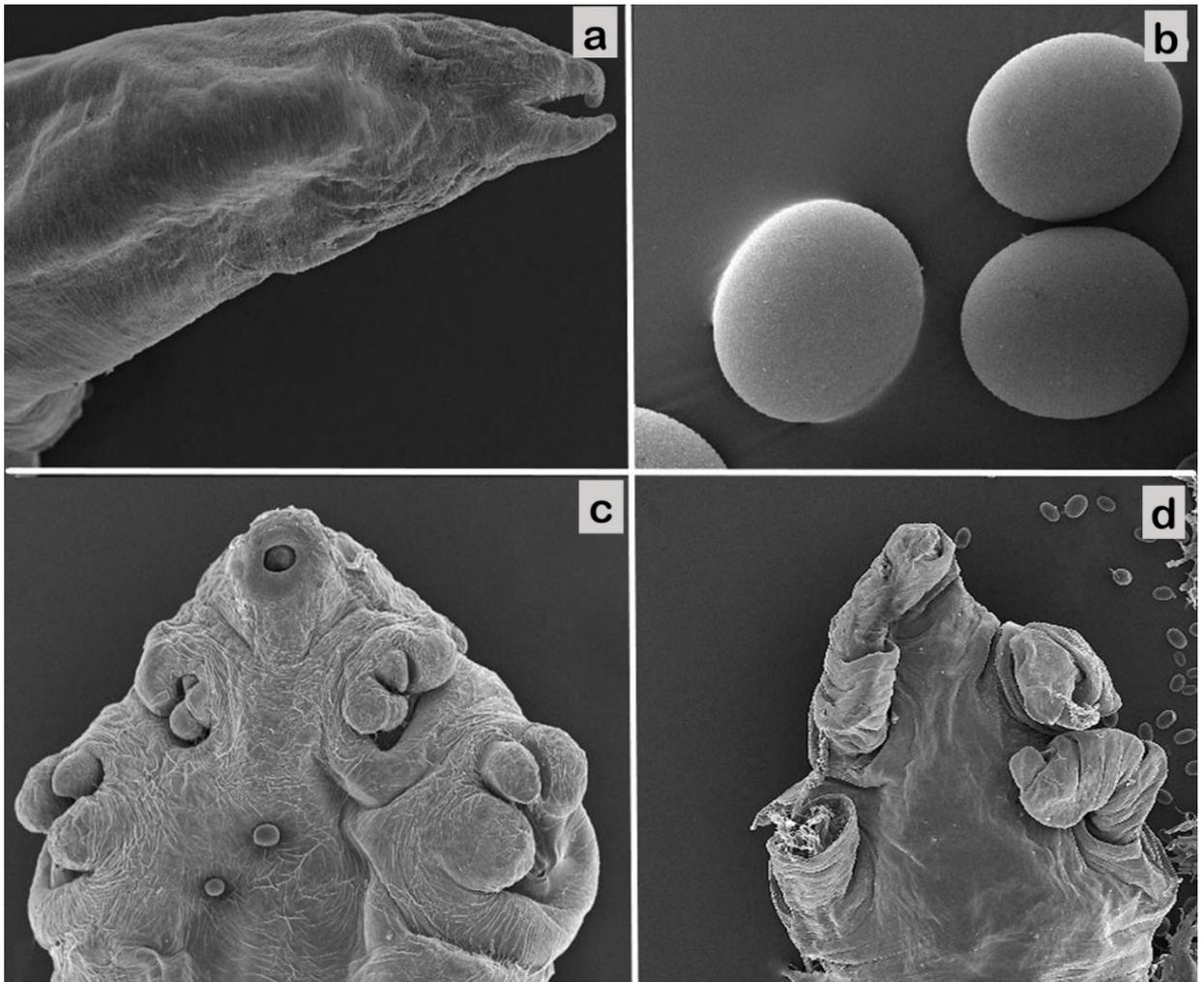
Órgano	<u>Hallazgos macroscópicos</u>	<u>Hallazgos microscópicos</u>
Hígado	Alteración en la coloración, observándose el parénquima de color pardo (coloración normal: rojo vinoso), consistencia firme, bordes alterados.	La mayor parte de los hepatocitos presentaron degeneración turbia e hidrópica. También se observó congestión y dilatación de sinusoides hepáticos, gran número de melanomacrófagos y depósitos de hemosiderina, así como también eosinófilos y azurófilos en gran número en algunas zonas.
Pulmón	Se observaron 4 parásitos dentro de este tejido, compatibles con crustáceos maxilópodos de la Subclase Pentastomida.	Congestión zonal, alveolos con presencia de parásitos (compatibles con nematodos de la Subclase Rhabditia), hiperplasia del epitelio en los septos alveolares y múltiples células inmunitarias (eosinófilos). Se observaron algunos focos de microhemorragias. En otras áreas se observaron depósitos de hemosiderina, células gigantes, parásitos y desprendimiento total de algunas paredes vasculares.
Corazón	No se evidenció ninguna alteración.	Se observaron glóbulos rojos y depósitos de hemosiderina entre fibras musculares.

Causa mortis probable: Parasitosis severa, hepatopatía, neumonitis.



Fotografía 15. Alteraciones macroscópicas y microscópicas encontradas en espécimen de *Philodryas patagoniensis* (Pp 3-18). a) Hallazgo de parásitos dentro del pulmón, compatibles con crustáceos maxilópodos de la Subclase Pentastomida (flecha). b) Alteración de la coloración y de los bordes hepáticos. c) Microfotografía de tejido hepático. Se observa degeneración turbia e hidrópica de hepatocitos (asteriscos), depósitos de hemosiderina y eosinófilos (flecha). 1000x. Tinción H-E. d) Microfotografía de pulmón. Se observan parásitos (nematodos) en los alveolos (flechas), hiperplasia del epitelio en los septos alveolares y múltiples células inmunitarias (eosinófilos). 1000x. Tinción H-E. Imágenes del autor.

Se realizó la observación por MEB de los parásitos recuperados de la cavidad bucal y el pulmón durante la necropsia (Fotografía 16), con el fin de identificar características del cefalotórax que permitan diferenciar entre géneros de la subclase Pentastomida, tales como forma de parapodios, papilas dorsales y frontales, número y tamaño de ganchos, características de las formaciones/apéndices caudales. Se identificaron pentastómidos del género *Raillietiella*, especie *furcocerca* y del género *Cephalobaena*, especie *tetrapoda*. La identificación se realizó de acuerdo a la clave de Heymons (1935), Rego (1983) y Christoffersen (2013).



Fotografía 16. Fotomicrografía por microscopía electrónica de barrido de pentastómidos de *Philodryas patagoniensis* (Pp 3-18). a) *Raillietiella furcocerca*. Extremo posterior, se observan los apéndices caudales alargados. 65x. b) Observación de huevos de *Raillietiella furcocerca*. 450x. c) Se observa el cefalotórax de *Raillietiella furcocerca*, de contorno redondeado, ganchos en disposición trapezoidal, parapodios cortos (reducidos a 3 mamelones) y complejo bucal. 60x. d) *Cephalobaena tetrapoda*. Cefalotórax con 5 protuberancias cortas (rostrum y 4 proyecciones digitiformes conteniendo ganchos para la fijación al huésped). 40x. Imágenes del autor.

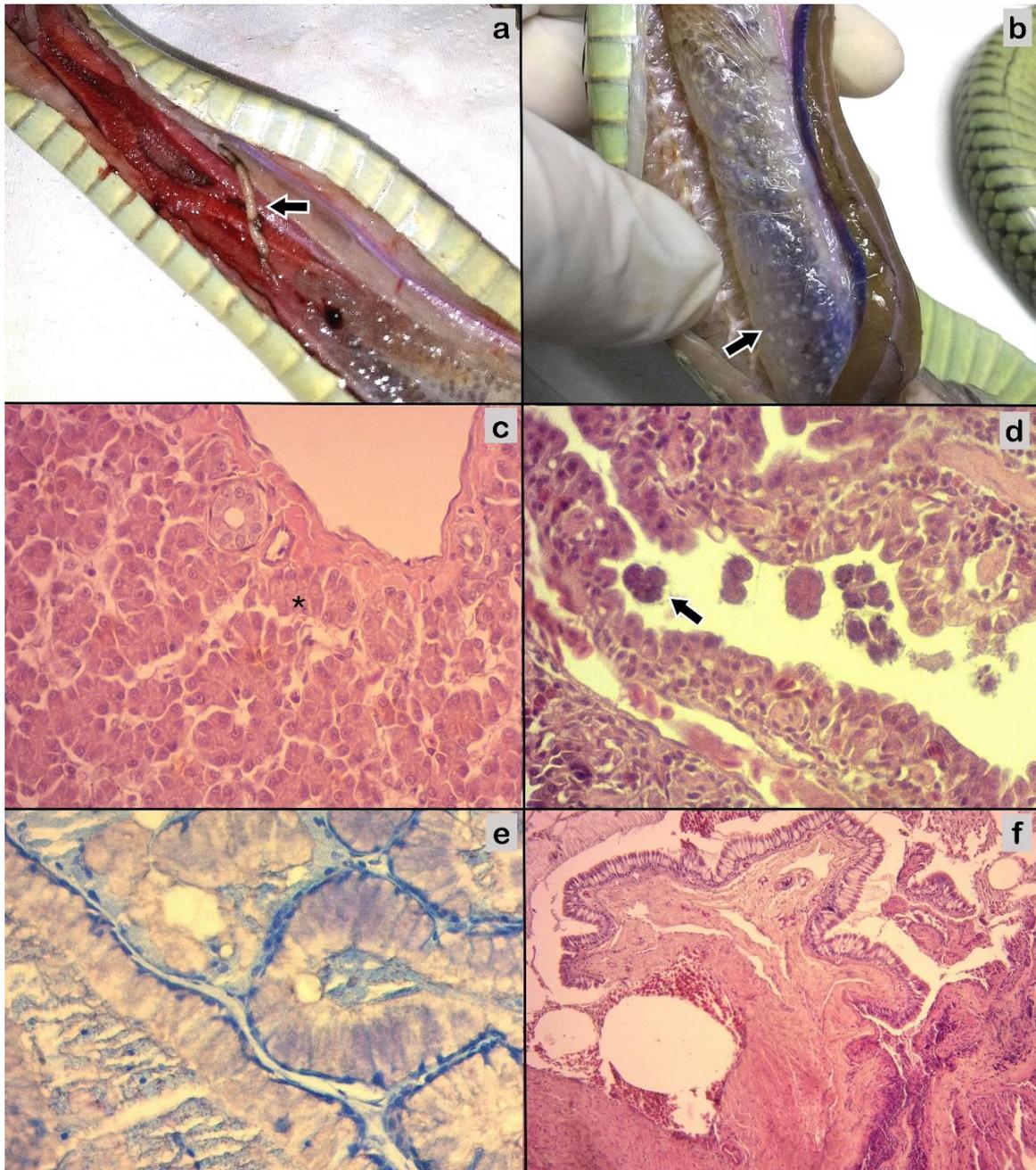
**4.3.3** Código del espécimen: Pp 4-18 - *Philodryas patagoniensis* (ejemplar hembra): ver Tabla 11 y Fotografía 17.

Tabla 11. Hallazgos macroscópicos y microscópicos de Pp 4-18.

Órgano	Hallazgos macroscópicos	Hallazgos microscópicos
Hígado	En el extremo posterior del hígado se observó un área pequeña de congestión.	Desprendimiento de cápsula de Glisson, zona parenquimatosa (predominante) con dilatación de sinusoides, visible especialmente en las zonas periportal y zona de grandes vasos (vena central). Se observó degeneración turbia en algunos hepatocitos, alrededor de grandes vasos y en algunos cercanos a la arteria hepática y conductos biliares (posiblemente por llegada de menor cantidad de oxígeno y nutrientes a estos hepatocitos).
Pulmón	Se observó un puntillado blanquecino, algunos focos de congestión pulmonar y se encontró un parásito compatible con crustáceos maxilópodos de la Subclase Pentastomida.	Neumonitis parasitaria, infiltrado inflamatorio predominantemente mononuclear, presencia de nematodos en la luz alveolar. Hiperplasia del epitelio en los septos alveolares alrededor del músculo liso.
Corazón	No se evidenció ninguna alteración.	En el miocardio se observó separación de fibras musculares, edema interfibrilar y abundante infiltrado inflamatorio.
Glándula de Duvernoy	No se evidenció ninguna alteración.	Infiltrado inflamatorio de mononucleares, presencia de hemosiderina, pequeñas hemorragias en el tejido que rodea a la glándula, focos inflamatorios entre los acinos, y desprendimiento del endotelio vascular en algunos vasos. Se observan algunas áreas metacromáticas de color púrpura (azul de toluidina positivo) lo que indica la tinción de estructuras como mucina y gránulos de heparina de los mastocitos.

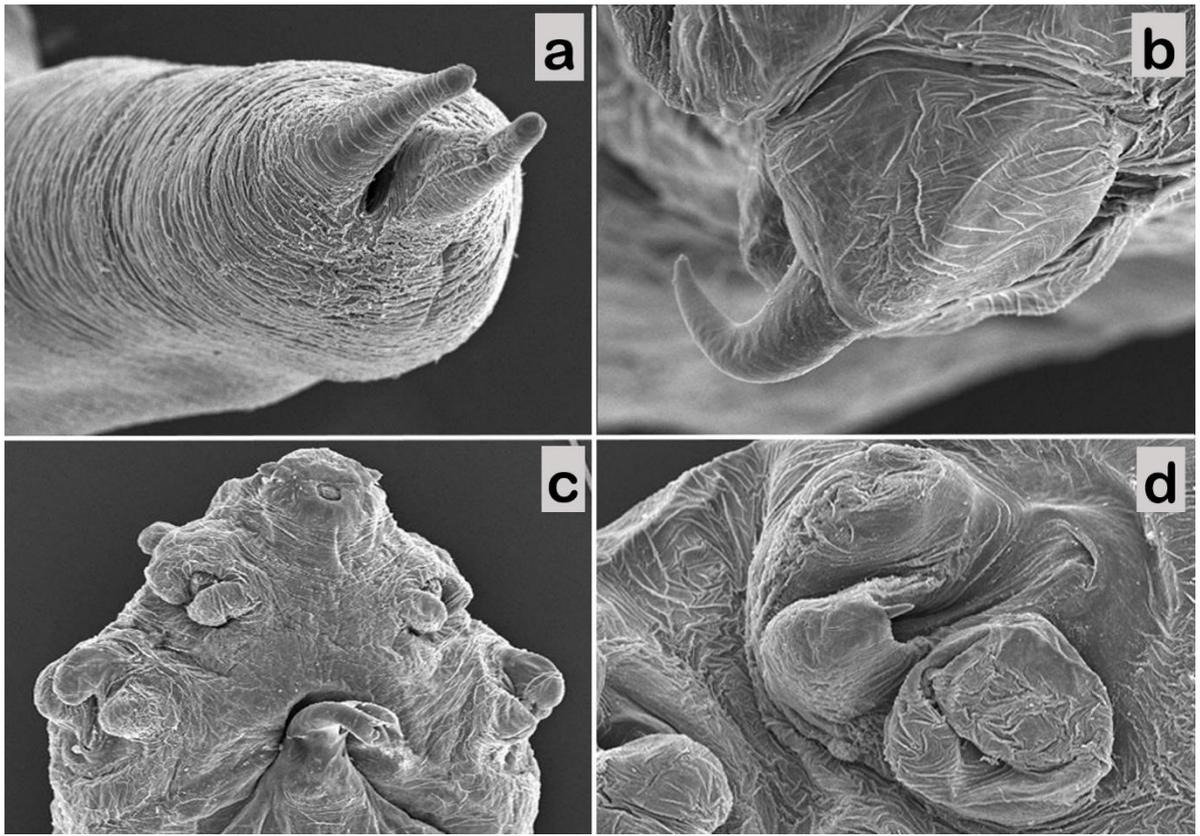
Durante la necropsia, se observó la presencia de parásitos compatibles con trematodos digeneos en la cavidad bucal y en la cavidad celómica se encontraron 4 parásitos compatibles con crustáceos maxilópodos de la Subclase Pentastomida.

