

## INDUÇÃO DE PANCREATITE HEMORRÁGICA AGUDA NO CÃO POR VENENO ESCORPIÔNICO DE *T. SERRULATUS*

JESUS CARLOS MACHADO e JOSÉ FRANCO DA SILVEIRA FILHO\*  
Seção de Anatomia Patológica do Instituto Butantan

**RESUMO:** Doses subletais de veneno total de *T. serrulatus* induzem no pâncreas do cão degenerações características do desenvolvimento e implantação da pancreatite hemorrágica aguda. Estas degenerações variam desde vacuolização das células acinares até aquelas características da pancreatite hemorrágica aguda: hemorragias, leucocitose, esteatonecrose, e degenerações vasculares e dos lóbulos pancreáticos. Os resultados obtidos sugerem que para a instalação da pancreatite aguda induzida pelo veneno escorpiônico não há necessidade de acentuada redução dos grânulos de zimogênio das células pancreáticas.

**UNITERMOS:** Pancreatite hemorrágica Aguda; Veneno Escorpiônico de *T. serrulatus*; Histopatologia.

### INTRODUÇÃO

Waterman, 1938 (23), e Bartholomew, 1970 (1), relataram a ocorrência de pancreatite aguda em acidentes humanos causados pelo escorpião *T. trinitatis*. Resultados preliminares de nosso laboratório mostraram que o veneno do escorpião *T. serrulatus* induz alterações patológicas no pâncreas do cão que vão desde degenerações vacuolares das células acinares pancreáticas até àquelas características da pancreatite hemorrágica aguda, (19).

O veneno de *T. serrulatus* induz a liberação de acetilcolina de vários tecidos nervosos (8, 14, 3) e a liberação de catecolaminas das terminações das fibras pós-ganglionares simpáticas (6, 7, 22) e das adrenais, (15). A *Tityustoxina*, substância polipeptídica obtida por fracionamento do veneno total de *T. serrulatus*, reproduz os efeitos do veneno total (13,8).

O veneno de *T. serrulatus*, por suas propriedades bioquímicas e farmacológicas parece constituir-se em excelente ferramenta no estudo da etiopatogênica da pancreatite. Além de induzir pancreatite sem manipulação mecânica do pâncreas, temos a possibilidade de testar se as alterações patológicas pancreáticas são devido à ação do veneno ao nível do sistema nervoso (através de mecanis-

\* Bolsista do FEDIB.

Endereço para correspondência: CEP 05504 - Caixa Postal, 65 - São Paulo - Brasil.

mos colinérgico ou adrenérgico ou ambos) ou através de mecanismo que não envolva, necessariamente, o sistema nervoso. Neste trabalho relatamos as alterações patológicas induzidas no pâncreas do cão pelo veneno total de *T. serrulatus*.

## MATERIAL E MÉTODOS

55 cães adultos normais (10-15 Kg de peso corpóreo) foram submetidos a jejum de 24 horas antes dos experimentos. Em certos casos, o jejum continuou durante o transcorrer do experimento e em outros somente o jejum prévio foi respeitado.

O veneno total de *T. serrulatus* foi obtido por extração elétrica e mantido a 0°C em dessecador. Em todos os experimentos ele foi dissolvido em solução salina 0,9% e usado no mesmo dia. A inoculação do veneno sempre foi por via venosa. Os animais controle eram injetados com salina. Todos os animais foram sacrificados com éter etílico intravenoso.

A potencialidade do veneno usado é 500 microgramas, dose mínima para cobaia de 500 gramas. Cinco microgramas deste veneno causam salivação e outros sintomas de intoxicação característicos da toxina 20 minutos após sua inoculação intraperitoneal em camundongos de 20 gramas. Este teste também permite avaliar a potencialidade do veneno (10).

Logo após à morte do animal, o pâncreas e demais órgãos eram retirados e imediatamente fixados em Formol e Bouin. Pequenos fragmentos dos órgãos foram incluídos em parafina e os cortes obtidos foram corados pelos métodos da Hematoxilina, Eosina e Mallory-Masson.

## RESULTADOS

### a) Efeitos de doses letais de veneno

Oito cães foram inoculados com uma única dose de veneno (0,5-1,0 mg/Kg p.c.). Estes animais apresentaram fortes sinais de intoxicação 10 minutos após a inoculação do veneno: salivação, lacrimação, respiração difícil, evacuação, vômito, sudorese, urina, tremores, ficando o animal totalmente prostrado. Os animais morreram em menos de 6 horas após à inoculação do veneno.

