



## **DMSO (dimetil sulfóxido) inibe acetilcolinesterase dos tecidos nervoso e muscular de tambaqui (*Colossoma macropomum*)**

Karina Francis de Souza Barbosa<sup>1</sup>, Eike Nascimento de Oliveira<sup>1</sup>, Rúbia Neris Machado<sup>1</sup>, Ana Lúcia Silva Gomes<sup>1</sup>, Wallice Paxiúba Duncan<sup>2</sup>

### **Resumo**

Solventes orgânicos têm sido amplamente utilizados nos ensaios *in vivo* e *in vitro*. No entanto, os efeitos diretos e indiretos destes solventes sobre os processos e/ou mecanismos celulares foram raramente investigados. Neste estudo, foram avaliados os efeitos dos solventes dimetil sulfóxido (DMSO), a acetona, o metanol, o etanol e o clorofórmio sobre a acetilcolinesterase (AChE) dos tecidos nervoso e muscular do tambaqui (*Colossoma macropomum*). A atividade absoluta da AChE foi analisada incubando-se cada um dos solventes durante 15 min, sendo que a acetilcolina (1 mM) foi utilizada como substrato. O DMSO foi o solvente que fortemente inibiu a atividade da AChE tanto no tecido nervoso quanto no músculo. Nestes tecidos, os solventes que fortemente inibiram a enzima foram: DMSO > acetona > etanol. Os dados sugerem que estes solventes podem ser neurotóxicos. Assim sendo, recomenda-se uma avaliação rigorosa na escolha destes solventes durante os experimentos *in vitro* e/ou *in vivo*.

**Palavras-chave:** solventes, toxicidade, experimentos *in vitro*, AChE, *Colossoma macropomum*.

**DMSO (dimethyl sulfoxide) inhibits acetylcholinesterase from the nervous and muscle tissues of tambaqui (*Colossoma macropomum*).** Organic solvents have been widely used both *in vivo* and *in vitro* assays. However, the direct and indirect effects of these solvents on cellular processes and/or mechanisms has been poorly investigated. In this study, we examined the effects of the solvents dimethyl sulfoxide (DMSO), acetone, methanol, ethanol and chloroform on acetylcholinesterase (AChE) activity at nervous and muscle tissues of tambaqui (*Colossoma macropomum*). The absolute activity of AChE was analyzed by incubating in each solvent for 15 min. Acetylcholine (1 mM) was used as substrate. DMSO was the solvent that strongly inhibited AChE activity in both nervous and muscle tissue. In these tissues, the solvents that strongly inhibited the enzyme were: DMSO> acetone> ethanol. Our data suggest that these solvents may be neurotoxic. Therefore, it is recommended a rigorous evaluation when choosing a solvents for both *in vitro* and/or *in vivo* experiments.

**Key-words:** solvent, toxicity, *in vitro* experiments, AChE, *Colossoma macropomum*.

<sup>1</sup> Laboratório de Parasitologia de Animais Aquáticos/Departamento de Parasitologia

<sup>2</sup> Laboratório de Morfologia Funcional/Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Amazonas - UFAM. Avenida Rodrigo Otavio, 6200. Coroado I, 69.080-900, Manaus, Amazonas, Brasil. E-mail: karinabaarbosa@hotmail.com (autor correspondente)



## 1. Introdução

O uso de solventes orgânicos em experimentos *in vitro* e *in vivo* é uma prática comum, cabe ao pesquisador a decisão de escolher aquele que melhor se adequa às suas necessidades e essa muitas vezes é uma escolha baseada na literatura. Lima e Angnes (1999) alertam para dois fatores que devem ser considerados nesta escolha: efeitos do solvente sobre a atividade biológica e a baixa solubilidade dos analitos.

Em muitos experimentos *in vitro* e *in vivo*, o dimetil sulfoxido (DMSO) é o solvente mais utilizado. Esta substância solubiliza tanto moléculas polares quanto apolares. Muitos autores o consideram de baixa toxicidade e, por esta razão, popularizou-se tanto seu uso, que na maioria das vezes sua concentração nem é mencionada (GALVÃO et al., 2017).

