



Efeitos do Dimetilsulfóxido sobre a Proliferação de Linfócitos Humanos *in vitro*

Angela FLORÃO ¹, Fernanda V.R.MATTANA ², Fabiana H.ROCHA ², Jeanine M.NARDIN ¹,
Julio C.MACHADO JUNIOR ¹ & Almeriane M.WEFFORT-SANTOS ¹ *

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas;

² Bolsista de Iniciação Científica,

Universidade Federal do Paraná, Avenida Prefeito Lothario Meissner, 632,
Campus Jardim Botânico, CEP 80210-170, Curitiba, PR, Brasil.

RESUMO. Dimetilsulfóxido (DMSO) é um solvente amplamente utilizado para diluir ou incorporar componentes ou misturas em meios aquosos para ensaios biológicos *in vitro*. Neste trabalho, seus efeitos sobre a proliferação de linfócitos humanos foram avaliados observando-se a multiplicação celular por citometria de fluxo, análise morfológica em citocentrifugados corados e quantificação de AgNOR. Células mononucleares de sangue periférico humano foram induzidas a proliferar por fitohemaglutinina na presença de DMSO (150-300mM), por 5 dias a 37°C e 5% de CO₂. Observou-se que o DMSO inibiu significativamente, proporcional à concentração, a proliferação de linfócitos. A morfologia celular mostrou predominância de linfócitos nas culturas tratadas com DMSO, enquanto baixos números de AgNORs, que são segmentos de DNA que transcrevem RNA ribossomal, foram encontrados. Estes resultados demonstram que o DMSO é um solvente inapropriado para estudos biológicos que envolvam imunomodulação de linfócitos humanos.

SUMMARY. "In vitro Investigation of Dimethylsulfoxide upon Human Lymphocyte Proliferation". Dimethylsulfoxide (DMSO) is a solvent widely used for diluting or including compounds or mixtures for *in vitro* biological assays. In this work, the effects of DMSO on human lymphocytes proliferation were evaluated through cell multiplication in a flow cytometer, morphological analyses on stained smears, and AgNOR quantification. Human peripheral blood mononuclear cells induced to proliferate by phytohemagglutinin were treated with DMSO (150-300mM) for 5 days at 37 °C, and 5% CO₂. DMSO inhibited significantly the lymphocyte proliferation in a dose-dependent manner. Lymphocyte morphology predominated in DMSO-treated cultures while low numbers of AgNOR, which are DNA segments that transcribe ribosomal RNA, were found. The results showed that DMSO is not appropriate for using as a solvent for biological assays involving human lymphocytes immunomodulation.

INTRODUÇÃO

Dimetilsulfóxido (DMSO) é um composto anfipático, com um domínio altamente polar e dois grupos apolares (I), tornando-se solúvel tanto em meio aquoso quanto orgânico (Fig. 1).

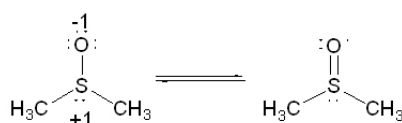


Figura 1. Dimetilsulfóxido (I).

Embora conhecido desde o século XIX, suas propriedades biológicas foram inicialmente descritas na década de 60 e, desde então, tem sido usado com diversas finalidades clínicas e laboratoriais, especialmente como agente crioprotetor no congelamento de células tronco para uso em

transplantes ¹, como veículo de drogas terapêuticas e, particularmente, como solvente em estudos biológicos ².

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do DMSO sobre as funções imunomodulatórias de linfócitos humanos, uma vez que este solvente tem sido amplamente utilizado como veículo para incorporar componentes de baixa solubilidade ou imiscíveis, como óleos essenciais e alcalóides, por exemplo, extraídos ou purificados de plantas medicinais em meio aquoso e essas células, por serem as principais protagonistas das respostas de defesa adaptativa, costumam ser avaliadas *in vitro* quando se deseja qualificar e quantificar a imunocompetência desses compostos. Para tanto, investigou-se seus efeitos sobre a proliferação de linfócitos huma-

PALAVRAS CHAVE: AgNOR, DMSO, Dimetilsulfóxido, Imunomodulação, Linfócitos.