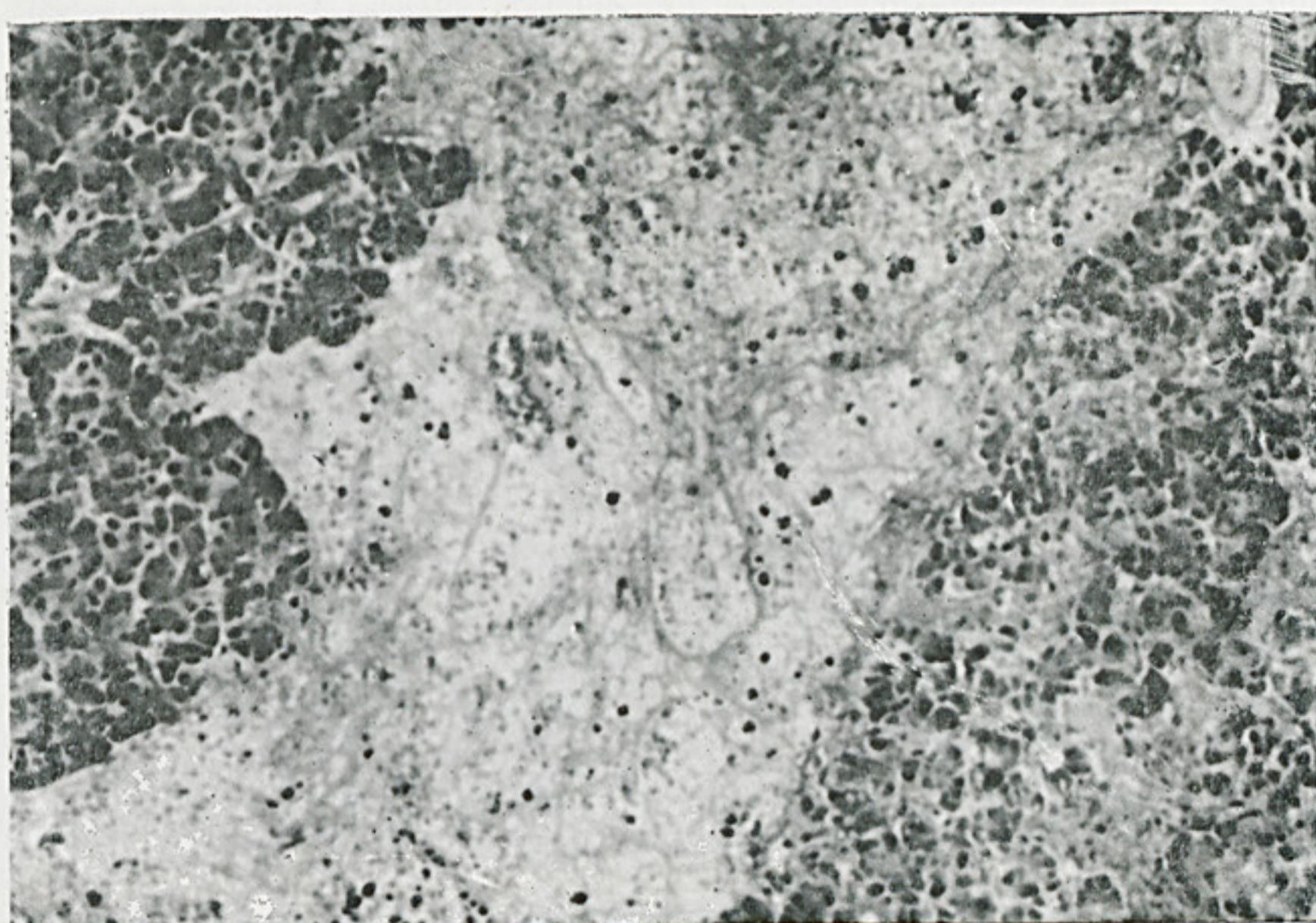
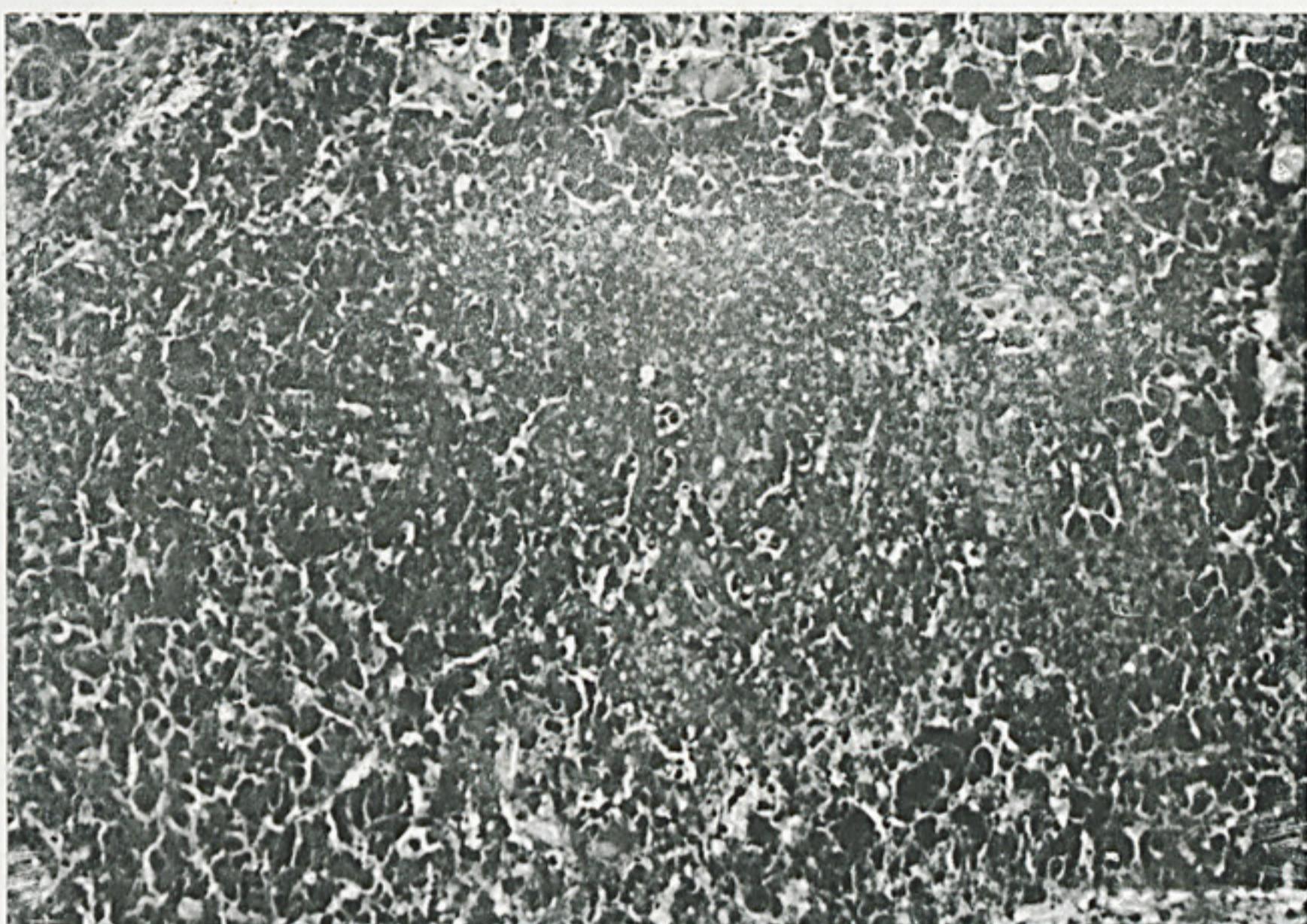
Macroscopicamente, os órgãos não apresentaram alterações notáveis, a não ser o intestino que, em muitos casos, apresentou-se com lúmen preenchido por muco tinto de sangue.