No entanto, vários estudos têm apresentado evidências de efeitos adversos do uso do DMSO (WONG & REINERTSON, 1984), inclusive inibindo enzimas importantes, tais como a acetilcolinesterase (AChE). O mecanismo de inibição da AChE pelo DMSO tem sido elucidado tanto em vertebrados quanto em invertebrados (PLUMMER et al., 1983). Para estes autores, a estrutura química do DMSO é semelhante ao da colina e do grupo carbonila da acetilcolina. Tal semelhança sugere que tanto o DMSO quanto a acetilcolina possam competir pelo sítio catalítico da AChE.

Além do DMSO, outros solventes são utilizados em bioensaios, seja na extração de componentes vegetais, seja na utilização como veículo em reações diversas e o rendimento e composição de extratos podem variar em função do sistema solvente utilizado (MOURE, 2001; OU et al., 2001; YU et al., 2002; YILMAZ e TOLEDO, 2006). Dentre eles, destacam-se a acetona, o clorofórmio, o metanol e o etanol. A escolha do solvente ideal depende profundamente da solubilidade do analito e da interferência do solvente em outros processos bioanalíticos (HOCKNULL et al., 1987). No entanto, a maioria dos estudos não testa o efeito dos solventes sobre os mecanismos e processos celulares antes dos testes de toxicidade *in vivo* ou *in vitro*.

A AChE é uma serina hidrolase encontrada principalmente nas junções neuromuscular e sinapses colinérgicas no tecido nervoso. Por isto,

esta enzima tem sido utilizada amplamente como marcador bioquímico nos estudos de toxicidade (BADIOU et al., 2008). A AChE hidrolisa rapidamente o neurotransmissor acetilcolina (ACh) formando os produtos colina e acetato. Portanto, a inibição ou ativação desta enzima por meio de substâncias químicas são excelentes indicadores de neurotoxicidade (ČOLOVIĆ et al., 2013).

Por outro lado, solventes orgânicos hidrofílicos, tais como a acetona, o clorofórmio, o metanol e o etanol podem comprometer a função das enzimas modificando diretamente a estrutura espacial ou interagindo com a água ao redor da molécula (GORMAN et al., 1992). Com isso, o presente trabalho avaliou o efeito de diversos solventes, tais como o dimetil sulfoxido (DMSO), a acetona, o metanol, o etanol e o clorofórmio na atividade absoluta da acetilcolinesterase dos tecidos nervoso e muscular do tambaqui (*Colossoma macropomum*).

## 2. Material e Métodos

A enzima acetilcolinesterase (AChE) foi obtida dos tecidos muscular e nervoso de dez exemplares de tambaqui (*Colossoma macropomum*) adquiridos em uma propriedade localizada na estrada AM-070 Km 54, município de Manacapuru (Amazonas). Os peixes foram transportados vivos ao laboratório de Parasitologia de Animais Aquáticos – LAPAA – UFAM e mantidos em caixas d'água com temperatura entre 28-30 °C. O experimento foi iniciado em 29/08/2017 e as análises perduraram até 08/09/2017. Os animais foram lentamente anestesiados com benzocaína (0,5 g/L) durante ~1 minuto, e eutanasiados por meio de secção medular. Todos os procedimentos envolvidos foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da UFAM (002/2014-CEUA/UFAM).

Os tecidos foram homogeneizados em tampão TRIS-HCl (75 mM; pH 7,4) e centrifugados a 10.000 rpm. O sobrenadante foi utilizado para os ensaios da AChE. A concentração de proteína nos homogeneizados foi realizada pelo método de BRADFORD (1976). Os procedimentos de ensaio da enzima foram conforme Ellman (1958). A acetilcolina (Sigma A5751) 1 mM foi utilizada como substrato da enzima. A reação foi monitorada em 412 nm durante 3,5 min a 25 °C. O

coeficiente de extinção molar do DTNB (5,5'-Dithiobis - (2-ácido nitrobenzóico) ( $\epsilon=13,6$ ) foi utilizado nos cálculos da atividade enzimática. Os dados estão expressos em nmoles de substrato convertido/mg de proteína/min (nUI). Os solventes testados foram: dimetil sulfóxido (DMSO), metanol, etanol, acetona e clorofórmio. Todos foram previamente incubados durante 15 min com a enzima presente nos homogeneizados. O grupo controle foi realizado na ausência de qualquer dos solventes testados e representa a atividade absoluta (taxa máxima *in vitro*) da enzima AChE. Os dados foram avaliados quanto à normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov). Após isso, as médias foram comparadas por meio de uma ANOVA não-paramétrica seguida de um teste *pos-hoc* (teste Dunnett) para identificar as diferenças entre os valores de atividade absoluta da AChE entre cada solvente. Em todos os casos, considerou-se o nível de significância aceito de 5%.