KEY WORDS: AgNOR, DMSO, Dimethylsulfoxide, Immunomodulation, Lymphocytes.

* Autor a quem correspondência deve ser enviada, E-mail: almeriane@ufpr.br

nos em estado basal e estimulados por fitohemaglutinina obtidos de sangue periférico por citometria de fluxo, sobre sua morfologia em citocentrifugados corados e pela quantificação das regiões nucleolares organizadas impregnadas pela prata (AgNOR).

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de leucócitos humanos

Dez a vinte mililitros de sangue venoso anticoagulado com heparina sódica, colhidos de indivíduos sem manifestação de sinais ou sintomas de doença e sem uso de medicamentos, foram usados como fonte de leucócitos, após consentimento livre e esclarecido, cujo protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da UFPR, sob registro CEP/HC 10, EXT.059/2003-10.

Isolamento de células mononucleares

Sangue anticoagulado foi centrifugado (800g/25min) para obtenção do creme leucocitário, o qual foi re-suspenso em PBS ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 150 mM; Na_2HPO_4 150 mM; NaCl 154 mM, pH 7.2), transferido para frasco contendo *Ficoll-Paque™ PLUS* (Amersham, Biosciences) e centrifugado a 400g/30min em temperatura ambiente. Células mononucleares (MNC) recuperadas da interface do gradiente foram lavadas duas vezes com PBS (800g/5min), re-suspenso em RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% (v/v) de uma mistura de soros humanos (RPMI-S) e a concentração ajustada para 10^6 células/ml com auxílio de hemocítmetro de Neubauer.

Viabilidade e toxicidade celulares

MNC isolados foram diluídos em solução de Azul de Trypan a 0,4% (p/v) em PBS e sua viabilidade observada ao microscópio de luz. Células discriminadas como viáveis apresentavam-se íntegras, brilhantes, incolores e redondas, enquanto que as não viáveis mostraram-se coradas em azul, muitas com perda da definição de contorno. Somente amostras contendo $\geq 95\%$ de células viáveis foram utilizadas nos experimentos.

Ensaio de Imunomodulação

Em uma primeira série de experimentos, MNC foram incubados em RPMI-S na presença de 150 e 300 mM de DMSO, em placas estéreis de 96 cavidades (TPP), a 37 °C, por 5 dias, em atmosfera de 10% de CO_2 . Em alguns experimentos, 10% (v/v) do meio de cultura comercial denominado Meio para Cariótipo Enriquecido

com Fitohemaglutinina (Cultilab-Campinas/SP) foi adicionado à mistura (M-PHA). Em uma segunda série de experimentos, concentrações indicadas de DMSO foram adicionadas às suspensões de MNC contendo M-PHA somente após 72 h de incubação e re-incubadas por mais 48 h. Em outros, MNC foram primeiramente incubadas com DMSO por 24 h e, em seguida, as culturas foram adicionadas de 10% de M-PHA e re-incubadas por mais 96 h. Em paralelo, estudos semelhantes usando etanol absoluto em substituição ao DMSO foram realizados. Cada ensaio foi realizado em triplicata e, como resultado de cada experimento, utilizou-se a média da triplicata.

Ativação/proliferação de linfócitos avaliada por citometria de fluxo

A ativação e a proliferação de MNC foram analisadas, após incubação, por citometria de fluxo, usando um instrumento FACSCalibur (Becton & Dickinson), equipado com laser de Argônio (488nm) com detectores de dispersão para tamanho (FSC-H) e complexidade interna (SSC-H). Para cada análise, eventos foram adquiridos por 45 s, na velocidade média, em escala linear, e gráficos de pontos foram construídos. Janelas discriminatórias para as populações de linfócitos (R1), blastos (R2) e polimorfonucleares/debris celulares (R3) (Fig. 2) foram traçadas subjetivamente, baseadas em critérios de distribuição de populações hematopoéticas clássicas³. Os dados foram analisados usando-se o *software* WinMDI 2.8 e os resultados estão apresentados como índice de proliferação (IP), onde a média aritmética de triplicatas (X) dos valores obtidos por ensaio foram aplicadas como a seguir: $\text{IP} = X (\text{N}^\circ \text{ de células detectadas em R2})_{\text{teste}} / X (\text{N}^\circ \text{ de células detectadas em R2})_{\text{controle}}$. A porcentagem de transformação blástica foi avaliada usando-se a média aritmética de triplicatas (X) dos valores obtidos, como a seguir: $\text{TB} (\%) = [(X \text{ células presentes em R2}) - (X \text{ células presentes em R1})] / (X \text{ células presentes em R2}) \times 100$.