A análise histopatológica do pâncreas mostrou degenerações microvacuolares parenquimatosas dos elementos acinares e algumas pequenas hemorragias nos septos interlobulares. Os ácinos normais e os comprometidos com degenerações vacuolares apresentaram-se carregados com grânulos de zimogênio.

### b) Efeitos de uma única dose subletal de veneno

Os resultados deste ítem estão resumidos na tabela 1.

Grupo 1 - A fim de verificar se o veneno, logo após à sua inoculação induzia alterações patológicas e a liberação de zimogênio das células acinares pan-



2

Fig. 1 — Pâncreas (Col. H.E.  $\times$  224). Pancreatite Hemorrágica Aguda. Foco hemorrágico e necrótico substituindo o parênquima lobular.

Fig. 2 — Pâncreas (Col. H.E.  $\times$  254,3). Intenso edema e Hemorragia intersticial com vasos necrosados. O parênquima, à direita mostra despovoamento celular com pequenos focos de necrose.

creáticas, três cães foram inoculados com uma dose subletal e sacrificados 1-3,5 horas após à inoculação.

Grupo 2 - Dezoito cães foram inoculados com uma dose subletal e sacrificados 24-48 horas após à inoculação.

Doses subletais de veneno induzem o aparecimento de sinais de intoxicação 30 minutos após à sua inoculação, embora em intensidade menor do que no caso das doses letais. Macroscopicamente, os órgãos não apresentaram alterações notáveis. Somente um animal do grupo 2 apresentou fortes sinais de intoxicação e lúmen intestinal preenchido por muco tinto de sangue.