Causa mortis probable: posible neumonía multifocal, parasitosis generalizada severa, hepatopatía.



Fotografía 17. Alteraciones macroscópicas y microscópicas encontradas en espécimen de *Philodryas patagoniensis* (Pp 4-18). a) Se observan focos de congestión pulmonar y parásitos dentro del pulmón, compatibles con crustáceos maxilópodos de la Subclase Pentastomida (flecha). b) Puntillado blanquecino observado en la superficie del pulmón. c) Microfotografía de tejido hepático. Se observa dilatación de sinusoides, degeneración turbia en algunos hepatocitos en la zona periportal (asterisco) y depósitos de hemosiderina. 400x. Tinción H-E. d) Microfotografía de pulmón. Se observa infiltrado mononuclear, hiperplasia del epitelio en los septos alveolares y presencia de parásitos (nematodos) en la luz alveolar (flecha). 400x. Tinción H-E. e) Fotomicrografía de glándula de Duvernoy izquierda. Se observa metacromasia (azul de toluidina positivo) en las células seromucosas de los túbulos secretores. 400x. Tinción: azul de toluidina. f) Fotomicrografía de glándula de Duvernoy derecha. Se observa abundante infiltrado inflamatorio y numerosas áreas hemorrágicas en los acinos glandulares. 100x. Tinción H-E. Imágenes del autor.

Se realizó la observación por MEB de los parásitos recuperados del pulmón y de la cavidad celómica en la necropsia (Fotografía 18), a fines de identificar características del cefalotórax que permitan diferenciar entre géneros de la subclase Pentastomida, tales como forma y tamaño de parapodios, papilas (dorsales y frontales), número y tamaño de ganchos, características de las formaciones/apéndices caudales. La identificación se realizó de acuerdo a la clave de Heymons (1935), Rego (1983) y Christoffersen (2013).



Fotografía 18. Fotomicrografía por microscopía electrónica de barrido de pentastómidos de *Philodryas patagoniensis* (Pp 4-18). a) *Raillietiella furcocerca*. Extremo posterior, apéndices caudales alargados y abertura anal en la bifurcación caudal. 120x. b) Detalle de un gancho posterior, región del cefalotórax. 270x. c) Cefalotórax característico, de contorno redondeado, ganchos en disposición trapezoidal, parapodios cortos. 120x. d) Se observa un gancho anterior y mamelones a cada lado, región del cefalotórax. 180x. Imágenes del autor.

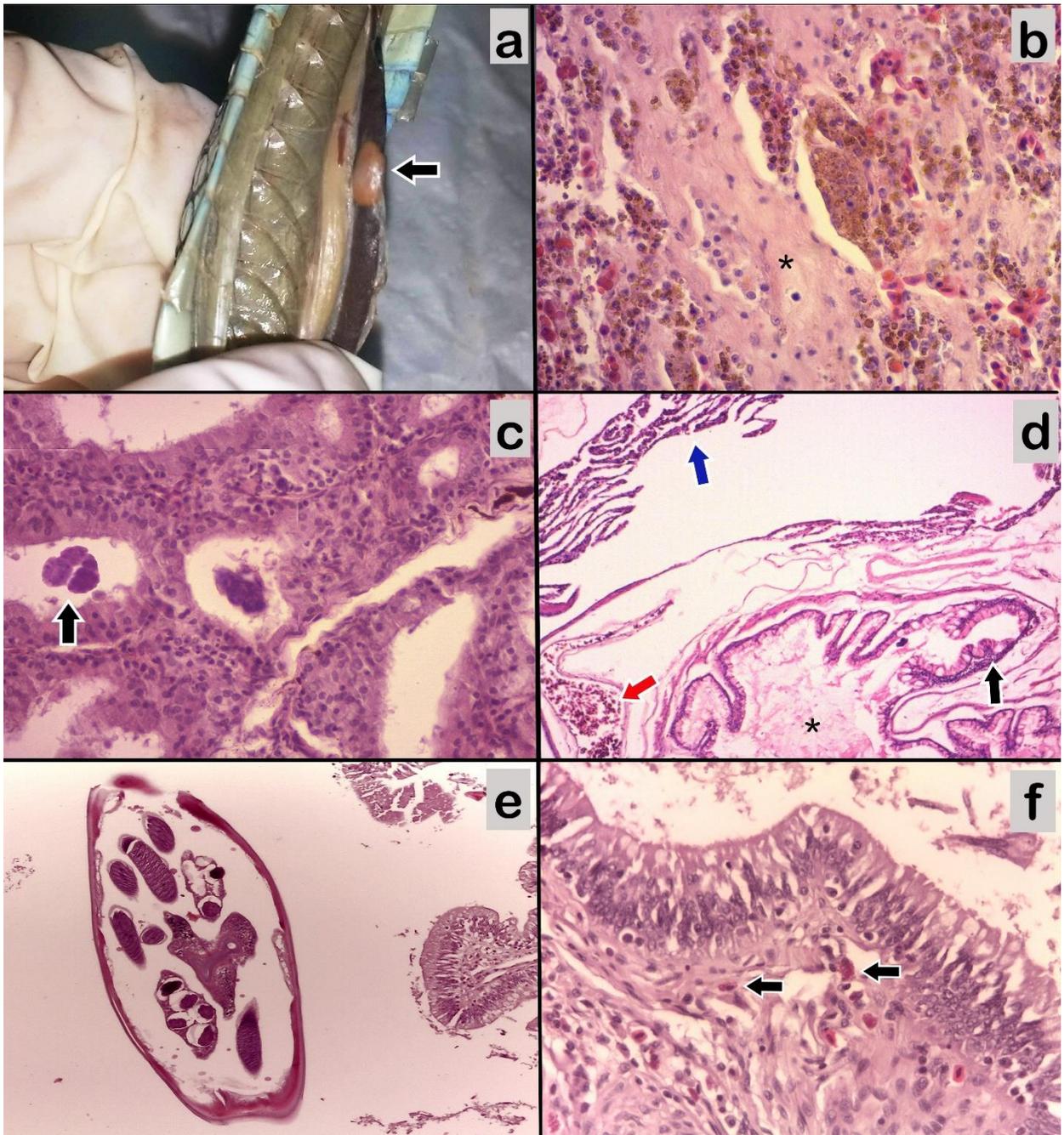
**4.3.4** Código del espécimen: LAM 4-17 - *Leptophis ahaetulla marginatus* (ejemplar macho): ver Tabla 12 y Fotografía 19.

Tabla 12. Hallazgos macroscópicos y microscópicos de LAM 4-17.

Órgano	Hallazgos macroscópicos	Hallazgos microscópicos
Hígado	Se apreció un cambio de coloración en el parénquima hepático, dos regiones de color pardo (color normal: rojo vinoso).	Dilatación y congestión de sinusoides, abundantes depósitos de hemosiderina y degeneración turbia en un gran número de hepatocitos. Amplias zonas de necrosis (que alteraron completamente la estructura hepática), presencia de células gigantes.
Pulmón	No se evidenció ninguna alteración.	Congestión pulmonar, infiltrado inflamatorio abundante en los bronquiolos, edema pulmonar. Alteración en la estructura de los alvéolos compatible con enfisema pulmonar.
Corazón	No se evidenció ninguna alteración.	Se observaron pequeños focos inflamatorios con infiltrado mononuclear.
Intestino	Paredes intestinales delgadas, posible enteritis.	Destrucción y descamación de enterocitos, gran cantidad de eosinófilos en la submucosa, observación de nematodos en la luz intestinal.
Glándula de Duvernoy	No se evidenció ninguna alteración.	En algunas áreas se observó descamación abundante de las células acinares, infiltrado inflamatorio y alteración de la estructura normal de los acinos. Presencia de parásitos (compatibles con nematodos).

A la necropsia se observaron nematodos compatibles con nematodos rabdítidos en la cavidad bucal. Al momento de la muerte presentaba disecdisis y peso inferior al normal.

Causa mortis probable: Posible hepatopatía, neumonitis parasitaria, peso considerablemente inferior al normal.



Fotografía 19. Alteraciones macroscópicas y microscópicas encontradas en espécimen de *Leptophis ahaetulla marginatus* (LAM 4-17). a) Se observa un cambio de coloración en el parénquima hepático (flecha). b) Microfotografía de tejido hepático. Se aprecian amplias zonas de necrosis (asterisco), abundantes depósitos de hemosiderina y degeneración turbia en un gran número de hepatocitos. 1000x. Tinción H-E. c) Microfotografía de glándula de Duvernoy. Se observa infiltrado inflamatorio y presencia de nematodos compatibles con rabdítidos (flecha). 400x. Tinción H-E. d) Microfotografía de pulmón. Se observa congestión pulmonar (flecha roja), infiltrado inflamatorio abundante en los bronquiolos (flecha negra), edema pulmonar (asterisco) y enfisema pulmonar (flecha azul). 100x. Tinción H-E. e) Microfotografía de tejido intestinal. Se observa un nematodo en el lumen del órgano. 1000x. Tinción H-E. f) Microfotografía de tejido intestinal. Se observa abundante descamación y destrucción de enterocitos, y gran número de eosinófilos en la submucosa (flechas). 400x. Tinción H-E. Imágenes del autor.

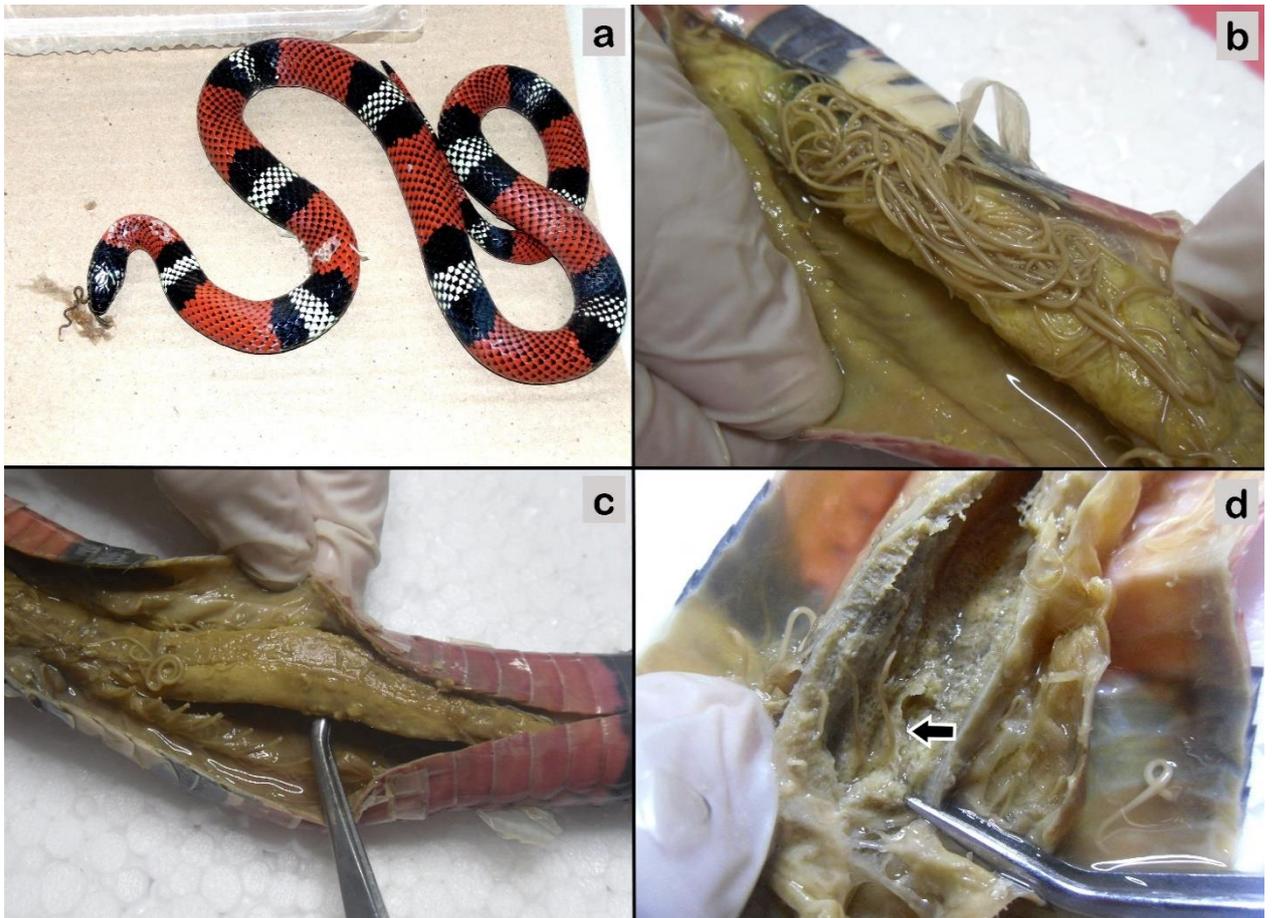
Código del espécimen: 014 - *Erythrolamprus aesculapii* (ejemplar hembra):  
ver tabla 13 y Fotografías 20 y 21.

Tabla 13. Hallazgos macroscópicos y microscópicos de 014.