### 3. Resultados e Discussão

Os dados de atividade absoluta da enzima acetilcolinesterase nos tecidos muscular e nervoso estão apresentados na Figura 1. Nos dois tecidos, nervoso e muscular, o clorofórmio e o metanol não inibiram a atividade absoluta da AChE. Em ordem crescente de inibição relativa (% dos valores de atividade absoluta do grupo controle) para o tecido nervoso foram: DMSO (10,1% atividade relativa) > acetona (25,2 %) > etanol (44,2 %). E para o tecido muscular foi: DMSO (7,3 %) > acetona (17,9 %) > etanol (26,1 %).

Solventes orgânicos podem ter efeito direto onde podem diminuir ou inativar a atividade enzimática através de dois mecanismos: primeiro, o solvente interage com a enzima modificando a conformação nativa da mesma. A outra forma de inativar é através da interação com a água essencial em torno da molécula enzimática e assim desidratando a enzima (GORMAN et al., 1992). Esses efeitos são causados mais por solventes orgânicos hidrofílicos (DU et al., 2004) é o caso dos solventes etanol, acetona e DMSO.

Os dados mostram que o DMSO foi o solvente que fortemente inibiu a atividade absoluta da acetilcolinesterase tanto no tecido nervoso quanto no tecido músculo do tambaqui. O efeito dos solventes sobre as enzimas depende fortemente da sua hidrofobicidade (REICHARDT et al., 1974). Laane et al. (1987) usaram o logaritmo do

coeficiente de partição (Log P) que mede a polaridade do solvente para quantificar o grau de hidrofobicidade. Foi proposta uma classificação baseada no valor do Log P, onde solventes que apresentam Log P < 2 são relativamente hidrofílicos, Log P entre 2 e 4 são moderados e Log P > 4 são altamente hidrofóbicos (LEO et al., 1971; LAANE et al., 1987). O DMSO foi o mais hidrofílico se comparado aos demais solventes orgânicos estudados (Tabela 1). Contudo, tem-se demonstrado que o DMSO é um inibidor competitivo da AChE em homogeneizados de tecidos de moluscos e vertebrados (PLUMMER et al., 1983). Para estes autores, o DMSO a 1% inibe 50% da atividade da AChE de enguia elétrica. Similar resultado foi observado no músculo atrial do coração de ratos (WATTS & HOOGMOED, 1984). Acredita-se que o grupo  $-S(CH_3)_2$  do DMSO possa competir com o ACh pelo sítio catiônico da AChE.

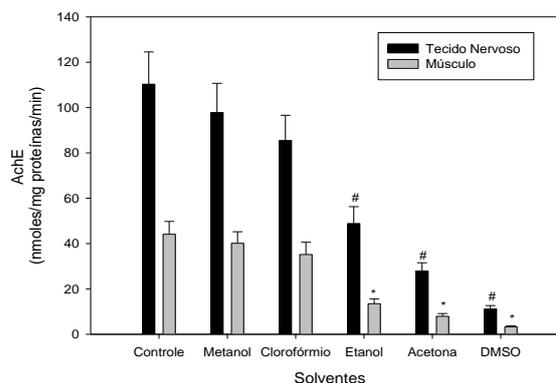


Figura 1 – Atividade máxima *in vitro* da acetilcolinesterase nos tecidos nervoso e muscular de *Colossoma macropomum*. Os símbolos sobre as barras indicam diferença significativa ( $p<0,05$ ) dos solventes em relação ao controle no tecido muscular (\*) e tecido nervoso (#).

A inibição da AChE pelo DMSO, etanol e acetona pode potencializar as sinapses colinérgicas. Isto indica que tais solventes podem ser neurotóxicos e que os usos destes solventes em experimentos de toxicidade *in vivo* devem ser feitos com cautela.

Contudo, há exceções. O metanol, mesmo sendo um solvente hidrofílico não inibiu a atividade enzimática de AChE nos tecidos nervoso e muscular de *Colossoma macropomum*. Uma possível explicação para este fato é que algumas enzimas em uma concentração considerada baixa



de solvente podem reter fortemente sua camada de hidratação (LIMA & ANGNES, 1999).