Os animais do grupo 1 apresentaram em várias regiões do pâncreas aumento da eosinofilia e diminuição da basofilia citoplasmática das células acinares. Os ácinos apresentaram-se carregados de zimogênio e os vasos sanguíneos congestionados e dilatados.

O grupo 2 apresentou: dois casos de Pancreatite Hemorrágica Aguda (PHA), quatro casos em que o quadro patológico sugere instalação da PHA e nos demais, somente pequenas hemorragias interlobulares foram notadas. Nestes dois animais citados encontrou-se quadro típico da PHA: necrose do tecido adiposo e das áreas parenquimatosas, intensas hemorragias interlobulares e intralobulares. Completa o quadro exsudato redondo celular rico em polimorfonucleares, trombose vascular, vasos sanguíneos necrosados, ductos pancreáticos dilatados com epitélio ulcerado e intensa hiperemia (Figs. 1, 2, 3 e 4).

Quadro patológico que sugere instalação de PHA foi encontrado em três animais. Várias regiões do pâncreas apresentaram intensas hemorragias periféricas e interlobulares. Nestas regiões apresentam ácinos em necrose degenerações em vasos sanguíneos, início de leucocitose e intensa hiperemia (Fig. 5). É interessante notar que em todos os animais do grupo 1 e 2, os ácinos pancreáticos normais apresentaram-se carregados de zimogênio.

### c) Efeitos de doses subletais cumulativas

Os resultados deste ítem estão resumidos na Tabela 2. A sintomatologia externa e a análise macroscópica dos órgãos são semelhantes àquelas já descritas para doses subletais (ítem b).

Grupo 1 - três animais foram inoculados com 2 doses de veneno (intervalos de 24 horas entre elas) e sacrificados oito dias após a segunda dose.

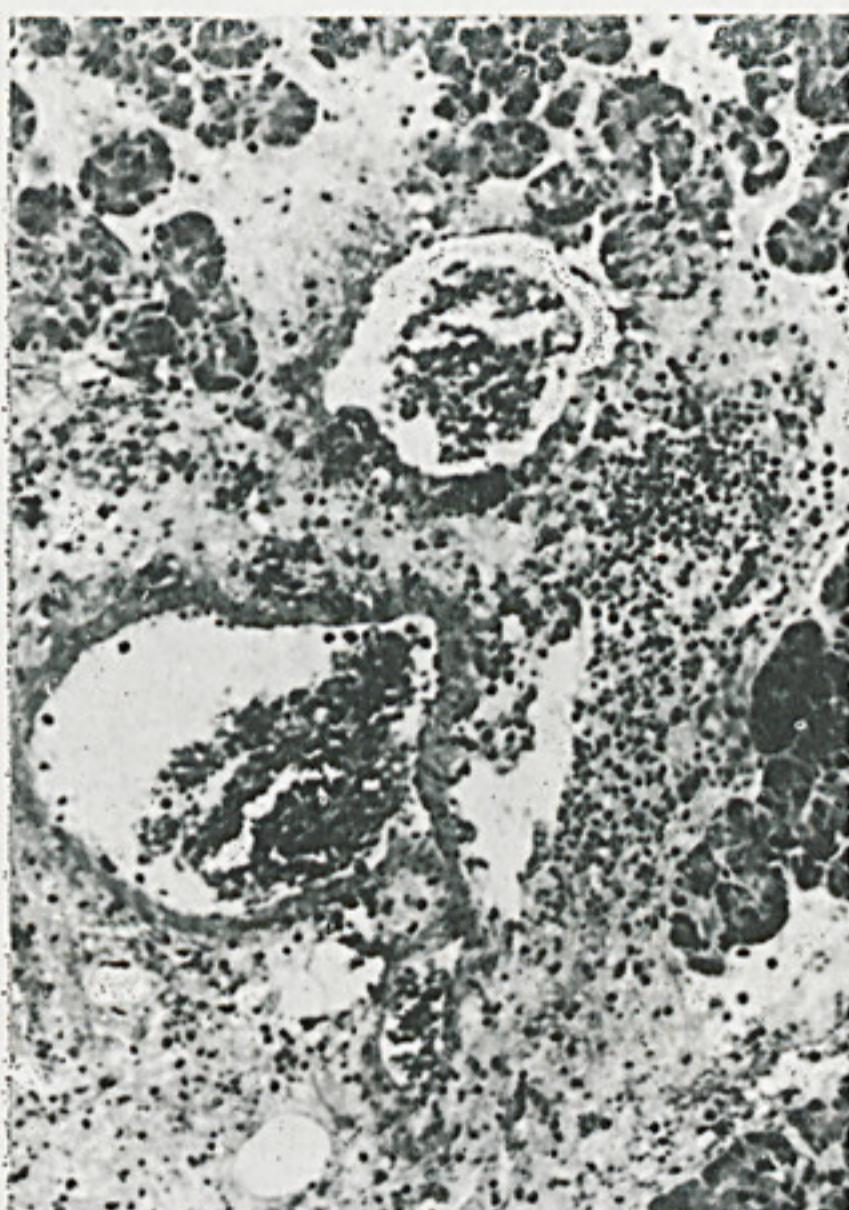
Grupo 2 - três animais foram inoculados com 3-5 doses de veneno (intervalo de 24 horas entre elas) e sacrificados 24 horas após a última inoculação.