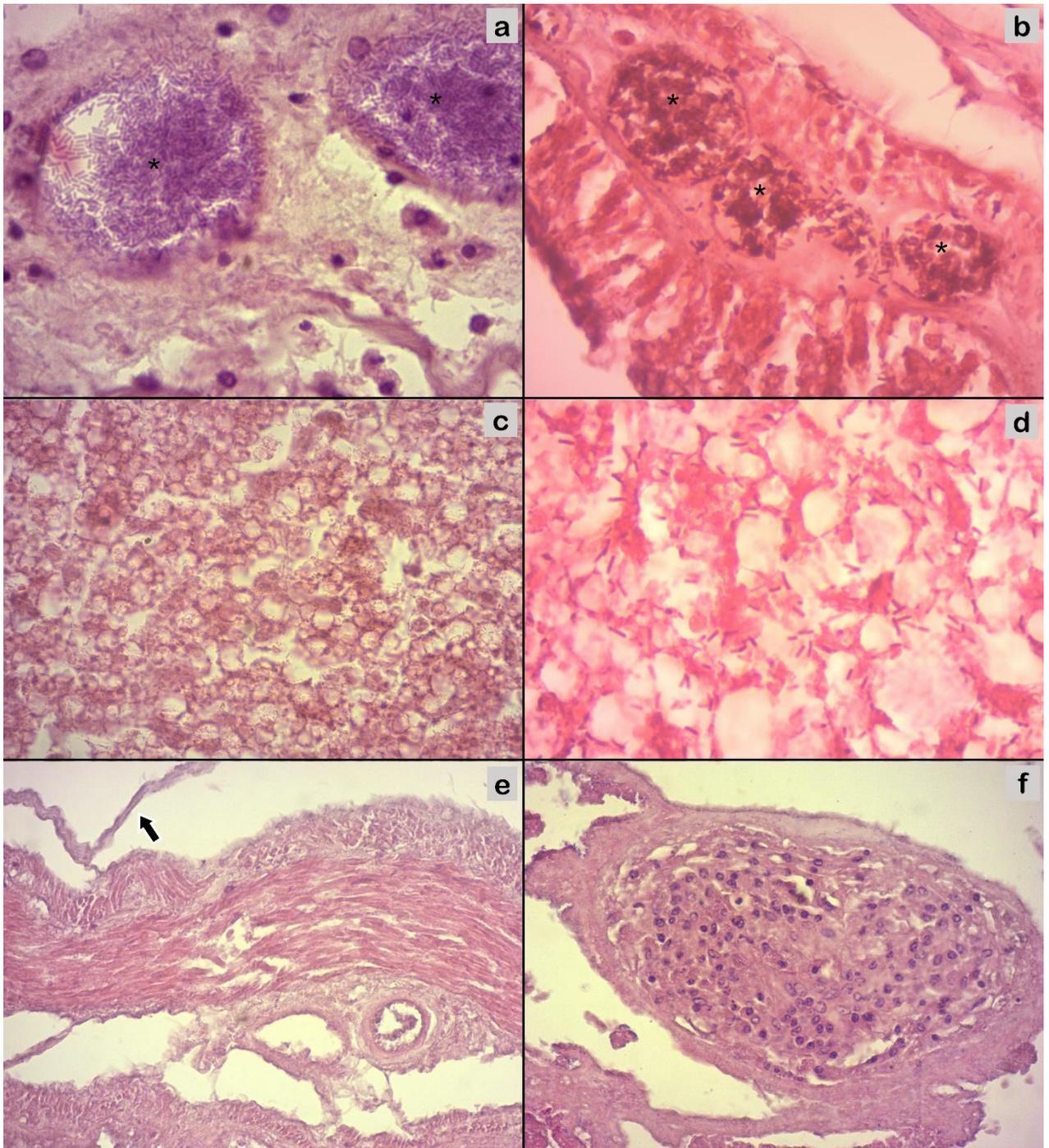
Órgano	<u>Hallazgos macroscópicos</u>	<u>Hallazgos microscópicos</u>
Hígado	Coloración alterada (color pardo), consistencia friable.	Desorganización de lobulillos, intensa vacuolización en los hepatocitos (estas vacuolas alteraron totalmente la estructura hepática normal).
Pulmón	Se observó una gran cantidad de nematodos dentro del pulmón, aspecto compatible con edema pulmonar, consistencia y bordes alterados (posible neumonía).	Neumonía granulomatosa, aumento de la celularidad en los septos interalveolares por células inflamatorias mononucleares, granulomas abundantes con bacilos y células inflamatorias en su interior.
Corazón	Consistencia alterada (friable).	Se observaron pequeños focos inflamatorios con infiltrado mononuclear.
Intestino	Consistencia friable, paredes intestinales delgadas, posible enteritis crónica.	Focos granulomatosos y edema en la submucosa intestinal, acompañado de desprendimiento de mucosa en algunas zonas.

Este ejemplar al morir expulsó nematodos por la cavidad bucal, también presentó disecdisis. Se observó abundante líquido en cavidad celómica y gran cantidad de nematodos en la cavidad celómica (288 especímenes), tejido celular subcutáneo, sistema digestivo (12 especímenes), pulmón (15 especímenes)

Causa mortis probable: Posible neumonía, parasitosis generalizada severa, septicemia y posible hepatopatía.



Fotografía 20. Alteraciones macroscópicas encontradas en espécimen de *Erythrolamprus aesculapii* (014). a) Momento en el que se encontró al ejemplar muerto, observándose la expulsión de nematodos por la cavidad bucal. b) Hallazgo de un gran número de nematodos en cavidad celómica. c) Alteración en la consistencia y la coloración hepática. d) Se observó una gran cantidad de nematodos (flecha) dentro del pulmón, consistencia y bordes pulmonares alterados, compatible con neumonía. Imágenes del autor.

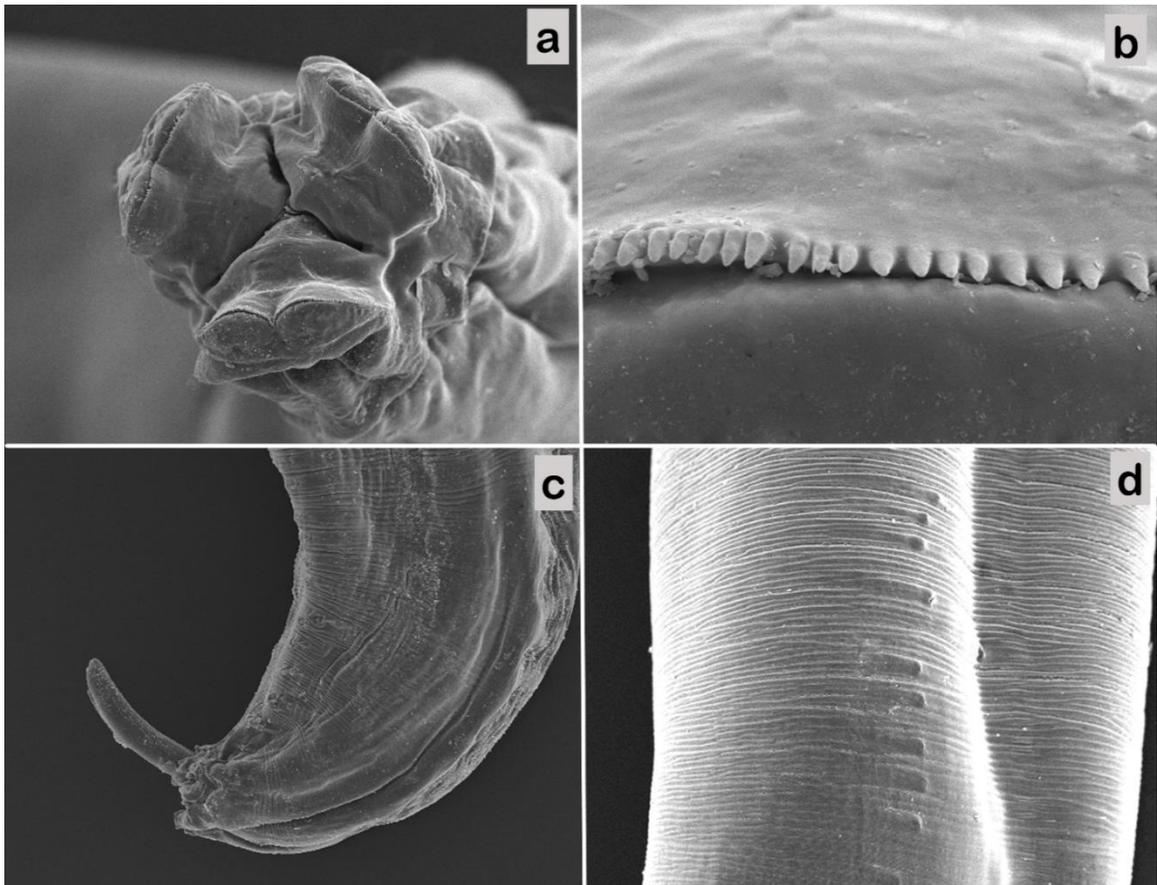


Fotografía 21. Alteraciones microscópicas encontradas en espécimen de *Erythrolamprus aesculapii* (014). a) Microfotografía de pulmón. Se observan granulomas con bacilos en su interior (asteriscos) y algunos monocitos. 100x. Tinción H-E. b) Microfotografía de pulmón. Se observan granulomas con bacilos Gram positivos y células inflamatorias en su interior (asteriscos). Tinción de Gram. 400x. c) Microfotografía de tejido hepático. Se observa desorganización difusa del parénquima e intensa vacuolización. 100x. Tinción H-E. d) Microfotografía de tejido hepático. Se observa intensa vacuolización en los hepatocitos y abundantes bacilos Gram positivos. Tinción de Gram. 400x. e) Microfotografía de tejido intestinal. Se observa edema en la submucosa y desprendimiento de la mucosa intestinal (flecha). Tinción H-E. 100x. f) Microfotografía de tejido intestinal. Se observan granulomas localizados en la submucosa intestinal, con gran número de monocitos en su interior. Tinción H-E. 400x. Imágenes del autor.

### Análisis microbiológicos:

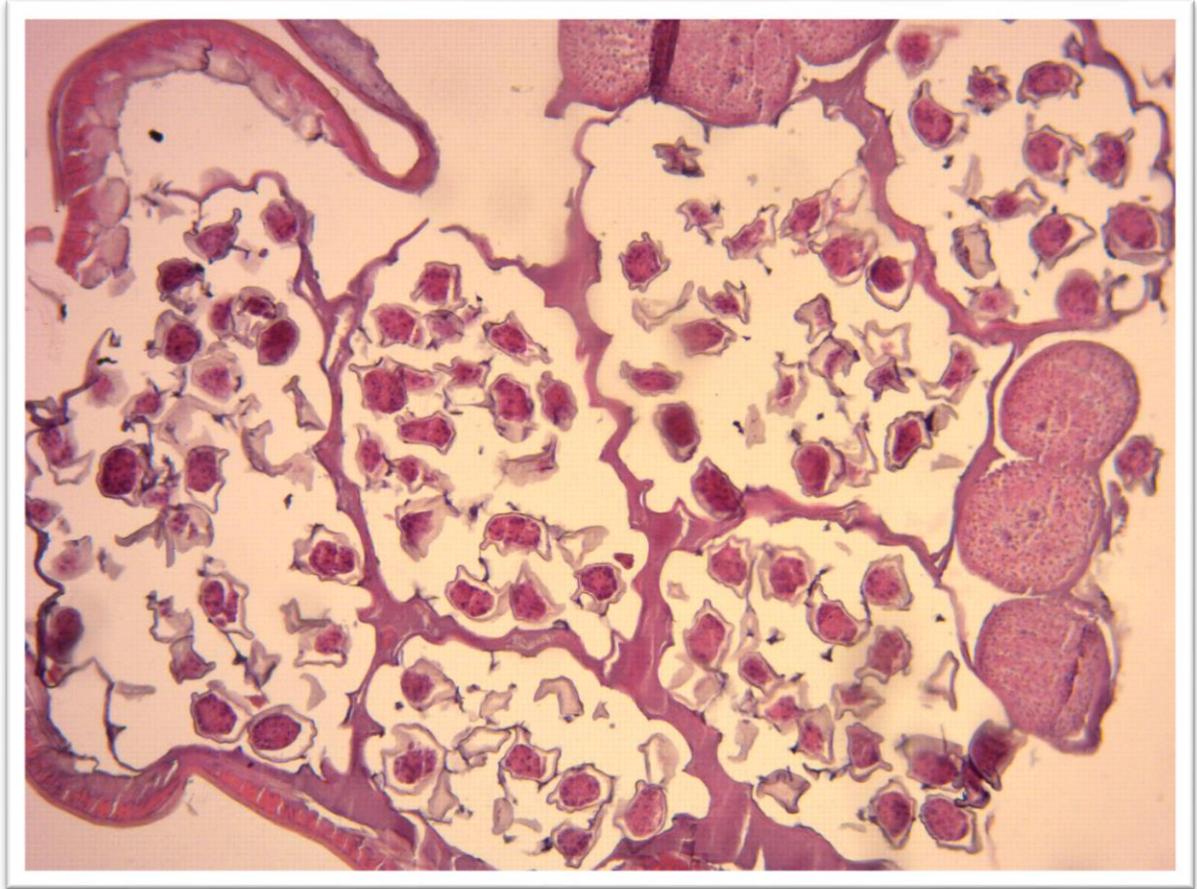
Al realizar la histopatología de las muestras de órganos se constató la presencia de una gran cantidad de bacterias de tipo bacilar, por lo que se procedió a realizar tinción de Gram para su posible identificación; se observaron bacilos cortos, de color violeta, Gram positivos (Fotografía 21). Para confirmar o descartar si eran del género *Mycobacterium* se realizó la tinción de Ziehl Neelsen, resultando ésta negativa. Se concluye que podría tratarse de bacterias del género *Clostridium*, pero esto no pudo confirmarse aislándola para realizar cultivos ya que las muestras ya se encontraban en formol.

Los rhabditidos (colectados de pulmón y algunos de cavidad celómica) y los ascáridos (colectados del sistema digestivo y cavidad celómica) durante la realización de la necropsia se observaron con MEB para determinar características distintivas que contribuyan a la clasificación taxonómica de estos dos tipos de nematodos (Fotografías 22 y 24).