Portanto, os resultados sugerem cautela e uma reavaliação rigorosa na escolha de solventes durante os ensaios de toxicidade *in vivo* e *in vitro*.

#### 4. Conclusão

Os solventes Dimetil sulfóxido (DMSO), acetona e etanol inibiram (*in vitro*) a atividade absoluta da enzima acetilcolinesterase no tecido muscular e nervoso de tabaqui (*Colossoma macropomum*).

Tabela 1. Valores de inibição, como atividade relativa (% do controle) da acetilcolinesterase muscular e tecido nervoso de tabaqui (*Colossoma macropomum*) e valores de Log P para solventes orgânicos, conforme Laane et al. (1987).

Solvente	Inibição (%) Músculo	Inibição (%) T. nervoso	Log P
DMSO	7,3	10,1	- 1,30
Metanol	90,9	88,6	- 0,76
Etanol	26,1	44,2	- 0,24
Acetona	17,9	25,2	- 0,23
Clorofórmio	79,7	77,4	2,00

#### Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. O(s) autor(es) e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

#### 5. Referências

AITA, K.; IRIE, H.; TANUMA, Y.; TOIDA, S.; OKUMA, Y.; MORI, S.; AND SHIGA, J. **Apoptosis in murine lymphoid organs following intraperitoneal administration of dimethyl sulfoxide (DMSO)**. *Experimental and Molecular Pathology*, v. 79, n. 3, p. 265–271, 2005.

ALI, B. H. **Dimethyl Sulfoxide: Recent pharmacological and toxicological research.**

*Veterinary and Human Toxicology*, v. 43, n. 4, p. 228-231, 2001.

ARIAS, A. R. L.; BUSS D. F.; ALBURQUERQUE, C.; INÁCIO, A. F.; FREIRE, M. M.; EGLER, M.; MUGNAI, R.; BAPTISTA D. F. **Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos.** *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 12, p. 61-72, 2007.

BADIOU, A.; MELED, M; BELZUNCES, L.P. **Honeybee Apis mellifera acetylcholinesterase — A biomarker to detect deltamethrin exposure.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 69, n. 2, p. 246–253, 2008.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry*. V. 72, n. 1-2, p. 248–254, 1976.

CHUIKO, G. M. **Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: specific activities and in vitro inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticide.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. n. 127, p. 233–242, 2000.

ČOLOVIĆ, M. B.; KRSTIĆ, D. Z.; LAZAREVIĆ-PAŠTIS, T. D.; BONDŽIĆ, A. M.; & VASIĆ, V. M. **Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology.** *Current Neuropharmacology*, v. 11, n. 3, p. 315-335, 2013.

DE MÉNORVAL, M. A.; MIR, L. M.; FERNÁNDEZ, M. L.; REIGADA, R. **Effects of dimethyl sulfoxide in cholesterol-containing lipid membranes: a comparative study of experiments in silico and with cells.** *PLoS One* 7, 2010.

DU, W.; XU, Y.; LIU, D.; ZENG, J. **Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors.** *Molecular Catalysis B: Enzymatic*. p. 125-129, 2004.

ELLMAN, G. L. **A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*. v. 74, n. 2, p. 443-450, 1958.



FULTON, M. H.; KEY, P. B. **Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects.** *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 20, n. 1, p. 37-45, 2001

GALVAO, J.; DAVIS, B.; TILLEY, M.; NORMANDO, E.; DUCHEN, M. R.; CORDEIRO, F. **Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO.** *The FASEB Journal*, v. 28, n. 3, p. 1317-1330, 2017.

GORMAN, L. A. S.; & DORDICK, J. S. **Organic solvents strip water off enzymes.** *Biotechnology and Bioengineering*. v. 39, p. 392, 1992.

GRAY, D. A.; CLARKE, M. J.; BAUX, C., BUNTING, J. P.; & SALTER, A. M. **Antioxidant activity of oat extracts added to human LDL particles and in free radical trapping assays.** *Journal of Cereal Science*, v. 36, n. 2, p. 209-218, 2002.

HANSLICK, J. L.; LAU, K.; NOGUCHI, K. K.; OLNEY, J. W.; ZORUMSKI, C. F.; MENNERICK, S., FARBER, N. B. **Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system.** *Neurobiology of Disease*. v. 34, p. 1-10, 2009.