Ativação de linfócitos avaliada morfológicamente

Após incubação, citocentrifugados contendo 8×10^4 MNC foram preparados em uma centrífuga *Cytopro™* (Wescor), corados com May-Grünwald-Giemsa e as populações diferenciadas e enumeradas em imersão (x1000). Seguindo critérios morfológicos clássicos⁴, células pequenas, com elevada relação núcleo-citoplasmática,

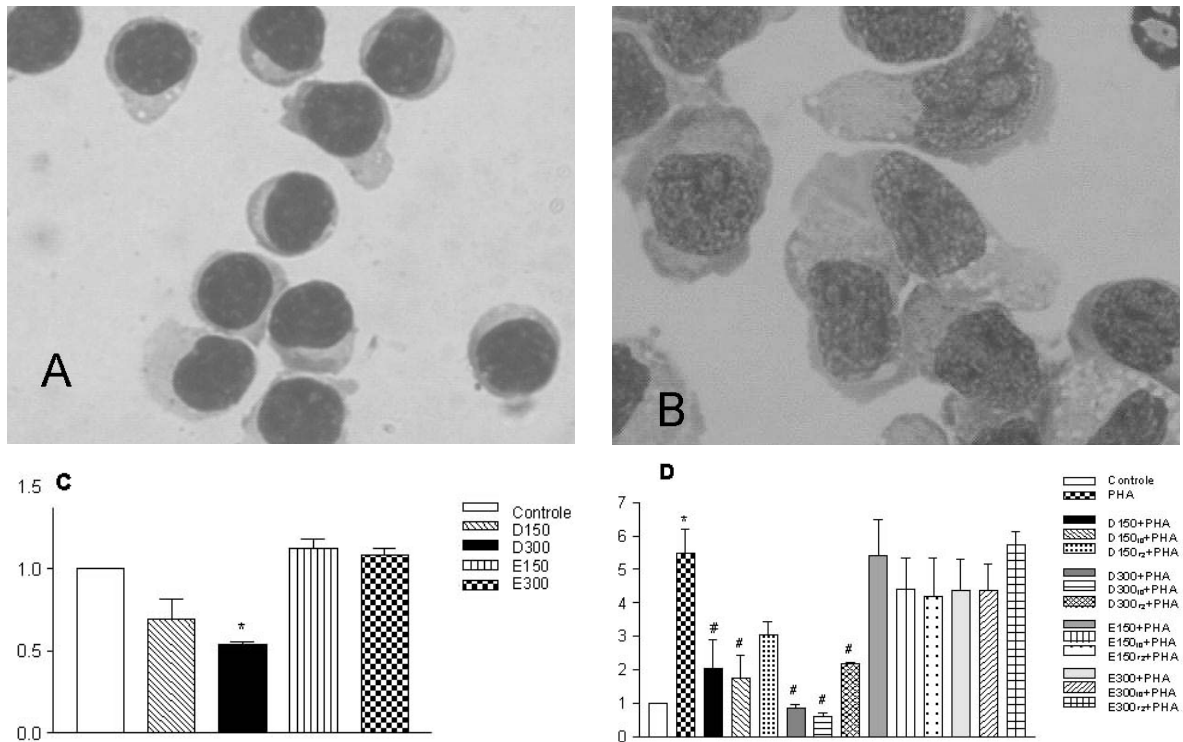


Figura 2. Efeito do DMSO sobre a proliferação de linfócitos humanos avaliada por citometria de fluxo. Células mononucleares humanas (MNC) foram tratadas com DMSO (D) ou etanol (E), 150 ou 300(l/ml e incubadas a 37 °C, por cinco dias, em atmosfera de CO₂. Em alguns experimentos, fitohemaglutinina (PHA) foi acrescentada. Em seguida, citocentrifugados foram preparados e corados com May-Grunwald-Giemsa e linfócitos (A) e linfoblastos (B) puderam ser distinguidos pela morfologia característica quando observados sob microscopia comum (1000x). As colunas representam a média±EPM do índice de proliferação, obtido da relação entre o número de eventos detectados por citometria de fluxo na região R2 dos experimentos contendo DMSO ou etanol e o número obtido no controle de, pelo menos, três experimentos independentes, realizados em triplicata (C). Em alguns experimentos, os MNC foram previamente incubados com PHA (t₂) e, em seguida, adicionados dos reagentes (D); em outros, eles foram previamente tratados com DMSO ou etanol e, após 24 horas, adicionados de PHA (t₀). * $p < 0,05$ em relação ao controle; # $p \leq 0,05$ em relação a PHA (ANOVA+Tukey).

citoplasma escasso azul, sem granulação específica, núcleo arredondado, apresentando cromatina densa, com agregados irregulares e eventual presença de estruturas semelhantes a nucléolos, porém mal definidos, foram escrutinizadas como linfócitos. Células maiores do que os linfócitos, com citoplasma azul intenso, geralmente vacuolizado, com Complexo de Golgi desenvolvido, cromatina delicada, presença de dois ou mais nucléolos visíveis, proeminentes e delineados foram consideradas como blastos ou linfoblastos.

Regiões Nucleolares Organizadas Impregnadas pela Prata - AgNOR

Para o ensaio de AgNOR, todo o material utilizado foi previamente desmineralizado em ácido nítrico 30% por 24 h. Citocentrifugados contendo 8×10^4 células MNC foram fixados em solução de Carnoy (etanol absoluto:clorofórmio:ácido acético - 6:3:1) por 30 min e recobertos