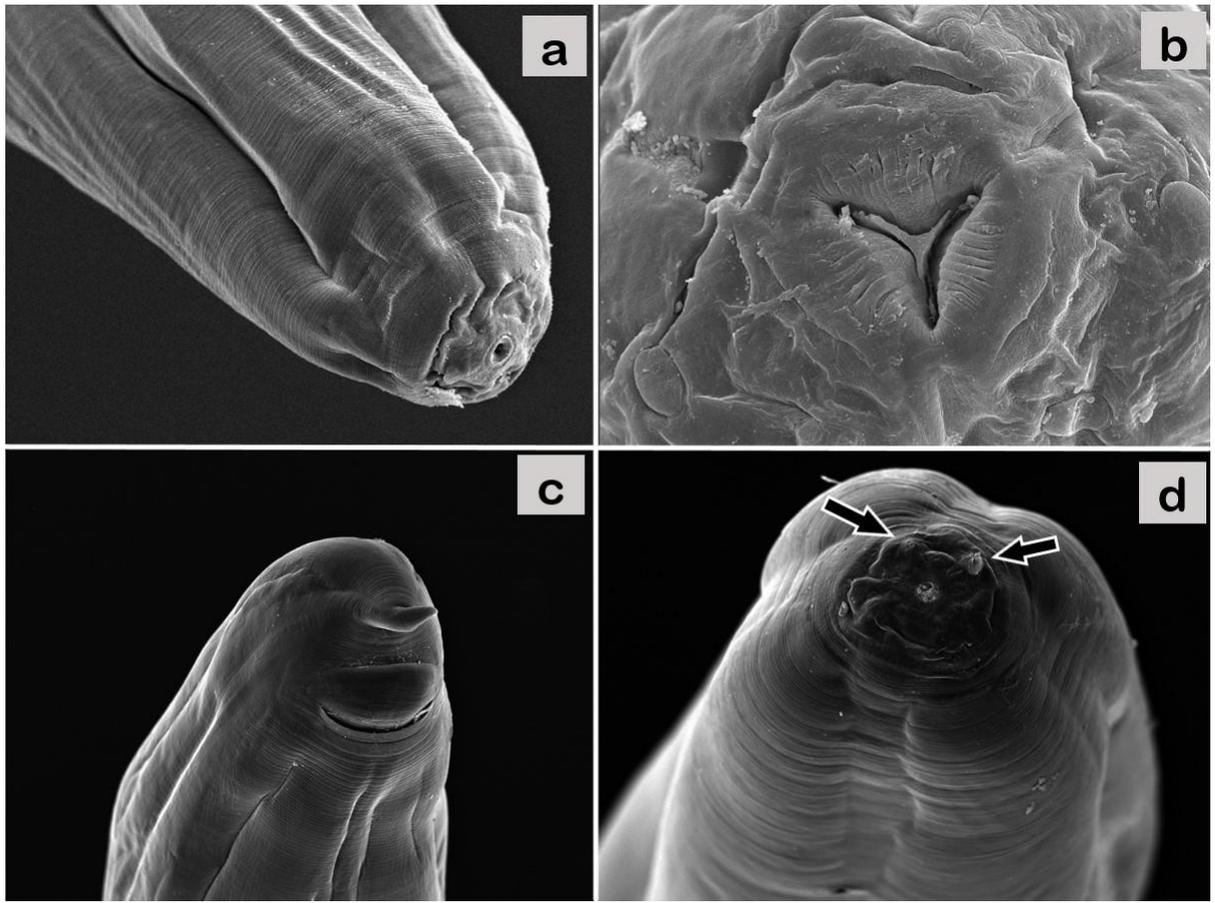


Fotografía 22 – Fotomicrografía por microscopía electrónica de barrido de nematodos de *Erythrolamprus aesculapii* (014). a) Extremo anterior en el que se observan el labio dorsal y los dos ventrolaterales, característicos de los parásitos de la familia Ascarididae. 200x. b) Detalle del borde dentífero presente en el borde anterior cada labio. 3000x. c) Extremo posterior del macho, cónico y curvado. Se observan las espículas iguales. 100x. d) Detalle de algunas papilas pre-caudales. Se observan también las estriaciones transversales de la cutícula. 100x. Imágenes del autor.

Para la identificación de los ascáridos se complementaron los resultados de la observación con MEB (número de papilas pre-caudales, según referencia de Vicente, 1993) con la observación de la microanatomía del nematodo, para lo que se siguió la técnica descrita por Bowman (1984) para el procesamiento de muestras de hembras y posterior tinción con H-E, a fines de observar el número de ramas uterinas (fotografía 23). En base a estos datos se clasificó taxonómicamente como perteneciente al género *Hexametra* especie *boddaertii*, considerando el número de papilas pre-caudales (72) y el número de ramas uterinas (6).



Fotografía 23. Microfotografía de corte transversal de la parte media del cuerpo de un nematodo hembra de *Erythrolamprus aesculapii* (014). Se observan las 6 ramas uterinas características de *Hexametra boddaertii* con huevos en su interior. 400x. Tinción H-E. Imagen del autor.

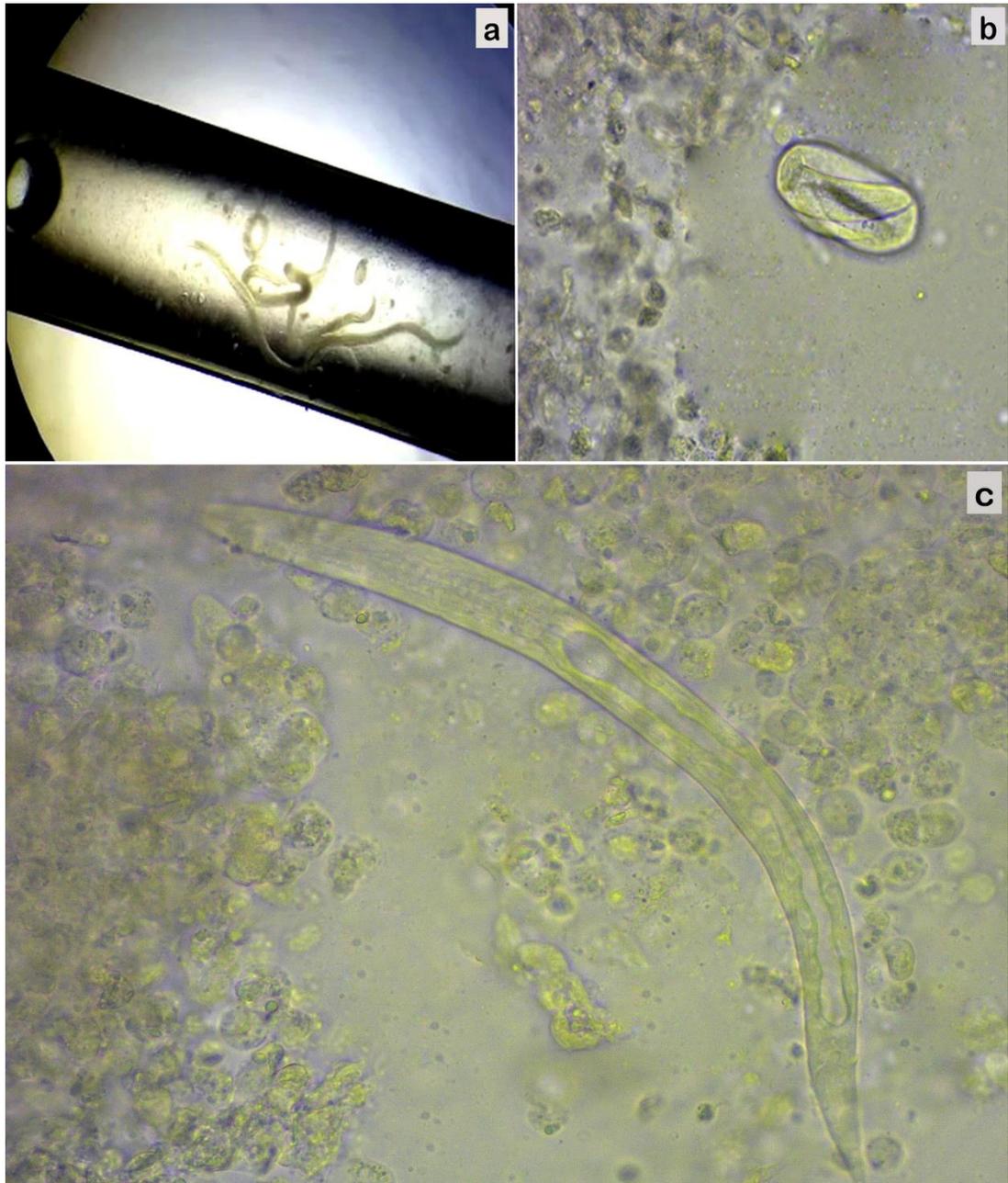


Fotografía 24. Fotomicrografía por microscopía electrónica de barrido de nematodos de *Erythrolamprus aesculapii* (014). Nematodo de la Subclase *Rhabditia*. a) Extremo anterior con cápsula bucal en forma de copa. Se observan estriaciones transversales de la cutícula. 450x. b) Extremo anterior en el que se aprecia la cavidad bucal y el inicio del lumen triangular del esófago. 1000x. c) Extremo caudal cónico y agudo en el que se observa el poro excretor como una hendidura transversal. 300x. d) Extremo anterior del macho en el que se observan la cápsula bucal, los 6 labios inconspicuos y dos papilas cefálicas (flechas). 300x. Imágenes del autor.

#### 4.4 Caracterización de venenos de colúbridos

Es ampliamente conocido que no siempre es posible obtener muestras de veneno de colúbrido en cantidad suficiente para realizar ensayos de caracterización. A esto hay que sumarle las condiciones del estado general de los especímenes, que no siempre es la apropiada para obtener muestras de veneno. Así, en este trabajo solo se consiguieron analizar los venenos de las siguientes especies de colúbridos: *Leptophis ahaetulla marginatus* (Lam), *Philodryas olfersii olfersii* (Poo) y *Philodryas patagoniensis* (Pp). Además, se aclara que solo se consideró la evaluación de venenos obtenidos a partir de especímenes infectados con rabdítidos, por considerar que este parásito

puede llegar a invadir la glándula de Duvernoy (Divers, 2014) y así causar una expresión diferencial del veneno en estos especímenes. De hecho, en algunas ocasiones se observaron larvas de rhabdítidos en el mismo veneno que estaba siendo colectado a partir de algunos especímenes infectados con este parásito (Fotografía 25). Sin embargo, se aclara que estas muestras de veneno intentaron ser descartadas para los análisis siguientes.



Fotografía 25. a) Observación de larvas de rhabdítidos en el veneno (colectado en capilar) de un espécimen de *P. olfersii aestivus* (POL 2-15). 100x. b) y c) Observación de huevos (medida 70 µm) y larvas (de aproximadamente 750 µm) de rhabdítidos en la secreción bucal de un espécimen de *L. ahaetulla marginatus*. 400x.

#### 4.4.1 Perfil proteico

4.4.1.1 Para el análisis de venenos de especímenes de Lam infectados con rabdítidos, primeramente, se realizó una electroforesis SDS-PAGE utilizando gel 15% ya que este veneno está principalmente constituido por componentes de baja masa molecular (Sánchez *et al.*, 2018). A pesar de que no pudo obtenerse una buena resolución de bandas (Figura 4), se evidenció un esbozo de diferencia entre venenos de especímenes infectados con rabdítidos y control.

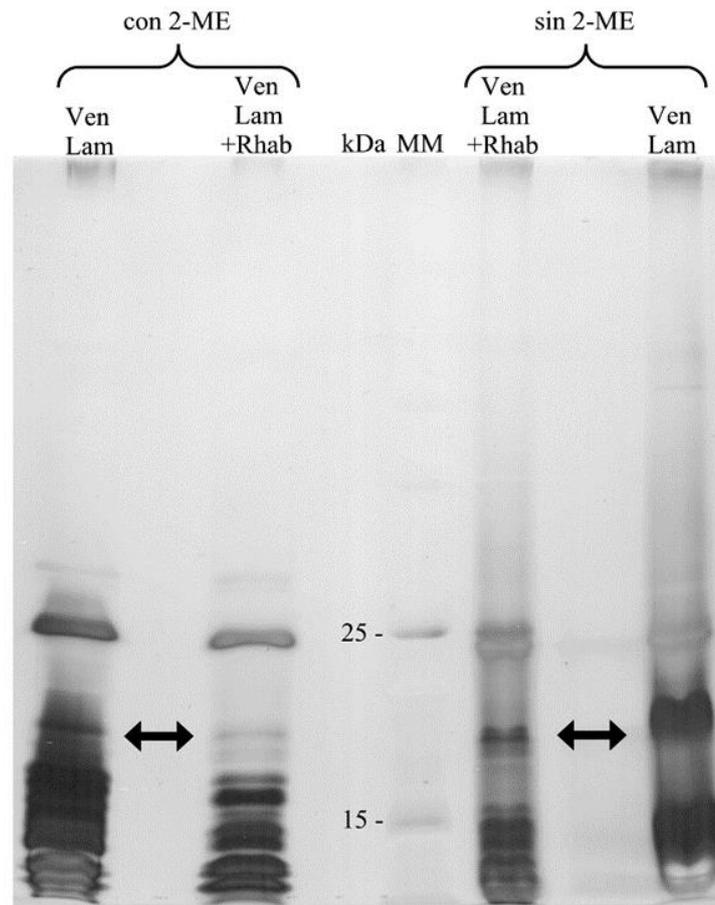


Figura 4. SDS-PAGE, gel 15 %, de venenos (2  $\mu$ g) de especímenes de Lam infectado con rabdítidos y control. Ambos venenos fueron procesados en condiciones reductoras (en la presencia de 2-mercaptoetanol, 2-ME) y no reductoras (en ausencia de 2-ME). El gel se tiñó con nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ). MM: marcadores de masa molecular. La doble flecha está indicando la posición de una banda proteica con expresión aparentemente diferencial en ambos venenos.

Para mejorar la visualización de bandas se procedió a realizar una electroforesis Tricina-SDS-PAGE (Figura 5) en la que se pudo apreciar que aparentemente en los venenos con rabdítidos hay menor cantidad de toxinas conocidas como 3FTxs (siglas de su denominación en inglés: *three-finger*

*toxins*), tanto monomérica como dimérica. Sin embargo, esta hipótesis necesita ser confirmada mediante la utilización de ensayos proteómicos cuantitativos.