Grupo 3 - três animais foram submetidos a tratamento semelhante ao do grupo 2 e sacrificados oito dias após a última inoculação.

Grupo 4 - Dois animais foram inoculados com duas doses de veneno (intervalo de 24 horas entre elas) e sacrificados 31 dias após a segunda inoculação.

Os animais destes grupos receberam alimentação 24 horas após a primeira inoculação.

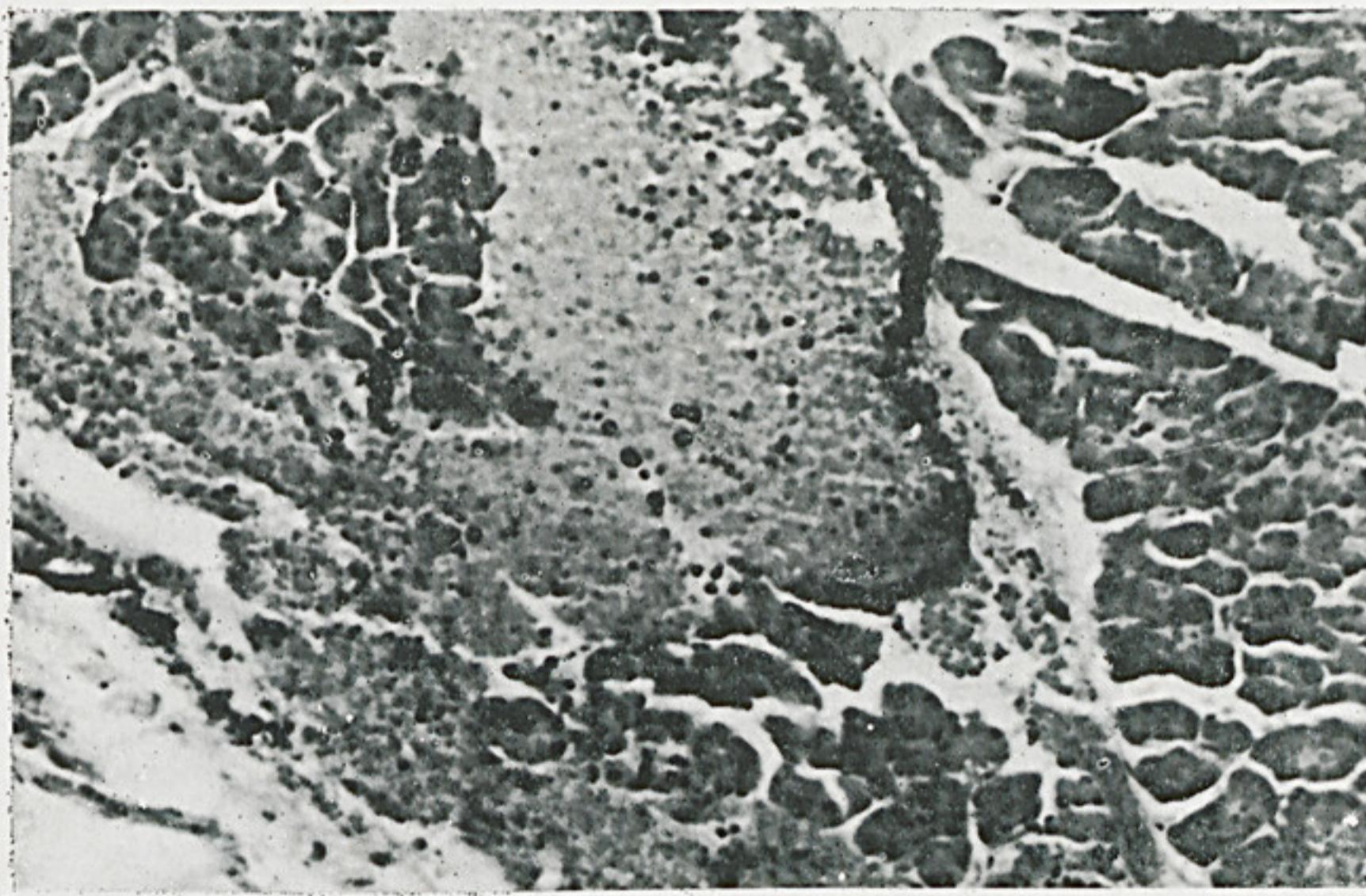
Quadro patológico que sugere instalação de PHA foi encontrado em várias regiões do pâncreas de um animal do grupo 2. Em um animal do grupo 4 o pâncreas apresentou vários processos inflamatórios caracterizados por fibrose e calcificação. Estes processos ocupavam regiões correspondentes a um lóbulo pan-