com solução A (gelatina 2% em ácido fórmico 1% e solução de nitrato de prata 50% em água destilada, na proporção de 1:2, mantidas a 37 °C por 25 min). Após lavagem com água, os preparados foram imersos, subseqüentemente, por três minutos, em solução de hipossulfito de sódio 5% e em etanol absoluto. Finalmente, o material foi corado com Solução de Verde de Malaquita 3% (10 min) e mantido abrigado da luz até sua leitura. A contagem de AgNOR foi realizada sob microscopia de imersão, usando-se critérios previamente estabelecidos ^{5,6}, onde precipitados pequenos, arredondados e bem delimitados foram enumerados como AgNOR tipo I; precipitados maiores, disformes, AgNOR tipo II, e presença simultânea de AgNOR tipo I e tipo II, como AgNOR complexo, de acordo com a classificação de Shome & Khurana ⁷.

Análise Estatística

Os resultados estão apresentados como a

média±1 erro padrão da média (EPM), quando n≥3, e como a média±1 desvio padrão (DP), quando n=2. Para análise estatística dos resultados, usou-se ANOVA - *one way* (InStatSoft); quando apropriado, aplicou-se o teste *post hoc* de Tukey. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os efeitos do DMSO sobre a proliferação espontânea de linfócitos humanos avaliada por citometria de fluxo estão demonstrados na Fig. 2C, onde se observou inibição significativa dose-dependente, com IP de 0,69±0,1 e de 0,54±0,02 [n=3; $F(4,10)=13,81$; $p<0,01$], para 150 (D150) e 300 mM (D300) de DMSO, respectivamente, em relação ao controle. Este perfil se reproduziu, porém com maior intensidade, na população estimulada por PHA (Fig. 1D), onde o IP de 5,49±0,7 observado diminuiu significativamente para 2,05±0,8 [n=3; $F(13,41)=7,79$; $p<0,05$] e 0,84±0,1 [n=3; $F(13,41)=7,79$; $p<0,001$] na presença de 150 (D150+PHA) e 300 mM (D300+PHA) de DMSO, respectivamente. Em contraste, nenhuma ação do etanol (E) foi observada usando-se o mesmo protocolo experimental.

Quando a população não estimulada foi analisada em citocentrifugados corados (Fig. 2A), praticamente todas as células mantiveram-se como linfócitos (Tabela 1), em contraste com àquela exposta a PHA (Fig. 2B), onde houve o predomínio de linfoblastos. Foi também notável a diferença morfológica observada para as po-

pulações estimuladas expostas ao DMSO, onde as células retiveram as características morfológicas de linfócitos (DMSO+PHA), em um percentual muito próximo aquele observado para a população de MNC não estimulada (controle).