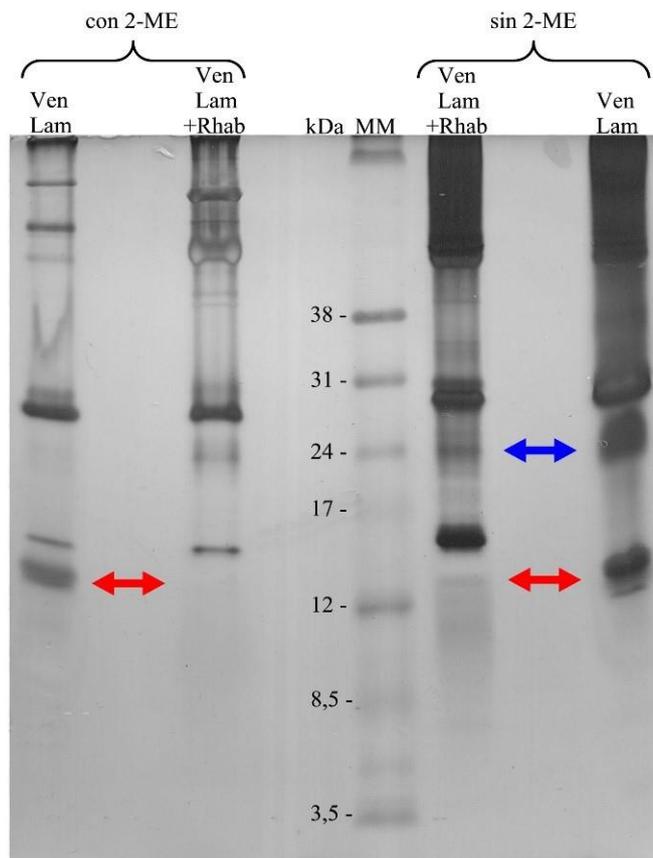


Figura 5. Tricina-SDS-PAGE de venenos (2  $\mu$ g) de espécimen de Lam infectado con rabdítidos y control. Ambos venenos fueron procesados en condiciones reductoras (en la presencia de 2-mercaptoetanol, 2-ME) y no reductoras (en ausencia de 2-ME). El gel se tiñó con  $\text{AgNO}_3$ . MM: marcadores de masa molecular. La doble flecha azul está indicando la posición de una banda proteica con masa molecular en el rango de las 3FTxs diméricas y que muestra una expresión aparentemente diferencial en ambos venenos. La doble flecha roja está indicando la posición de una banda proteica con masa molecular en el rango de las 3FTxs monoméricas y que muestra una expresión aparentemente diferencial en ambos venenos.

**4.4.1.2** Al analizar venenos de Poo con y sin rabdítidos (y en el primer caso pre- y post-tratamiento, realizado con Febendazol 25 mg/kg/7 días PO, 3 aplicaciones), se obtuvieron los perfiles proteicos que se observan en la figura 6.

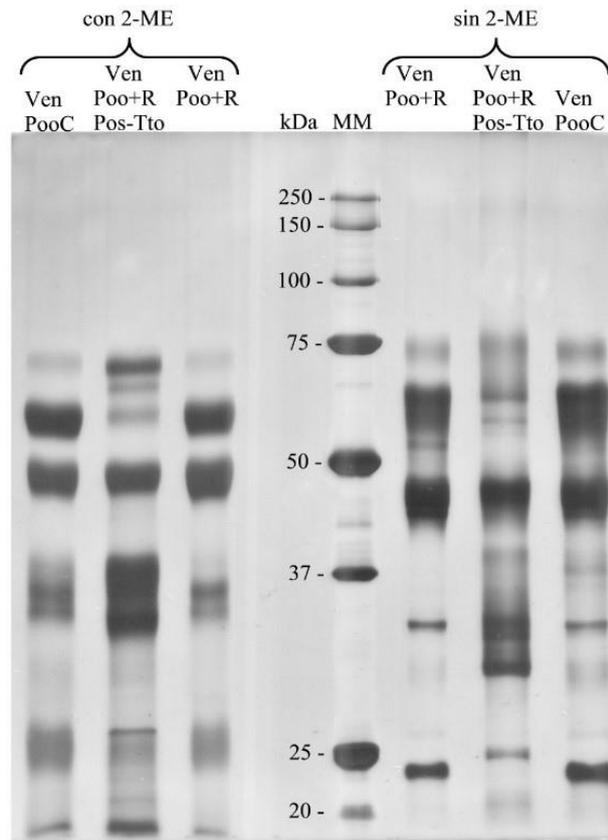


Figura 6. SDS-PAGE, gel 12 %, de venenos (2  $\mu$ g) de espécimen de Poo infectado con rabdítidos (pre- y post-tratamiento) y control. Las tres muestras de venenos fueron procesadas en condiciones reductoras (en la presencia de 2-mercaptoetanol, 2-ME) y no reductoras (en ausencia de 2-ME). El gel se tiñó con  $\text{AgNO}_3$ . MM: marcadores de masa molecular.

Claramente se puede evidenciar un patrón de bandas diferente en la muestra de veneno de Poo con rabdítidos luego del tratamiento correspondiente, lo que estaría indicando que este último y/o la respuesta del organismo al mismo probablemente haya(n) ejercido alguna influencia en la expresión de proteínas.

**4.4.1.3** En relación con el veneno de Pp, el perfil proteico del veneno con rabdítidos solo mostró una banda difusa diferencial en relación con el veneno control (Figura 7). Esta diferencia podría estar relacionada con el hecho de que la extracción de veneno en un espécimen infectado con rabdítidos es más difícil que en un espécimen sano, y por lo tanto en el primer caso se puede considerar que existe un cierto grado de contaminación con saliva y/o exudado inflamatorio.

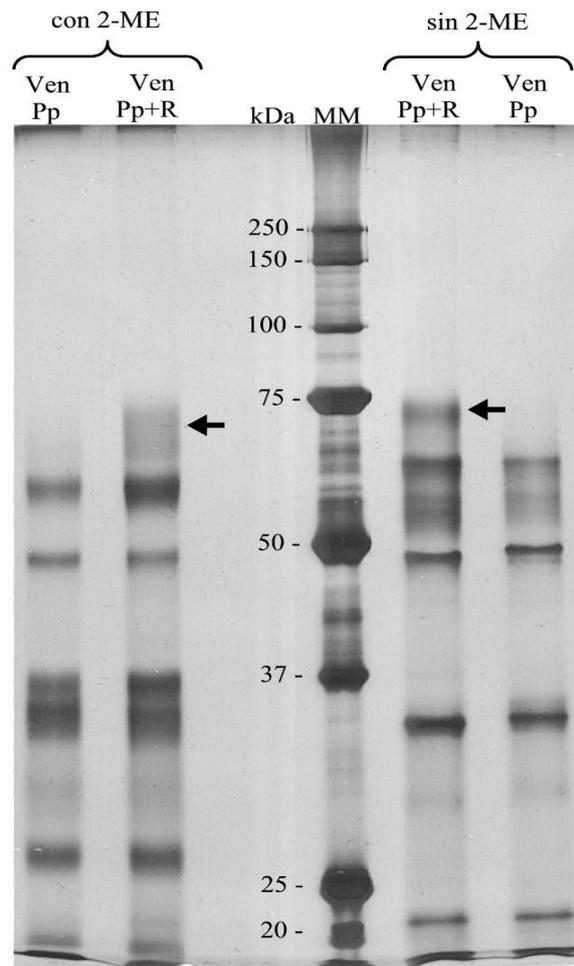


Figura 7. SDS-PAGE, gel 12%, de venenos (2  $\mu$ g) de espécimen de Pp infectado con rabdítidos y control. Ambos venenos fueron procesados en condiciones reductoras (en la presencia de 2-mercaptoetanol, 2-ME) y no reductoras (en ausencia de 2-ME). El gel se tiñó con  $\text{AgNO}_3$ . MM: marcadores de masa molecular. La flecha está indicando la posición de una banda proteica que solo se expresa en el veneno del espécimen infectado con rabdítidos.

#### 4.4.2 Actividad proteolítica

4.4.2.1 Considerando que los venenos de *Philodryas* son altamente proteolíticos, se procedió a realizar el ensayo de actividad azocaseinolítica, no encontrándose diferencia significativa entre las tres muestras de veneno de Poo analizadas (Figura 8).

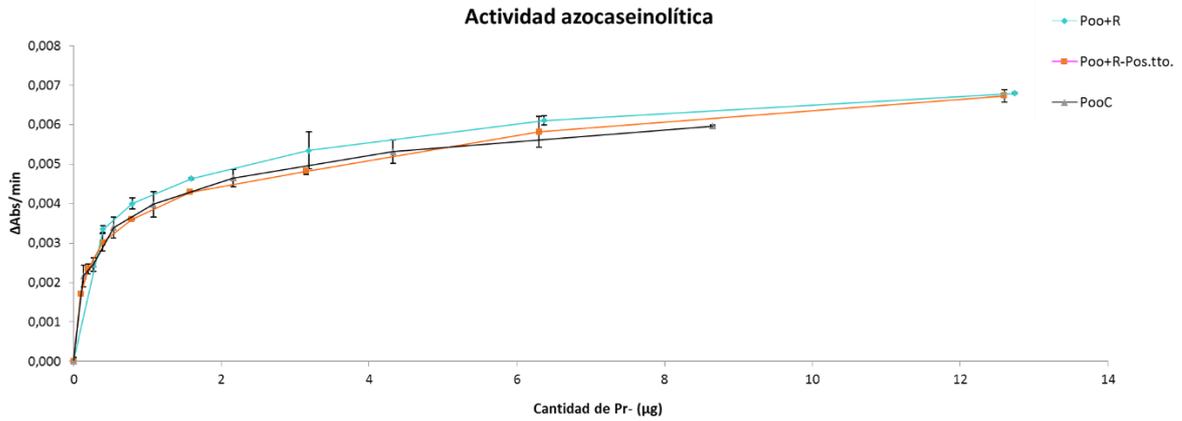


Figura 8. Curva de actividad enzimática en función de la cantidad de veneno de Poo. Cada punto representa la media  $\pm$  DS de 3 determinaciones independientes.  $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ : cambio de absorbancia por minuto a 450 nm. Poo+R: veneno de *P. o. offersii* con rabdítidos; Poo+R-Pos.tto.: veneno de *P. o. offersii* con rabdítidos luego de aplicado el tratamiento; PooC: veneno de *P. o. offersii* control.

**4.4.2.2** También para venenos de especímenes de Pp se evaluó la actividad proteolítica, no encontrándose diferencia significativa en la actividad exhibida por el veneno de espécimen de Pp infectado con rabdítidos en relación con el control (Figura 9).

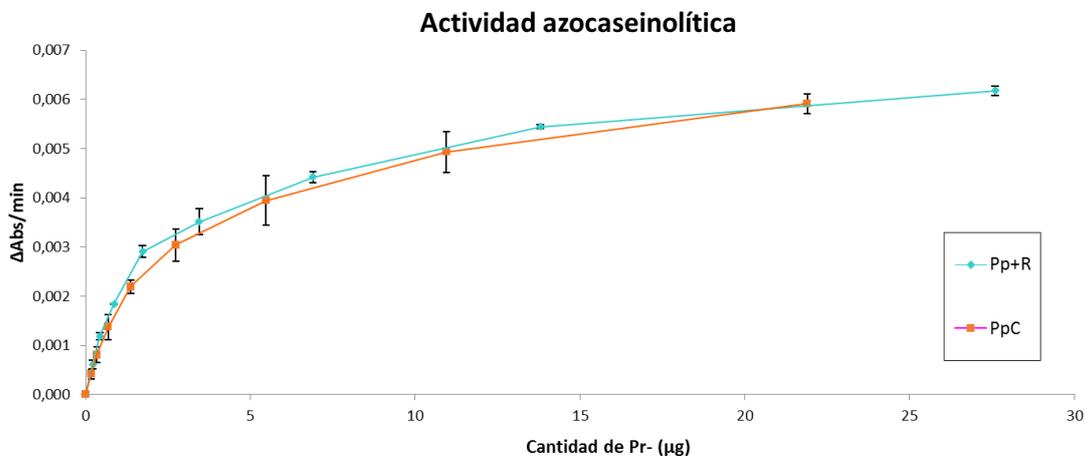


Figura 9. Curva de actividad enzimática en función de la cantidad de veneno de Pp. Cada punto representa la media  $\pm$  DS de 3 determinaciones independientes.  $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ : cambio de absorbancia por minuto a 450 nm. Pp+R: veneno de *P. patagoniensis* con rhabdías; PpC: veneno de *P.* control.

Se aclara que todos estos resultados relacionados con la caracterización de venenos son solo preliminares, y por lo tanto, necesitan ser confirmados llevándose a cabo el análisis con un mayor número de especímenes para la

obtención de muestras de veneno, y considerándose incluir técnicas proteómicas cuantitativas.

## 5 DISCUSIÓN

A pesar de la diversidad de parásitos descritos en ofidios, en la literatura son escasos los estudios sobre las parasitosis que afectan a colúbridos mantenidos en cautiverio, más aún si se considera que existe una gran diversidad de especies de colúbridos distribuidos en todos los continentes excepto Antártida. Así, este estudio viene a contribuir con información relacionada a parasitosis afectando a colúbridos sudamericanos.

En el presente estudio se analizaron un total de 30 ejemplares de colúbridos, reportándose un nivel de infección para endoparásitos del 83% y para ectoparásitos del 3%. Papini, Manetti & Mancianti (2011) realizaron un estudio similar con colúbridos mantenidos en cautiverio y obtuvieron un nivel de infección del 66% para endoparásitos. Este valor inferior al de nuestro trabajo puede estar relacionado con el hecho de que ese estudio fue realizado en Pisa (Italia), donde las condiciones ambientales son menos propicias para el desarrollo y multiplicación de parásitos, con temperatura y humedad bajas en la mayor parte del año y precipitaciones poco abundantes. Asimismo, en un relevamiento realizado por Carvalho (2018) se obtuvo una prevalencia de 12,5% de colúbridos positivos para endoparásitos, lo cual se explica en función de que la región comprendida en el estudio (Lisboa, Portugal) presenta precipitaciones poco abundantes, con humedad muy baja y temperaturas que nunca superan los 30° C. También debe considerarse que en el referido estudio solamente se analizó una muestra de materia fecal de cada ofidio, lo cual reduce la posibilidad de hallar huevos/ooquistes en distintos estadios del ciclo biológico. Por otro lado, Rataj *et al* (2011) evaluaron la helmintofauna de colúbridos mantenidos en cautiverio como mascotas en Eslovenia y obtuvieron un 37,5% de animales con endoparásitos. Es importante considerar que este país presenta una temperatura media anual que no supera los 30° C, humedad baja y precipitaciones constantes pero de bajo volumen en mm, lo cual nuevamente puede explicar la baja tasa de infestación de los animales considerados en el estudio.