HOCKNULL, M. D.; LILLY, M. D. **Optimization of biocatalysts in organic media.** Laane, C.; Tramper, J.; Lilly, M. D., Eds.; Elsevier; Amsterdam, p. 65, 1987.

JULIEN, C.; MARCOUILLER, F.; BRETTEVILLE, A.; EL KHOURY, N. B.; BAILLARGEON, J.; HÉBERT, S. S.; AND PLANEL, E. **Dimethyl sulfoxide induces both direct and indirect tau hyperphosphorylation.** *PloS One*, v. 7, n. 6, p. e40020, 2012.

KISHIOKA, T.; IIDA, C.; FUJII, K.; NAGAE, R.; ONISHI, Y.; ICHI, I.; KOJO, S. **Effect of dimethyl sulphoxide on oxidative stress, activation of mitogen activated protein kinase and necrosis caused by thioacetamide in the rat liver.** *European Journal of Pharmacology*, v. 564, p. 190-195, 2007.

LAANE, C.; TRAMPER, J.; LILLY, M. D. **Biocatalysis in organic media: proceedings of an international symposium organized under the auspices of the working party on applied biocatalysis of the european federation of biotechnology and the working party on biocatalysts of the agricultural**

**university, Wageningen, the Netherlands, 7-10 december, 1986.** Elsevier Science Ltd, 1987.

LEO, A.; HANSCH, C.; ELKINS, D. **Partition coefficients and their uses.** *Chemical reviews*, v. 71, n. 6, p. 525-616, 1971.

LIMA, A. W. O.; & ANGNES, L. **Biocatálise em meios aquo-restritos: fundamentos e aplicações em química analítica.** *Química Nova*, v. 2, n. 22, p. 229-245, 1999.

NOTMAN, R.; NORO, M.; O'MALLEY, B.; AND ANWAR, J. **Molecular basis for dimethylsulfoxide (dms) action on Lipid membranes.** *Journal of the American Chemical Society*, v. 128, n. 43, p. 13982-13983, 2006.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. **Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe.** *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 49, n. 10, p. 4619-4626, 2001.

PLUMMER, J. M.; GREENBERG, M. J.; LEHMAN, H. K.; WATTS, J. A. **Competitive inhibition by dimethylsulfoxide of molluscan and vertebrate acetylcholinesterase.** *Biochemical Pharmacology*, v. 32, n. 1, p. 151-158, 1983.

REICHARDT, C. **Solvents Effects in Organic Chemistry.** Verlag Chemie; Weinheim, 1979.

SANKPAL, U. T.; ABDELRAHIM, M.; CONNELLY, S. F.; LEE, C. M.; MADERO-VISBAL, R.; COLON, J., SMITH, J.; SAFE, S.; MALIAKAL, P.; AND BASHA, R. **Small molecule tolfenamic acid inhibits PC-3 cell proliferation and invasion in vitro and tumor growth in orthotopic mouse model for prostate cancer.** *The Prostate*, v. 72, n. 15, p. 1648-1658, 2012.

SUN, T.; HO, C. **Antioxidant activities of buckwheat extracts.** *Food Chemistry*, v. 90, n. 4, p. 743-749, 2005.

TOUGU, V. **Acetylcholinesterase mechanism of catalysis and inhibition.** *Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents*, v. 1, n. 2, p. 155-170, 2001.

WATTS, J. A.; & HOOGMOED, R. P. **Dimethyl sulfoxide: inhibition of acetylcholinesterase in the mammalian heart.** *Biochemical Pharmacology*, v. 33, n. 3, p. 365-369, 1984.

WONG, Linda K.; REINERTSON, Eric L. **Clinical considerations of dimethyl sulfoxide.** *Lowa*



Biotecnologia  
NOTA CIENTÍFICA

**Scientia Amazonia, v. 7, n.3, B1-B6, 2018**  
Revista on-line <http://www.scientia-amazonia.org>  
ISSN:2238.1910

State University Veterinarian, v. 46, n. 2, p. 2, 1984.

YILMAZ, Y.; TOLEDO, R. T. **Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed**

**polyphenols.** Journal of Food Composition and Analysis, v. 19, n. 1, p. 41-48, 2006.

YU, L.; HALEY, S.; PERRET, J.; & HARRIS, M.; YU, L.; HALEY, S.; PERRET, J.; & HARRIS, M. **Antioxidant properties of hard winter wheat extracts.** Food Chemistry, v. 78, n. 4, p. 457-461, 2002.