Ao se analisar a distribuição dessas populações em um citômetro de fluxo, cujos gráficos representam uma combinação de sinais que refletem não só o tamanho e a complexidade interna de cada tipo celular analisado, mas também incluem suas características topográficas e de densidade óptica ⁸, observou-se que a maioria das células se deslocou da região R1 para a R2 somente na presença de PHA. Ou seja, nas culturas realizadas para avaliação da proliferação basal de linfócitos, a maioria das células manteve-se na região R1, característica de linfócitos não ativados (Fig. 3A). Nas culturas onde somente PHA foi acrescentada (Fig. 3B), observou-se que 83,4±2,0% das células deslocaram-se para a região R2 [$F(13,46)=44,90$; $p<0,001$ em relação à população sem PHA]. Na presença de DMSO ou etanol, independente da concentração, a maioria das células permaneceu em R1 (Fig. 2C). Entretanto, o acréscimo de DMSO, mas não o de etanol, diminuiu significativamente a percentagem de células em R2 nas culturas estimuladas por PHA (Fig. 3D), com valores de 75,4±0,9% e 50,0±2,5%, respectivamente para 150 [$F(13,46)=44,90$; $p<0,001$] e 300 mM de solvente.

Regiões nucleolares organizadas (NOR) são alças de DNA localizadas no braço curto dos cromossomos acrocêntricos humanos, as quais

	Linfócitos	Linfoblastos	Linfócitos	Linfoblastos
MNC	89	11	-	-
PHA	16	84	-	-
	150 mM		300 mM	
DMSO	99	01	98	02
Etanol	92	08	89	11
DMSO + PHA	42	58	82	18
DMSO t ₀ + PHA t ₂₄	36	64	88	12
DMSO t ₇₂ + PHA t ₀	25	75	25	75
Etanol + PHA	10	90	15	85
Etanol t ₀ + PHA t ₂₄	15	85	11	89
Etanol t ₇₂ + PHA t ₀	20	80	11	89

Tabela 1. Influência de DMSO sobre a morfologia de linfócitos humanos cultivados na presença de fitohemaglutinina, avaliada em citocentrifugados corados com May-Grunwald-Giemsa. Células mononucleares (MNC) obtidas de sangue periférico foram tratadas com as concentrações indicadas dos solventes, incubadas a 37 °C, por cinco dias, em atmosfera de CO₂. Em alguns experimentos, os MNC foram simultaneamente expostos a fitohemaglutinina (PHA); em outros, incubou-se MNC com as concentrações indicadas dos solventes por 24 horas e, em seguida, adicionou-se PHA; ainda, em outros, incubou-se as células com PHA por 72 horas e, em seguida, adicionou-se o solvente. A morfologia foi avaliada em citocentrifugados corados com May-Grunwald-Giemsa, sob imersão em microscópio comum. Cada valor representa a porcentagem média de células obtidas de dois experimentos, onde um mínimo de 100 células por experimento foi observado.