En relación con las condiciones de manutención de los ejemplares, en los recintos de la FCV-UNNE se usó aserrín como sustrato para los ofidios, sin embargo, en el INMeT se usó cartón corrugado. Mitchell (2004) y Mader (2006) indican que, si bien el aserrín absorbe muy bien las heces y reduce la humedad del recinto, por ser de madera porosa es más probable que haya contaminación y proliferación bacteriana en este tipo de sustrato. Melgarejo – Giménez (2006) recomienda el uso de cartón corrugado, considerándolo un sustrato económico y menos susceptible a la

contaminación bacteriana. A pesar del diferente tipo de sustrato usado, en ambos serpentarios se constató un nivel de infección por parásitos del 83%, lo cual puede deberse a que las condiciones climáticas de ambos sitios son muy similares y propicias para las infestaciones parasitarias, con elevadas temperaturas durante gran parte del año, abundantes precipitaciones y una humedad relativa ambiente también alta. Con respecto a la frecuencia y al tipo de alimentación, Melgarejo – Giménez (2006) describe que un esquema similar al nuestro da buenos resultados en la práctica.

Entre los métodos disponibles para el diagnóstico de coccidios, pentastómidos y nematodos, fue elegido el método de enriquecimiento por flotación. Klingenberg (2007) define a dicho método como el más adecuado para el diagnóstico de estos endoparásitos, ya que la pequeña cantidad de muestra de heces obtenida de las serpientes hace que otros métodos como el de extendido directo o frotis fecal no den buenos resultados, a menos que la infestación sea muy elevada. Justamente para superar esta limitante de las pequeñas muestras de materia fecal obtenidas de los ofidios y para favorecer el diagnóstico, se realizó un análisis coproparasitológico seriado. En cuanto a los métodos de sedimentación común, Monteiro (2007) recomienda la utilización de solución de acetato de etilo, el cual es inflamable y caro, y la técnica es más extensa; el mismo autor recomienda también la técnica de Hoffmann, Pons & Janer, pero su desventaja es que demanda tiempo, ya que comprende una sedimentación de mínimo 24 horas. Cordero del Campillo (2001) utiliza una técnica de sedimentación común similar a la implementada en este trabajo, con la diferencia que la solución detergente recomendada por el autor es el Tween 80 al 1% en agua destilada. Schapiro (2017) recomienda la utilización de técnicas de sedimentación (común y especial) aplicando las mismas soluciones y métodos enumerados en este trabajo.

Los nematodos son los parásitos más frecuentemente diagnosticados en la clínica diaria de reptiles (Mitchell *et al*, 2009, Brotons & Martínez-Silvestre, 2001, Klingenberg, 2007, Girling, 2004), lo cual coincide con lo hallado en ambos grupos de serpientes, donde se obtuvo un 72% de animales positivos a esta endoparasitosis entre los ofidios mantenidos en la FCV-UNNE y un 83% entre los especímenes del serpentario del INMeT. Carvalho (2018) obtuvo una ocurrencia mucho más baja de nematodos (6%), lo que puede deberse a las condiciones climáticas del lugar donde se realizó el estudio (Lisboa), que son menos propicias para el desarrollo de estos parásitos. Dentro de este grupo, los ascáridos son los de hallazgo más frecuente en

ofidios (Brotons & Martínez-Silvestre, 2001), esto concuerda con los resultados de los análisis coproparasitológicos realizados en el INMeT, donde hallamos una frecuencia del 67%. En el serpentario de la FCV-UNNE el resultado fue diferente, ya que la mayor ocurrencia se obtuvo con nematodos rhabditidos (67%) y la de ascáridos fue más bien baja (22%), lo que se asemeja a lo reportado por Melgarejo-Giménez (2006), quien describió a los rhabditidos como los endoparásitos diagnosticados más asiduamente en serpientes mantenidas en cautiverio. Rom, Kornaś, & Basiaga (2018) hallaron una prevalencia de rhabditidos baja (8%) en una pesquisa realizada con colúbridos mantenidos en cautiverio en un zoológico en Cracovia, Polonia, donde el clima generalmente es frío y seco, con pocas precipitaciones, lo que es menos favorable para la multiplicación de estos nematodos. Okulewicz, Kaźmierczak & Zdrzalik (2014) y Rataj *et al* (2011) afirman que existen pocos registros de diaphanocephalídeos en serpientes, y generalmente la frecuencia es muy baja. En concordancia, en este trabajo estos endoparásitos sólo fueron hallados en los ofidios de la FCV-UNNE, y fue el grupo con prevalencia más baja (17%).

Existe una amplia gama de coccidios que parasitan a los reptiles, la mayoría de ellos no producen ninguna sintomatología o son parasitaciones autolimitantes. No obstante, cuando se dan malas condiciones de manejo, el estrés consiguiente conduce a un estado de inmunodepresión que favorece la proliferación de los parásitos, pudiendo ser necesario el empleo de anticoccidiósicos. Según Jacobson (2007) Regner (2015) y Taylor (2016) los géneros más frecuentes en ofidios son *Isospora* y *Eimeria*, y Barnard (1994) afirma que *Isospora* es el género más común de hallar. En los análisis coproparasitológicos realizados en el desarrollo de este trabajo fueron hallados solamente ooquistes tipo *Eimeria*. No obstante, Regner (2015) y Carvalho (2018) hallaron una ocurrencia muy baja de coccidios en colúbridos mantenidos en cautiverio (3% y 6%, respectivamente), mientras que en este estudio la prevalencia fue del 12 al 25% (variando según la especie de colúbrido).

Según Wagner (2006) y Mustafa (2018) no es común el hallazgo de trematodes en serpientes mantenidas en cautiverio, debido a que estos endoparásitos tienen un ciclo indirecto, empleando normalmente moluscos y anfibios como hospedadores intermediarios. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en este trabajo se consideraron los primeros tres meses de cautiverio de los ejemplares, por lo cual éstos pueden aún contener parásitos de su ambiente natural. Además, hay que destacar que ambos autores aplicaron solamente el método directo de observación

microscópica de materia fecal para evaluación de endoparásitos, lo cual tiene baja sensibilidad para la detección de helmintos de este taxón (Klingenberg, 2007).

Según Paré (2008) las endoparasitosis por pentastómidos son poco frecuentes en colúbridos. Durante el desarrollo de nuestro trabajo hemos observado dos especies de pentastómidos (*Raillietiella furcocerca* y *Cephalobaena tetrapoda*) en colúbridos del género *Philodryas*, coincidiendo con los hallazgos de Christoffersen (2013) y Almeida (2007), quienes relatan la ocurrencia de dichos endoparásitos en *Philodryas* del norte de Argentina y del norte de Brasil, respectivamente. De la misma manera, Fredes y Raffo (2005) hallaron pentastómidos en los pulmones de dos colúbridos del género *Philodryas* de un zoológico de Santiago de Chile. Por otro lado, las lesiones detectadas en parénquima pulmonar de los ejemplares necropsiados de *P. patagoniensis* en este trabajo están en plena concordancia con el hecho de que los pentastómidos adultos – al alimentarse de sangre de los capilares sanguíneos pulmonares – pueden causar un proceso patológico severo que conduce a la muerte del individuo (Paré, 2008).

Jacobson (2007) afirma que los ectoparásitos más comunes en ofidios mantenidos en cautiverio son los ácaros *Ophionyssus natricis*; sin embargo, en la realización de este trabajo estos ácaros no fueron observados en ningún espécimen. Las garrapatas producen dermatitis focales en los puntos donde se anclan al cuerpo de la serpiente, pudiendo ser causa de infecciones cutáneas y abscesos; también pueden ser responsables de procesos de disecdisis. Algunas garrapatas pueden actuar como transmisoras de hemoparásitos y virus, y en parasitaciones masivas pueden dar lugar a una anemia grave. Bowman (2004) afirma que las garrapatas del género *Amblyomma* son comunes en reptiles, con distribución que incluye México, Colombia, Venezuela, Argentina y Brasil. Barbosa *et al* (2006) describen que la localización más frecuente de estos ectoparásitos es entre las escamas de la región dorsal y el tercio anterior del cuerpo de los ofidios; nosotros hemos hallado garrapatas del género *Amblyomma* en colúbridos, en la ubicación antemencionada. Guglielmone (2010) reporta a los colúbridos del género *Philodryas* como huéspedes de *Amblyomma dissimile* y, en concordancia con el autor, el ofidio afectado por esta ectoparasitosis pertenece a dicho género. Se resalta que este trabajo de disertación constituye el primer relato de ectoparasitosis por *Amblyomma dissimile* en un espécimen de *Philodryas patagoniensis*.

En relación con la biodiversidad parasitaria por individuo encontrada en este trabajo, se puede resaltar que las dos especies que presentaron mayor valor

de media (*P. patagoniensis* y *X. merremii*) son de hábitos terrícolas, lo que supone un mayor contacto con especies parasitarias presentes en el suelo que aquellas serpientes que son arborícolas (*L. a. marginatus*, *P. o. aestivus*, *P. o. olfersii*). Klingenberg (2007) afirma que existe una clara relación entre la helmintofauna de los ofidios y sus hábitos en el medio, y Mader (2006) resalta un mayor índice de infestación por endoparásitos en serpientes terrestres, comparada con las acuáticas y arborícolas.

Con respecto a los tratamientos endoparasiticidas, el criterio clínico del médico veterinario ocupa un lugar preponderante, pero deben ser consideradas muchas variables antes de tomar la decisión de aplicarlos. Según Martínez-Silvestre (2007) la presencia de un cierto número de parásitos constante en el aparato digestivo del reptil lo inmunoestimula a fin de permitir mantener el equilibrio parásito-huésped, por lo que si se desparasita totalmente al reptil, y al cabo de un tiempo vuelve a padecer la misma parasitosis, no presentará defensas específicas contra ese tipo de parásitos; además sólo se observan signos clínicos en parasitismos en los que el equilibrio constante entre el organismo invasor y el receptor empieza a romperse (lo que suele ocurrir en condiciones de cautividad). En este caso coincidimos con el autor ya que en reptiles no es factible la aplicación de un tratamiento antiparasitario de rutina, sino que es menester realizar un análisis coproparasitológico completo (mejor aún si es seriado) y una vez obtenido el resultado evaluar la aplicación del tratamiento, dependiendo de la carga parasitaria y del tipo de parásito. Por ejemplo, en el caso de los pentastómidos diversos autores recomiendan no realizar tratamientos ya que suele ser autolimitante (Jacobson, 2007 y Mader, 2006) y este fue el criterio aplicado en el manejo clínico de los ofidios incluidos en este estudio. Sin embargo, durante la realización de este trabajo se produjo la muerte de algunos especímenes parasitados por pentastómidos, por lo que este criterio debería ser evaluado y considerar la aplicación de tratamiento en casos que presenten carga parasitaria alta o muy alta. De la Navarre, 2011 afirma que siempre debe considerarse el estado del animal y la inocuidad del tratamiento, así como la posibilidad de que se produzca una gran respuesta inmune desencadenada por mediadores inflamatorios producidos en respuesta a la muerte de una gran cantidad de parásitos (carga antigénica muy alta), lo que puede llevar a la muerte del animal. Se aclara que el tratamiento no solo incluye la administración de fármacos, sino que también involucra la renovación del sustrato, limpieza y desinfección de los utensilios e implementos utilizados para cada animal, a

finés de eliminar los huevos/ooquistes o fases larvárias que pudieran permanecer en el microambiente de los recintos.

Entre los fármacos que pueden ser empleados para el tratamiento de nematodos, Klingenberg (2007) y Mitchell *et al* (2009) recomiendan el uso de fenbendazol a una dosis de 25-50 mg/kg por vía oral por 3-5 días, repitiendo la dosis 10 días después; Martínez-Silvestre (2007) y Tracchia (2018) sugieren la administración de dosis de 50-100 mg/kg por vía oral y una repetición a los 14 días (los antemencionados autores no consideran las variaciones entre familias de ofidios). Según Mader (2006) y Riera (2008) dichas dosis son aplicables a vipéridos pero no a colúbridos, ya que estos últimos presentan una metabolización y excreción de antiparasitarios más lenta (determinadas mediante estudios farmacocinéticos). Nuestro protocolo fue basado en las referencias de ambos autores (fenbendazol 25 mg/kg/7 días por vía oral, 2-3 aplicaciones) y el resultado obtenido fue satisfactorio, ya que hubo una disminución significativa en el número de huevos en materia fecal, al repetirse los análisis coproparasitológicos 2 a 3 semanas luego del tratamiento.

Para el tratamiento de coccidios fueron utilizados dos fármacos del grupo de las sulfas, Sulfadimetoxina (90 mg/kg/24 hs PO por 3 días) y Sulfametoxazol (25g/1000g, 2 dosis continuadas y 5 dosis día por medio, IM en músculo paravertebral). Frye (2016) recomienda utilizar un tratamiento con esquema similar al aplicado. En el caso de las parasitosis producidas por trematodos, Tracchia (2018) indica la utilización de Praziquantel 5-10 mg/kg con una repetición 2 semanas después, lo que concuerda con la dosis y frecuencia utilizada en las desparasitaciones de los ofidios en estudio. La aplicación de ambos protocolos de desparasitación dio resultados satisfactorios.

El ciclo evolutivo de los nematodos presenta una fase migratoria intraorgánica en la que los estadios larvários se desplazan por diversos órganos del huésped hasta acantonarse en su localización final. Durante esta migración infieren diversas acciones patógenas sobre el hospedero, como acción mecánica (por compresión y obstrucción de vasos y órganos, determinada por el volumen de los parásitos), acción traumática (relacionada con la penetración activa y el tipo de alimentación), acción irritativa (por la fijación y desplazamiento de los parásitos) una acción exfoliadora (por hematofagia, histofagia), la acción tóxica (por metabolitos y sustancias segregadas por los endoparásitos), la acción inoculadora (al vehicular o facilitar la penetración de agentes patógenos) y la acción inductora de modificaciones en los tejidos (metaplasias, hiperplasias) (Cordero del Campillo, 2001). En el ciclo

biológico de los ascáridos, por ejemplo, la migración larval y la penetración de los adultos en la mucosa intestinal pueden llegar a producir enteritis grave con desprendimiento de la mucosa (Klingenberg, 2007 y Taylor, 2016). Uno de los especímenes de este estudio presentó esta lesión, asociada a una alta carga parasitaria del grupo de nematodos antemencionado. Asimismo, en este mismo espécimen se encontraron granulomas en diversos órganos, y es sabido que la formación de granulomas es una de las respuestas inflamatorias más comunes a los endoparásitos (Zimmerman, 2010; Jacobson, 2007).

Desafortunadamente las lesiones sistémicas solo pueden ser observadas luego de realización de una necropsia. Así, esta técnica se aplicó en 5 de los 7 ejemplares que murieron durante la realización de este trabajo. Asimismo, el análisis post-mortem realizado tuvo el objetivo de intentar determinar la *causa mortis* probable. Debido a la limitación de recursos no se realizó el diagnóstico de enfermedades virales o micóticas, pero la diversidad de taxones de parásitos hallada y las lesiones observadas en órganos internos podrían explicar la muerte de la mayoría de los ofidios comprendidos en este trabajo.