3



4



5

Fig. 3 — Pâncreas (Col. H. E.  $\times$  177,4). Observa-se vasodilatação apresentando zonas de necrose da parede vascular com edema e hemorragia intersticial.

Fig. 4 — Pâncreas (Col. H.E.  $\times$  155). Pancreatite Hemorrágica Aguda. Foco de Esteatonecrose e Calcificação e leucocitose.

Fig. 5 — Pâncreas (Col. H.E.  $\times$  249,5). Instalação de Pancreatite Hemorrágica Aguda. Hemorragias interlobulares e degenerações nos ácinos pancreáticos.

TABELA 1

EFEITOS DE UMA ÚNICA DOSE SUBLÉTAL DE VENENO DE *T. SERRULATUS* SOBRE O PÂNCREAS DO CÃO

Grupo	N.º de cães	Veneno mg/kg	Sacrificado (horas)	Histopatologia do pâncreas
1	1	0,11	1	degeneração citoplasmática da CA*
1	1	0,06	3,5	degeneração citoplasmática da CA*
1	1	0,11	3,5	degeneração citoplasmática da CA*
2	1	0,05	24	PHA**
2	1	0,07	24	NORMAL
2	3	0,08	24	NORMAL
2	1	0,08	24	instalação de PHA
2	2	0,09	24	NORMAL
2	1	0,1	24	NORMAL
2	1	0,07	48	NORMAL
2	1	0,08	48	NORMAL
2	2	0,12	48	NORMAL
2	1	0,13	48	instalação de PHA
2	1	0,17	48	PHA**
2	1	0,19	48	instalação de PHA
2	1	0,22	48	instalação de PHA
2	1	0,25	48	NORMAL

\* CA = Célula acinar

\*\* PHA = Pancreatite Hemorrágica Aguda

TABELA 2

EFEITOS DE DOSES SUBLÉTAIS DE VENENO DE *T. SERRULATUS* SOBRE O PÂNCREAS DO CÃO

Grupo	N.º de cães	Veneno mg/kg	N.º de doses	Sacrificado (dias)*	Histopatologia do pâncreas
1	1	0,078	2	8	NORMAL
1	1	0,10	2	8	NORMAL
1	1	0,11	2	8	NORMAL
2	1	0,06	5	1	NORMAL
2	1	0,09	5	1	NORMAL
2	1	0,09	3	1	instalação PHA**
3	1	0,07	5	8	NORMAL
3	1	0,08	5	8	NORMAL
3	1	0,13	5	8	NORMAL
4	1	0,08	2	31	processos inflamatórios
4	1	0,11	2	31	NORMAL

\* Período de tempo transcorrido após a última dose de Veneno e o sacrifício do animal

\*\* PHA = Pancreatite Hemorrágica Aguda.

creático. Nos demais animais nada foi notado de anormal. Em todos os casos os ácinos pancreáticos normais apresentaram-se carregados de grânulos de zimogênio.

## DISCUSSÃO

Doses subletais de veneno de *T. serrulatus* induzem diminuição da basofilia perinuclear e aumento da eosinofilia citoplasmática nas células acinares pancreáticas, logo após a sua inoculação (1-3,5 horas). Doses letais do mesmo veneno induzem degenerações vacuolares no citoplasma da célula acinar. Estas degenerações provocadas pelo veneno escorpiônico, também foram encontradas nas etapas iniciais da instalação de PHA induzida por Etionina (11, 12, 16, 17 e 18). A degeneração vacuolar induzida por Etionina na célula acinar pancreática tem sido interpretada como sendo degenerações das membranas do retículo endoplasmático (16, 17).

Em 33% dos animais inoculados com uma única dose subletal e sacrificados 24-48 horas depois, encontramos lesões pancreáticas severas: necrose lipolítica e protéica, intensas hemorragias interlobulares e intralobulares, leucocitose, edema e degenerações nos vasos sanguíneos. Neste grupo tivemos 2 casos de PHA e 4 casos de instalação de PHA. A Tabela 1 mostra que neste grupo não houve relação entre a concentração de veneno usada e a lesão pancreática encontrada.