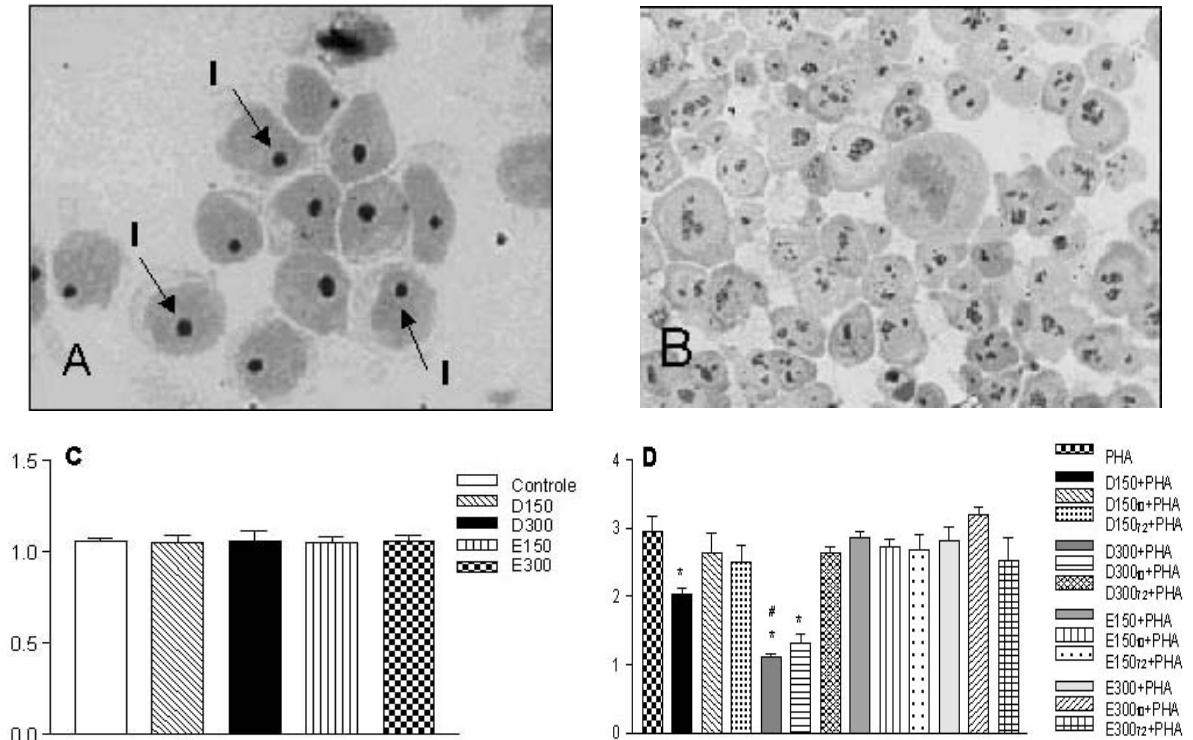


Figura 3. Efeito do DMSO sobre a formação de AgNOR em linfócitos humanos. Células mononucleares humanas foram tratadas com DMSO (D) ou etanol (E), 150 ou 300 mM, e incubadas a 37 °C, por cinco dias, em atmosfera de CO₂. Em alguns experimentos, os mononucleares foram tratados com fitohemaglutinina (PHA). Em seguida, citocentrifugados foram preparados, fixados e submetidos à impregnação argêntica para definição das regiões nucleolares impregnadas pela prata (setas) para revelação de AgNOR, os quais foram classificados como tipo (A-I), tipo II (B-II) e complexo (I+II) (1000x). As colunas representam o n° médio de AgNOR±DP por célula (n=2, experimentos independentes), obtido nas culturas em estado basal (C) e estimuladas por PHA (D). * $p \leq 0,05$ em relação a PHA; # $p \leq 0,05$ em relação a DMSO 150 mM acrescido de PHA (ANOVA + Tukey).

codificam RNA ribossomal⁹⁻¹¹, cujo tamanho e forma variam entre diferentes tipos celulares e mesmo entre células iguais, em função do estado de proliferação celular¹². A impregnação argêntica para demonstração de NOR (AgNOR) é resultante da formação de complexos entre a prata e as proteínas nucleolares diferentes das histonas¹²⁻¹⁴, mas envolvidas na regulação da transcrição ou processamento do transcrito primário, localizadas dentro dos nucléolos⁹⁻¹¹. Os AgNOR podem ser visualizados ao microscópio óptico como pontos castanhos ou negros (Fig. 4, A e B), bem definidos, que, nas células interfásicas, estão localizados exclusivamente nos nucléolos^{10,15}. Estabeleceu-se, também *in vitro*, uma correlação inversa entre o tamanho dos AgNOR e o tempo de duplicação celular¹⁵⁻¹⁷. Sendo a contagem de AgNOR paralela à atividade mitótica e estando correlacionada à taxa de renovação celular¹⁸, explorou-se este comportamento dos linfócitos na presença DMSO, em seu estado basal e ativado por PHA.

Clara e significativa diferença no número

médio de AgNOR por célula foi encontrada em linfócitos estimulados por PHA em relação aos não estimulados [$F(5,6)=122,00$; $p<0,001$]. Como ilustra a Fig. 4C, a maioria das células cultivadas na ausência de mitógeno apresentou somente um AgNOR ($1,05 \pm 0,02$), fato que se reproduziu para linfócitos cultivados somente na presença de DMSO ou de etanol, independente da concentração. Entretanto, quando expostos a PHA, observou-se uma média de $2,9 \pm 0,2$ AgNOR por célula (Fig. 4D).