En el ciclo biológico de los pentastómidos no ocurre migración larvaria y los adultos permanecen fijos en tráquea y pulmón, alimentándose de sangre, moco y descamaciones epiteliales (Cordero del Campillo, 2001). En dos de los colúbridos diagnosticados con pentastomiasis se observaron áreas de microhemorragias, infiltrado inflamatorio abundante y un gran número de eosinófilos en el parénquima pulmonar. Tracchia (2018) describe dichas lesiones en colúbridos, y las atribuye a la acción mecánica del parásito al utilizar sus ganchos para asirse de los tejidos.

Sottovia-Filho (1974) describió la metacromasia observada en los mastocitos utilizando la tinción de azul de toluidina en muestras de diversos tejidos de varias especies de ofidios, entre ellos la glándula de Duvernoy. De la misma manera, Paniagua *et al.* (2007) detallaron la metacromasia de los gránulos de las células cebadas y resaltan su importancia en la defensa contra infestaciones parasitarias. Este fenómeno de viraje del color se da por el contenido en glucosaminoglucanos sulfatados (principalmente heparina) que presentan los gránulos. La utilización de la antemencionada tinción para identificar mucoproteínas y mucopolisacáridos es bien conocida; Mangione y Moreno (1991) relatan su aplicación en la delimitación de células glandulares mucosas, y Calandro *et al* (2011) en tejidos lesionados, con exudado de tipo mucoso. En la realización de este trabajo se observó metacromasia (azul de toluidina positivo) en la glándula de Duvernoy de un ejemplar de *P.*

*patagoniensis*, lo que indica la presencia de mucina (dada por las células seromucosas de los túbulos secretores, propios de la glándula) y células cebadas.

En la literatura no se encuentran descritas lesiones en la glándula de Duvernoy causadas por la acción parasitaria. En el desarrollo de este trabajo, se realizó el análisis histopatológico de las glándulas de dos colúbridos, detectándose diversas lesiones (hemorragias, desprendimiento del endotelio de algunos vasos, infiltrado inflamatorio), e inclusive en una de ellas se observaron parásitos (compatibles con nematodos, posiblemente rabdítidos) acompañados de una considerable alteración de la estructura normal de la glándula. Según Cordero del Campillo (2001) estas lesiones pueden ser derivadas de los distintos tipos de acción parasitaria, principalmente acción mecánica (determinada por el volumen de los parásitos) y acción inductora de modificaciones en los tejidos. Justamente, debido a la compresión mecánica ejercida sobre las células secretoras de la glándula de Duvernoy es que las mismas pueden disminuir la cantidad de producto (veneno) secretado, así como también puede verse modificado el contenido peptídico/proteico de este producto, tal como fue observado aquí con el veneno de *L. ahaetulla marginatus*. Se resalta que la extracción de veneno en especímenes infectados con rhabdias fue muy difícil en todos los casos, obteniéndose un volumen promedio de 15 µL en ejemplares de *L. ahaetulla marginatus* - inferior a lo reportado por Sánchez et al. (2018) para esta especie -, y 30 µL en ejemplares de *P. patagoniensis* - inferior a lo reportado por Peichoto (2007b) para esta especie -. De todos modos, se hace hincapié que todos estos resultados son preliminares puesto que se necesita contar con un mayor número de muestras (tanto de glándulas como de veneno) para obtener datos conclusivos al respecto de las alteraciones causadas por parásitos sobre la estructura/función del aparato venenoso de especies de colúbridos.

## 6 CONSIDERACIONES FINALES

Para finalizar, se resumen las principales conclusiones del trabajo:

- Los nematodos son los endoparásitos más comúnmente diagnosticados en colúbridos mantenidos en cautiverio en el Nordeste Argentino.
- Se identificaron nuevas especies hospedadoras para *Amblyomma dissimile* y *Hexametra boddaertii* (parásitos con un potencial zoonótico reconocido), lo que debe sumarse al hecho de que actualmente las culebras (por sus colores atractivos) tienen una gran demanda mundial en el mercado ilegal de mascotas.
- Las lesiones y afecciones sistémicas derivadas de las endoparasitosis pueden ser vitales.
- La implementación de planes de tratamiento con endoparasiticidas brinda resultados satisfactorios en especímenes con carga parasitaria media/alta.
- Nematodes rabdítidos son capaces de afectar la estructura de la glándula de Duvernoy, y en algunos casos podría afectar también el producto de su secreción. Para confirmación de alteraciones causadas por parásitos en las características cuali-cuantitativas de fracciones peptídicas/proteicas presentes en el veneno de una especie dada, se recomienda un análisis con un mayor número de especímenes para la obtención de muestras de veneno, así como también incorporar técnicas proteómicas cuantitativas.

### Perspectivas futuras:

- La descripción sobre parasitosis en colúbridos presentada en esta disertación dio apenas sus primeros pasos, con la demostración de los taxones más frecuentemente involucrados, e identificación a nivel de especie solo en algunos casos.
- Existe aún mucho trabajo por hacer, fundamentalmente en lo que respecta al grado de afectación causada por endoparásitos sobre las características cuali-cuantitativas de fracciones peptídicas/proteicas de venenos de colúbridos.
- Se dará continuidad a gran parte del abordaje planteado aquí para brindar garantías sanitarias en ambos serpentarios involucrados en este trabajo y que proveen venenos de colúbridos para fines de investigación, destacándose que

los venenos de colúbridos constituyen una fuente natural de moléculas bioactivas aún poco explorada.

## 7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, O., *et al.* Hemorrhagic activity of the Duvernoy's gland secretion of the xenodontinae colubrid *Philodryas patagoniensis* from the north-east region of Argentina. **Toxicon**. 41 (8): 1007-12. 2003.
- ALMEIDA, W. O. *et al.* Prevalence and intensity of pentastomid infection in two species of snakes from northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*. São Carlos, V. 67, n. 4, p. 759-763. 2007.
- ARAÚJO, M. E., SANTOS, A. C. Cases of human envenoming caused by *Philodryas offersii* and *Philodryas patagoniensis* (Serpentes: Colubridae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 30(6), 517- 519. 1997.
- ARTIGAS, DE TOLEDO, P., PAULINO, R. C. *Zeferinella vazi* n. g. n. sp. (Plagiorchiiidae), parasito da cavidade bucal e esófago de *Erythrolamprus aesculapii* (Serpentes, Colubridae). *Memórias do Instituto Butantan*. Page Range: 63-69. Vol 50, Issue 3. 1988.
- ATANASKOVA, E. *et al.* Endoparasites in wild animals at the zoological garden in Skopje, Macedonia. **Journal of Threatened Taxa**. Skopje, Republic of Macedonia. 3 (7): 1955–1958. Julio 2011.
- BARBOSA, A.R. *et al.* Contribuição ao estudo parasitológico de jibóias, *Boa constrictor constrictor* Linnaeus, 1758, em cativeiro. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.6, n.2, p.1-18, 2006.
- BARNARD, S.M., UPTON, S.J. A veterinary guide to the parasites of reptiles. **Folia Parasitologica**. Malabar, Florida. 41[4] 246. Diciembre 1994.
- BARRELLA, T. H., DOS SANTOS, R. K., DA SILVA, R. *Rhabdias filicaudalis* n. sp. (Nematoda: Rhabdiasidae) from the snake *Spilotes pullatus* (Serpentes: Colubridae) in Brazil. **Journal of helminthology**. 84. 292-6. 2009.
- BARRIGA, O.O. **Las enfermedades parasitarias de los animales domésticos en la América Latina**. 1ª edición. Santiago de Chile, Chile. Editorial Germinal. p 222-225. 2002.
- BAUCHOT, R. **Retrato de las serpientes**. Barcelona. Tusquets editors. 1996.
- BLUM, H., HILDBURG, B., GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins. RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**. 8, p 93-99. 1987.
- BOWMAN, D. D. *Hexametra leidy* sp. n. (Nematoda: Ascarididae) from North American Pit Vipers (Reptilia: Viperidae). **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**. 51(1), pp. 54-61. 1984.
- BOWMAN, D. D. *et al.* Arthropods. In: **Georgi's Parasitología para Veterinarios**. Elsevier España, Octava edición. p. 1-82, 2004.

BRAZ, H.B., ROCHA, M.M.T., FURTADO, M.F.D. Maintaning rear-fanged snakes for venom production: an evaluation of mortality and survival rates for *Philodryas olfersii* and *Philodryas patagoniensis* in captivity. **The journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. São Paulo, Brasil. 18 (2): p 164-172. 2012.

BROTONS, N.J., MARTÍNEZ-SILVESTRE, A. Patología de Reptiles. **Canis et Felis**, Número 49. Febrero 2001.

CADLE, J. E., GREENE, W. Phylogenetic patterns, Biogeography, and the ecological structure of Neotropical snake assemblages. En: Ricklefs, R. E. e Schluter, D. (eds.). **Species Diversity in Ecological Communities: Historical and Geographical Perspectives**. Chicago: Chicago Press. p. 281-293. 1993.

CALANDRO, T.L.L. *et al.* Utilização do teste com o azul de toluidina como método auxiliar no diagnóstico de lesões orais. *Revista Brasileira de Odontologia*. Rio de Janeiro. v. 68, n. 2, p. 196-9. 2011.

CARDOSO, J.L.C., *et al.* **Animais peçonhentos no Brasil**. 2ª edição. Editora Sarvier. São Paulo, Brasil. 2009.

CARREIRA, S., *et al.* **Reptiles de Uruguay**. Montevideo, Uruguay. UR. FC. Sección Zoología Vertebrados. Dpto. de Biología Animal. 639 páginas. ISBN: 9974002842. 2005.

CARRIQUIRIBORDE, M. Enfermedades zoonóticas asociadas a reptiles. **Revista Veterinaria Argentina**. De: Temas de zoonosis IV, Editorial Asociación Argentina de Zoonosis. Buenos Aires, Argentina. Número 48. p 1-6. 2010.

CARVALHO, T. G. F. Parasitas gastrointestinais em répteis de uma coleção comercial. Dissertação de mestrado integrado em medicina veterinária. Universidade de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária. 2018.

CEI, J. M. Reptiles del noroeste, nordeste y este de la Argentina. Herpetofauna de las selvas subtropicales, Puna y Pampas. **Museo Regionale di Scienze Naturali, Torino, Italia**. Monografía 14. 949 pp. + 126 lám. 1993.

CHRISTOFFERSEN, M.L., DE ASSIS, J.E. A systematic monograph of the Recent *Pentastomida*, with a compilation of their hosts. **Zoologische Mededelingen**. Leiden 87 (1), 1-206 figs 1-4 - ISSN0024-0672, ISBN 978-90-6519-004-8. 2013.

CORDERO DEL CAMPILLO M., ROJO VÁZQUEZ, F. A. **Parasitología Veterinaria**. Primera edición. Editora McGraw-Hill Interamericana de España. 2001.

CORREIA, J.M. *et al.* Poisoning due to *Philodryas olfersii* (Lichtenstein, 1823) attended at Restauração Hospital in Recife, State of Pernambuco, Brazil: case report. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 3, p. 336-338, 2010.

DE LA NAVARRE, B. Common parasitic diseases of reptiles & amphibians. **DVM-Proceedings**. 2011.

DIVERS, S. J. **Exotic Animal Practice: Basic reptile husbandry, history taking and clinical examination**. In Practice magazine. Reino Unido. Pág 58-63. 1996.

DIVERS, S.J. Animais exóticos e de laboratório. In: **Manual Merck de Veterinária**. Décima Edição. Editora Roca. São Paulo. 2014.

FERLAN, I., *et al.* Preliminary studies on the venom of the colubrid snake *Rhabdophis subminiatus* (red-necked keelback). **Toxicon**. 21, p 570-574. 1983.

FLORES-VILLELA, O.; CANSECO-MÁRQUEZ, L. **Revista Biodiversidad de la Faja Volcánica Transmexicana**. Páginas 407-420. Editor CONABIO/UNAM, México. 2007.

FOWLER, M.E. **Zoo & wild animal medicine**. 2nd ed. Philadelphia. Editorial WB Saunders Company. p. 34-35. 2012.

FREDES, F., RAFFO, E. Hallazgo de *Raillietiella* sp. en culebra chilena de cola larga (*Philodryas chamissonis*) de un Zoológico de la Región Metropolitana. **Parasitología Latinoamericana**, Santiago, v. 60, n. 3-4, p. 189-191, 2005.

FRYE, F. L. **Reptile care: an atlas of diseases and treatments**. Neptune City: T. F. H. Publications. p.209-24. 1991.

FRYE, F.L. **Reptiles and amphibians: Self assesment color review**. Second edition. CRC Press. 2016.

GIRAUDO A.R. **Serpientes de la selva paranaense y del Chaco húmedo**. 2° ed. Buenos Aires, Argentina: Ed. LOLA. 328 p. 2004.

GIRAUDO, A.R., *et al.* Serpientes venenosas de Santa Fe, Argentina: conocimientos sobre su historia natural aplicados para la prevención de ofidismo. **Revista FABICIB**. 12: 69-89. 2008.

GIRAUDO, A.R., *et al.* **La problemática del ofidismo en la Región Nordeste de Argentina: Una mirada científica integradora**. 1ª edición. Puerto Iguazú, Misiones. Ministerio de Salud de la Nación. Instituto Nacional de Medicina Tropical. 2014.

GIRLING, S. J., RAITI, P. **BSAVA Manual of Reptiles**. Segunda edición. Quedgeley, Inglaterra. British Small Animal Veterinary Association. 2004.

GUGLIELMONE, A. A., NAVA, S. Hosts of *Amblyomma dissimile* Koch, 1844 and *Amblyomma rotundatum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Zootaxa** 2541: 27–49. 2010.

HEYMONS, R; H. Graf Vitzthum. BeitrÄge zur Systematik der Pentastomiden. **Parasitology research**. Volume 8, Number 1, Page 1. 1935.

JACOBSON, E. R. **Infectious diseases and pathology of reptiles**. Color Atlas and Text. 1ª ed. p 219-256; 581-589; 593-596. Gainesville, Florida. Editora Taylor & Francis Group. 2007.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L., *et al.* Colubrid venom composition: an -omics perspective. **Toxins (Basel)** 8, 230. <https://doi.org/10.3390/toxins8080230>. 2016.

KLINGENBERG, R.J. **Understanding reptile parasites: a basic manual for herpetoculturists & veterinarians**. Lakeside, California, USA. Advanced Vivarium Systems. 2007.