Em 11 animais inoculados com várias doses subletais de veneno encontramos somente um caso de instalação de PHA. Em outro animal sacrificado 30 dias após a última inoculação encontramos abcessos inflamatórios caracterizados por fibrose e calcificação, semelhantes àqueles encontrados no pâncreas de animais tratados com etionina (18) ou no pâncreas de pacientes humanos, que tiveram crises de pancreatite aguda (20). A Tabela 2 mostra que não existe aparente correlação entre o número de doses de veneno e a incidência de lesões pancreáticas.

Lesões pancreáticas notáveis foram encontradas em 27,5% dos animais inoculados com uma ou mais doses subletais de veneno e sacrificados pelo menos 24 horas depois da última inoculação. Algumas hipóteses podem ser levantadas para tentar explicar a baixa incidência de lesões pancreáticas e a não relação entre dose e efeito: i.) Variações inerentes ao veneno e, ii.) Variações inerentes aos indivíduos.

Utilizamos em nossos experimentos o veneno total de *T. serrulatus* obtido por extração elétrica. Bucherl 1953, (4), demonstrou que LD-50 deste veneno em camundongos varia com o lote de veneno testado. Diniz e Gonçalves, 1960, (9) demonstraram que escorpiões capturados em diferentes lugares de uma mesma localidade podem apresentar diferenças na composição química. Quando cromatografado em coluna, o veneno escorpiônico separa-se em 2 componentes tóxicos — *Tityustoxina* — 1 e 2 e 2 componentes sem atividade tóxica (13,8). Em nossos experimentos não tínhamos meios de determinar a concentração de cada um dos componentes do veneno escorpiônico.

Os fatores sexo e idade são extremamente importantes no desencadeamento da PHA em camundongos por Etionina (17, 18). A importância destes fatores,

talvez, esteja relacionada com o fato de que o nível de inibidores das enzimas pancreáticas no soro aumenta com a idade do organismo e é menor nas fêmeas do que nos machos (5, 21, 2). Além destes fatores devemos, também, levar em conta uma possível variação de sensibilidade dos indivíduos em relação ao veneno.

Apesar destas dificuldades, o veneno de *T. serrulatus* parece constituir-se em excelente ferramenta no estudo da etiopatogênio da PHA, pois, pode-se induzir lesões pancreáticas sem manipulação mecânica do órgão. A maioria dos métodos de indução experimental de PHA consistem basicamente na injeção de substâncias (tripsina, bile, toxinas bacterianas, etc.) nos ductos pancreáticos principais com pressões que se supõem serem fisiológicas. Estes procedimentos são extremamente artificiais e os resultados por eles obtidos devem ser olhados com respeito, no que diz respeito à etiologia da pancreatite.

Os nossos resultados mostram que um dos primeiros efeitos do veneno escorpiônico sobre o pâncreas é a indução de degenerações citoplasmáticas na célula acinar. Nos animais mais sensíveis, talvez, estas degenerações possam comprometer ácinos inteiros, formando inicialmente focos necróticos localizados, que depois podem se alastrar levando ao quadro típico da PHA. Parece-nos que para a instalação de PHA induzida por este veneno não há necessidade de uma acentuada redução dos grânulos de zimogênio das células acinares.

---

Agradecimentos: Ao sr. Eliseu B. de Oliveira pela excelente ajuda técnica prestada.

---

**ABSTRACT:** Sub-lethal dose of total venom of *T. serrulatus* induces in pancreas of dogs, the characteristic histopathological lesions of the acute hemorrhagic pancreatitis. This degeneration varies from small citoplasmatic vacuolizations of the acinar cells to interstitial edema, hemorrhage, leukocytosis and steatonecrosis and vascular and pancreas lobules degenerations and necrosis. From these results we can consider that the zimogenic granules reduction in pancreatic cells is not necessary for the induction of the acute hemorrhagic pancreatitis.

**UNITERMS:** Acute hemorrhagic pancreatitis. Scorpion venoms Histopathology.

#### BIBLIOGRAFIA

1. BARTHOLOMEW, C.: "Acute Scorpion Pancreatitis in Trinidad, British Med. Journal, 1: 66-68 (1970).
2. BLACKWOOD, C.E.; MONT, J.E.; KELLER, S.; FIERER, J.A.; MANDL, L.: "Alpha 1 — antitrypsin concentration in serum of laboratory animal: changes following proteolytic enzyme injection". *J. Lab. Clin. Med.* 84: 813-822 (1974).
3. BÖHN, G.M.; PAMPOLO, S.; DINIZ, C.R.; GOMEZ, M.V.; PIMENTA, A.F.; NETTO, J.C.: "Ultrastructural alterations of mouse diaphragm nerve endings induced by purified scorpion venom Titystoxin". *Toxicon*, 12: 509, 1974.
4. BUCHERL, W.: "Escorpiões e Escorpionismo: II Atividades das peçonhas de *T. serrulatus* e *T. bahiensis* sobre camundongos". *Mem. Inst. Butantan*, 25: 83, 1953.
5. CLIFFTON, E.E.; ELLIOT, D.N.; NERO, W.J.: "Observations on the ontogenetic reaction of the serum of mice Strain variations". *Cancer Research* 9: 422-425. 1949.