Esses resultados estão de acordo com vários estudos que relacionam o número e a morfologia de AgNOR, especialmente entre células normais e cancerosas. Neste contexto, Lee e colegas¹⁹ relataram que linfócitos de sangue periférico apresentam cerca de um AgNOR por célula, sendo aproximadamente todos do mesmo tamanho e com morfologia arredondada. De fato, este tipo de morfologia, ilustrada na Fig. 4A, foi observado para as culturas sem adição de mitógeno, ou seja, aquelas em que os linfócitos, por não sofrerem estimulação, apresentaram-se em

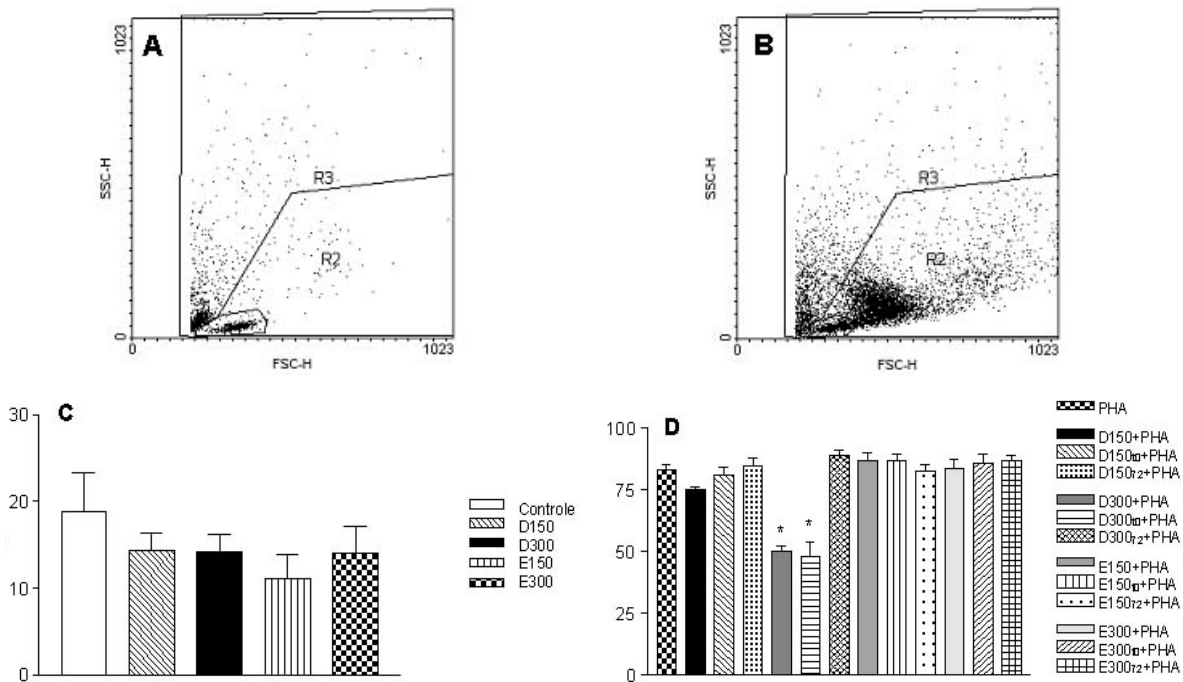


Figura 4. Efeito do DMSO sobre a transformação blástica de linfócitos humanos. Células mononucleares humanas foram tratadas com 150 ou 300 mM de DMSO (D) ou etanol (E) e incubadas a 37 °C, por cinco dias, em atmosfera de CO₂. Os gráficos em pontos representam populações celulares detectadas por citometria de fluxo, onde as características de tamanho (FSC-H) e complexidade interna (SSC-H) foram utilizadas para distinguir cada população e definir as regiões para avaliação da proliferação celular dos grupos controle (A) e tratado com fitohemaglutinina (B). Cada ponto representa uma célula detectada no sistema. R1 denota a região delimitada para linfócitos não estimulados (basais), enquanto R2 denota a região para linfoblastos. R3 corresponde a granulócitos e debris celulares. Cada coluna representa a porcentagem média±EPM dos valores resultantes da relação entre R1 e R2, descrita em Material e Métodos, obtidos por citometria de fluxo (C). Em alguns experimentos, as células foram incubadas com as concentrações indicadas dos solventes por 24 horas (t₂₄) e, após adicionou-se meio contendo PHA; em outros, incubou-se as células com PHA por 72 horas e, em seguida, adicionou-se o solvente (t₇₂) (D). * p ≤ 0,05 em relação a PHA; n=3-6.