KUCH, U., JESBERGER, U. Human envenomation from the bite of the South American colubrid snake species *Philodryas baroni*. Berg, 1895. **The snake**, 25, 63-65. 1993.

LAEMMLI, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. UK. 227, p 680-685. 1970.

LAINSON, R., NASCIMENTO, F., SHAW, J. J. Some new species of *Caryospora* (Apicomplexa: Eimeriidae) from Brazilian snakes, and a re-description of *C. jararacae* (Carini, 1939). **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 3, p. 349-364. 1991.

LENIS, C., ARREDONDO, J., IGNACIO CALLE, J. *Ochetosoma heterocoelium* (Digenea: Plagiorchiidae) en ofidios de Colombia. **Revista Mexicana de Biodiversidad**. 80. 603-609. 2009.

MADER, D. R. **Reptile Medicine and Surgery**. Segunda edición. Canadá. Editora Elsevier Inc. 2006.

MADER, D.R., DIVERS, S.J. **Current therapy in reptil medicine & surgery**. Primera edición. Canadá. Editora Elsevier Inc. 2014.

MANGIONE, S., MORENO, A. Estudio Histomorfológico e Histoquímica de las mucinas de lengua de *Leptodactylus chaquensis* (Anura: Leptodactylidae). *Acta Zoológica Lilloana*. XL, 1. 1991.

MARTÍNEZ-SILVESTRE, A., *et al.* Patología de reptiles. **Revista Canis et felis**. España. N° 49. Pág 21-70. 2001.

MARTÍNEZ-SILVESTRE, A. Parásitos digestivos en reptiles. **Revista Argos, Informativo Veterinario**. España. N° 88. Pág 48-50. 2007.

MCFARLEN, J. Commonly occurring reptilian intestinal parasites. **Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians**. Calgary, Canada, pp. 120-127, 1991.

MELGAREJO-GIMÉNEZ, A. R. Criação e manejo de serpentes. In: Andrade, A; Pinto, SC; Oliveira, RS. (Org.). **Animais de laboratório criação e experimentação**. v. 1, p. 175-199. 1ª edição. Rio de Janeiro, Brasil. Editora Fiocruz, 2006.

MENEGUCCI, R. C. *et al.* Envenomation by an opisthoglyphous snake, *Erythrolamprus aesculapii* (Dipsadidae), in southeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, e20190055. 2019.

MITCHELL, M.A. Snake care and husbandry. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**. (7): 421-6. 2004.

MITCHELL, M. A., THOMAS N. T. Jr. **Manual of Exotic Pet Practice**. Saunders Elsevier, 152– 155. 2009.

MONTEIRO, S.G. **Parasitologia Veterinária**. Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul. 2007.

MUSTAFA, S. *et al.* Study on internal parasites in snakes grown in domestic conditions. 3. 55-60. 2018.

NASCIMENTO, K. K. *et al.* Tick fauna of wild animals received and attended at the Santarém Zoological Park, western Pará State, Brazil. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 47, n. 10, e20170159, 2017.

OKULEWICZ, A. KAŹMIERCZAK, M. & ZDRZALIK, K. Endoparasites of exotic snakes (Ophidia). **Helminthologia**. 51. 31-36. 2014.

PANIAGUA, R., *et al.* **Citología e histología vegetal y animal**. Cuarta edición. España. Editora Mcgraw-Hill – Interamericana. 2007.

PAPINI, R., MANETTI, C., MANCIANTI, F. Coprological survey in pet reptiles in Italy. **Veterinary Record** 169, 207. 2011.

PARÉ, A. J. An Overview of Pentastomiasis in Reptiles and Other Vertebrates. **Journal of Exotic Pet Medicine**. 17. 285-294. 2008.

PARKER, H. W., GRANDISON, A. G. C. Snakes - a natural history. **British Museum (Natural History) & Cornell University Press**. Londres, Inglaterra. 108 pp, 16 pls. 1977.

PEICHOTO, M.E., *et al.* Duvernoy's gland secretion of *Philodryas patagoniensis* from the northeast of Argentina: its effects on blood coagulation. **Toxicon**. Amsterdam, Netherlands. 45(4): p 527-534. 2005.

PEICHOTO, M.E., *et al.* Systemic pathological alterations caused by *Philodryas patagoniensis* colubrid snake venom in rats. **Toxicon**. Amsterdam, Netherlands. 48: p 520-528. 2006.

PEICHOTO, M.E.; CÉSPEDez, J.A.; PASCUAL, J.Á. Report of a bite by the South American colubrid snake *Philodryas olfersii latirostris* (Squamata: Colubridae). **Acta Herpetologica**, v. 2, n. 1, p. 11-15, 2007a.

PEICHOTO, M. E. Caracterización y aislamiento de proteínas del veneno de *Philodryas patagoniensis* que habita la región nordeste de Argentina. Tesis de Doctorado, 187 pp., Universidad Nacional de Buenos Aires, Buenos Aires. 2007b.

PEICHOTO, M.E. Composición de venenos de serpientes del nordeste argentino: visión general, aportes actuales y perspectivas futuras en investigación biomédica. In: **La problemática del ofidismo en la Región Nordeste de Argentina: Una mirada científica integradora**. 1ª edición. Puerto Iguazú, Misiones. Ministerio de Salud de la Nación. Instituto Nacional de Medicina Tropical. 2014.

PEICHOTO, M. E. *et al.* First report of parasitism by *Hexametra boddaertii* (Nematoda: Ascaridae) in *Oxyrhopus guibei* (Serpentes: Colubridae). **Veterinary Parasitology**. 224. 10.1016. 2016.

PROPHET, E., *et al.* **Métodos histotecnológicos**. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América, Washington DC, Registro de Patología de los Estados Unidos de América (ARP) e Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP). 1995.

PUORTO, G., FRANÇA, F. O. S. Serpentes não peçonhentas e aspectos clínicos dos acidentes. In J. L. C. Cardoso, F. O. S. França, H. W. Fan, C. M. S. Málaque & V. Haddad Jr. (Ed.). **Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. (2. ed., pp. 125-131). São Paulo: Sarvier. 2009.

QUIROZ, H. **Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos**. México D.F. Editorial Limusa. 2005.

RATAJ, A., *et al.* Parasites in pet reptiles. **Acta Vet Scand**, 53(1), 33. 2011.

REGNER, P., *et al.* Estudio retrospectivo de endoparásitos en reptiles mantenidos en cautiverio en la argentina. Presentación en el **Congreso Nacional AVEACA** (Asociación de Veterinarios Especializados en Animales de Compañía de Argentina). Buenos Aires, Argentina. 2015.

REGO, A., A. Pentastomídeos de répteis do Brasil: revisão dos Cephalobaenidae. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, Brasil. v. 78, n. 4, p. 399-411. 1983.

RIERA, A., CABRERO, M. Manejo y tratamiento de los animales exóticos. Segunda edición. 120 pág. Ediciones Mayo, Barcelona. 2008.

ROBINSON, L.E. The genus *Amblyomma*. In: G.H.F. Nuttall, C. Warburton, L. E. Robinson. Ticks: a monograph of the *Ixodoidea* Part IV. London. **Cambridge University Press**. p.1-302. 163-167. 1926.

ROCA, V. Aproximación al conocimiento de la fauna de parásitos intestinales de *Gallotia bravoana*. **Boletín de la Asociación Herpetológica Española**. Valencia, España. 2012.

ROCHA, M. M. T. DA; FURTADO, M. D. F. D. Análise das atividades biológicas dos venenos de *Philodryas olfersii* (Lichtenstein) e *P. patagoniensis* (Girard) (Serpentes, Colubridae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 24, n. 2, p. 410–418, 2007.

RODRÍGUEZ, C., VARELA, N. Guía para el manejo y cuidado de ofidios en cautiverio. Asociación de Veterinarios de Vida Silvestre (VVS). **Memorias de la Conferencia Interna en Medicina y Aprovechamiento de Fauna Silvestre, Exótica y no Convencional**. P 38-48. 2014.

ROM, B., KORNAŚ, S., & BASIAGA, M. Endoparasites of pet reptiles based on coproscopic methods. **Annals of parasitology**, 64 2, 115-120. 2018.

SALOMÃO, M.G., DI BERNARDO, M. *Philodryas olfersii*: uma cobra comum que mata. Caso registrado na área da 8ª Delegacia Regional de Saúde. **Arquivos da Sociedade de Zoológicos do Brasil** (14-16): 21. 1995.

SÁNCHEZ, M.N., *et al.* Biochemical and biological analysis of *Philodryas baroni* (Baron's Green Racer; Dipsadidae) venom: Relevance to the findings of human risk assessment. **Human & Experimental Toxicology**, 33(1), 22–31. 2014.

SÁNCHEZ, M.N., *et al.* Assessment of the potential toxicological hazard of the Green Parrot Snake (*Leptophis ahaetulla marginatus*): Characterization of its venom and venom-delivery system. **Toxicon**. Jun 15;148: 202-212. 2018.

SANTOS, B.F. Macro e Microambientes. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS, editores. **Animais de laboratório**. p. 55-8. Rio de Janeiro, Brasil. Editora Fiocruz. 2006.

SCHÄGGER, H., VON JAGOW, G., Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical biochemistry**. 166, 368-379. 1987.

SCHAPIRO, J.H. **Métodos de diagnóstico en parasitología**. Universidad del Salvador, Argentina. 2017.

SERAPICOS, E. DE O.; MERUSSE, J. L. B. Variação de peso e sobrevivência de *Micrurus corallinus* sob diferentes condições de alimentação em biotério (*Serpentes, Elapidae*). **Iheringia, série Zologia**. V. 92, n 4, p. 105-109. Porto Alegre, Brasil. 2002.

SERAPICOS, E. DE O.; MERUSSE, J. L. B. Morfologia e histoquímica das glândulas de Duvernoy e supralabial de seis espécies de colubrídeos opistoglifodontes (serpentes, Colubridae). **Papéis Avulsos de Zoologia**. São Paulo, Brasil. v. 46, n. 15, p. 187-195, 2006.

SILVA, R. J. *et al.* The detection of *Ochetosoma heterocoelium* (travassos, 1921) (Trematoda: Digenea: Ochetosomatidae) in *Chironius exoletus* (Linnaeus, 1758) (Ophidia: Colubridae). **Journal of Venomous Animals and Toxins**. Botucatu. V. 5, n. 1, p. 85-90. 1999.

SILVA, R. J. *et al.* Report on the occurrence of *Haplometroides buccicola* (Trematoda, Digenea, Plagiorchiidae) infecting *Phalotris lativittatus* (Serpentes, Colubridae) in Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**. 11: 372–378. 2005.

SILVA, R.J., FERREIRA, V.L., STRUSSMANN, C. New species of *Haplometroides* (Digenea, Plagiorchiidae) from *Phalotris nasutus* (Gomes, 1915) (Serpentes, Colubridae). **Journal of Parasitology**. (In Press). 2007.

SOLÓRZANO, A. **Serpientes de Costa Rica: Distribución, Taxonomía e Historia Natural**/Snakes of Costa Rica: Distribution, Taxonomy, and Natural History. Santo Domingo de Heredia, Costa Rica. Editorial INBio. 2004.

SOTTOVIA-FILHO, D. Morphology and histochemistry of the mast cells of snakes. **Journal of Morphology**. 142: 109-116. 1974.

SOUZA, V.L., *et al.* Caracterização dos répteis descartados por mantenedores particulares e entregues ao Centro de Conservação e Manejo de Répteis e Anfíbios – RAN. **Revista de Biologia Neotropical**. 4, 149–160. 2007.

TAUB, A.M. Comparative histological studies on Duvernoy's gland of colubrid snakes. **Bulletin AMNH**. 138: 1-50. 1967.

TAYLOR, M. A., COOP, R. L., WALL, R. L. **Veterinary Parasitology** (4<sup>a</sup> Ed.). Chichester: Wiley Blackwell. 2016.

THAWAIT, V., MAITI, S., DIXIT, A. Prevalence of gastro-intestinal parasites in captive wild animals of Nandan Van Zoo, Raipur, Chhattisgarh. **Veterinary World**. 7(7): 448-451. 2014.

TRACCHIA, A.C. **Medicina en quelonios y otros reptiles**. Primera edición ampliada. – Universidad Maimónides; Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Ediciones Fundación Azara. 504 p. 2018.

UETZ, P., JIRÍ, H, PYRON, R.A. The Reptile Database. [http://reptile-database.reptarium.cz/advanced\\_search?taxon=Colubridae&submit=Search](http://reptile-database.reptarium.cz/advanced_search?taxon=Colubridae&submit=Search)

VARELA, N. Evaluación clínica de reptiles. **Boletín Grupo de Estudio de Animales Silvestres**. Volume III. p 1-11. 2002.

VICENTE, J. J. *et al.* Nematóides do Brasil. Parte III: Nematóides de répteis. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.10, p. 19-168, 1993.

VITT, L. J.; CALDWELL, J. P. Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles. Fourth Edition. Academic Press, 776 pp. 2014.

WAGNER, D. **Boas (A complete pet owner's manual)**. Barron's Educational Series, Inc., Second edition, 45–49. 2006.

WANG, W.J., HUANG, T.F., Purification and characterization of a novel metalloproteinase, acurhagin, from *Agkistrodon acutus* venom. **Thromb Haemost**. 87, p 641-650. 2002.

WEINSTEIN, S.A., *et al.* **Venomous Bites from Non-venomous Snakes: a Critical Analysis of Risk and Management of “Colubrid” Snake Bites**. Elsevier Science, UK. 2011.

WEINSTEIN, S.A., *et al.* Non-front-fanged colubroid snakes: a current evidence-based analysis of medical significance. **Toxicon**. Amsterdam, Netherlands. 69: p 103-113. 2013.

WOLF, D., *et al.* Diagnosis of Gastrointestinal Parasites in Reptiles: comparison of two coprological methods. **Acta Veterinaria Scandinavica**. 1-13. 2014.

ZAHER, H., *et al.* Molecular phylogeny of advanced snakes (*Serpentes, Caenophidia*) with an emphasis on South American Xenodontines: a revised classification and descriptions of new taxa. **Papéis Avulsos de Zoologia**. São Paulo. v. 49, n. 11, p. 115-153, 2009.

ZIMMERMAN, L., VOGEL, L., BOWDEN, R. Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective. **Journal Of Experimental Biology**, 213(5), 661- 671. 2010.

**ANEXOS**

Fuentes financiadoras del trabajo:

- De Brasil: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Bolsa de Estudios del programa de Demanda Social (DS)
- De Argentina: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (proyecto P.I.P. 2016-2019 112-201301-00126-CO), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT-2013-1238), Instituto Nacional de Medicina Tropical, Secretaría General de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Nordeste (proyecto subsidiado según Resolución N° 966/17).