6. CORRADO, A.P.; ANTONIO, A.; DINIZ, C.R.: "Recent advances on the mechanism of action of brazilian scorpion venom (*T. serrulatus*)" *Mem. Inst. Butantan*, 33: 957-960, 1966.
7. CORRADO, A.P.; ANTONIO, A.; DINIZ, C.R.: "Brazilian Scorpion Venom (*T. serrulatus*) unusual sympathetic postganglionic stimulant". *J. Pharmac.- Exp. Ther.* 164: 253-258, 1968.
8. DINIZ, C.R.: "Chemical and Pharmacological Properties of tityus venoms" in "Venous Animals and their Venoms" Edit. W. Bucherl and E. Buckley, 3: 311-315, Academic Press, N. York, 1971.
9. DINIZ, C.R., & GONÇALVES, J.M.: "Separation of biologically active components from scorpion venoms by zone electrophoresis". *Biochim. Biohys. Acta*, 41: 470-477, 1960.
10. DINIZ, C.R. & VALERI, V.: "Effects of a toxin present in a purified extract telsons from the scorpion *T. serrulatus* on smooth muscle preparation and in mice". *Arch. Int. Pharmacodyn. Thér.* 71: 1-13, 1959.
11. FARBER, E.; & POPPER, H.: "Production of acute pancreatitis with ethionine and its preventions by methionine". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 74: 838-840, 1950.
12. GOLDBERG, R.C.; CHAI KOFF, I.L.; DODGE, A.H.: "Restriction of pancreatic acinar tissue by ethionine". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 74: 869-872, 1950.
13. GOMEZ, M.V. & DINIZ, C.R.: "Separation of toxic components from the Brazilian scorpion — *T. serrulatus* venom", *Mem. Inst. Butantan*, 33: 899, 1966.
14. GOMEZ, M.V.; DAI, M.; DINIZ, C.R.: "Effect of scorpion venom, tituystoxin on the release of acetylcholine from incubated slices of rat brain". *J. Neurochem.* 20: 1051, 1973.
15. HENRIQUES, M.C.; GAZZINELLI, G.; DINIZ, C.R.; GOMEZ, M.V.: "Effect of the venom of the scorpion *T. serrulatus* on the adrenal gland catecholamines" *Toxicon*, 5: 175-179, 1968.
16. HERMAN, L. & FITZGERALD, P.J.: "The degenerative changes in pancreatic acinar cells caused by Ethionine". *J. Cell Biol.*, 12: 277-296, 1962.
17. LOMBARDI, B.; ESTES, L.W.; LONG NECKER: "Acute hemorrhagic pancreatitis (massive necrosis) with fat necrosis induced in mice by ethionine fed with a choline-deficient diet", *Am. J. Pathol.* 79: 465-480, 1975.
18. LOMBARDI, B. & RAO, N.K.: "Acute hemorrhagic Pancreatic Necrosis in Mice". *Am. J. Pathol.* 81: 87-100, 1975.
19. MACHADO, J.C. & SILVEIRA, J.F.: "Obtenção experimental do quadro anátomo-patológico da pancreatite hemorrágica aguda no cão pela inoculação de veneno *T. serrulatus*". *Mem. Inst. Butantan*, 38: 159-162, 1974.
20. ROBERTS, N.J.; BANGGENSTOSS, A.H.; COMFORT, N.W.: "Acute Pancreatic Necrosis: A clinico-pathologic study". *Am. J. Clin. Pathol.*, 20: 738-764, 1950.
21. STANSLY, P.G. & RAMSEY, D.S.: "Activity and regulation of serum. Trypsin-inhibitor in mice" *Cancer Res.*, 17: 572-578, 1957.
22. TAFURI, W.L.; MARIA, T.A.; FREIRE, MAIA, L.; CUNHA MELO, J.R.: "Effects of purified scorpion venom on vesicular components in the myenteric plexus of rat". *Toxicon*, 9: 427, 1971.
23. WATERMAN, J.A.: "Some notes on scorpion poisoning in Trinidad" *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hygiene*, 31: 607-624, 1938.