absoluta maioria (98,0±2,8%) com morfologia tipo I (Fig. 5A). Em contraste, maior porcentagem de células com morfologia complexa [20,5±6,4%; $F(5,6)=208,15$; $p<0,05$] e do tipo II (9,0±0,0%), ilustradas na Figura 4B, em detrimento da morfologia do tipo I [70,5±6,4%; $F(5,6)=208,15$; $p<0,001$] foi observada somente quando linfócitos foram cultivados na presença de PHA (Fig. 5, B e C).

Com a finalidade de se esclarecer as diferenças de comportamento induzidas pelo DMSO, duas séries de experimentos foram realizadas. Na primeira, além da incubação simultânea com mitógeno, concentrações específicas dos solventes foram adicionadas somente após 72 h de incubação dos MNC com PHA. Em outra, PHA foi adicionada às culturas de MNC previamente incubadas por 24 h com os solventes.

Os resultados obtidos estão demonstrados na Fig. 2D, onde os IP obtidos para MNC incubados primeiramente com o DMSO e depois acres-

cidos de PHA foram, respectivamente, de 1,74±0,68 [$F(13,41)=7,79$; $p<0,05$] e 0,60±0,10 [$F(13,41)=7,79$; $p<0,001$], para 150 (D150_{t0}+PHA_{t24}) e 300 mM (D300_{t0}+PHA_{t24}), significativamente menores em relação ao grupo tratado apenas com PHA, mas sem diferença em relação ao IP obtido na incubação concomitante de DMSO e PHA (D150 ou D300+PHA).

A transformação blástica dessa população também foi significativamente inibida, com somente 48,1±6,1% [$F(13,46)=44,90$; $p<0,001$] das células ocupando a região R2 quando 300 mM de DMSO foram acrescidos antes de PHA (Fig. 3D - D300_{t0}+PHA_{t24}), com valor similar ao encontrado quando houve incubação simultânea (Fig. 3D - D300+PHA). Estes resultados estão em concordância com os valores de IP obtidos, indicando, a princípio, uma provável atuação dose-dependente do DMSO nos mecanismos de ativação celular que os levam à transformação blástica.

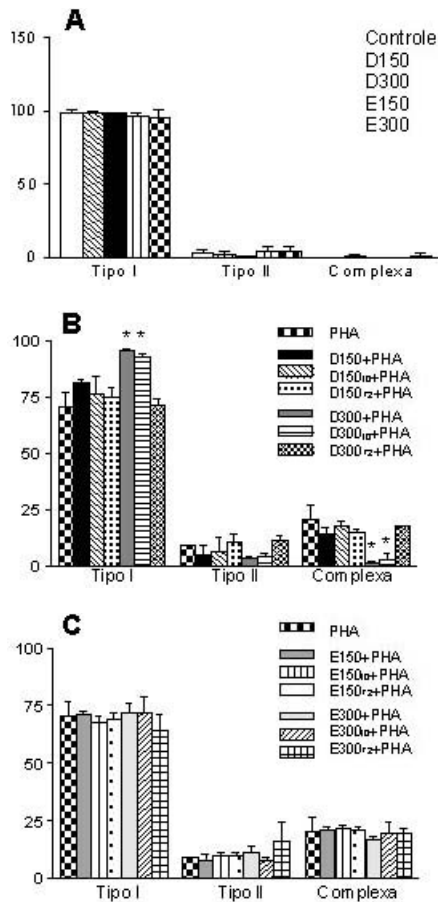


Figura 5. Efeito do DMSO sobre a morfologia de AgNOR em linfócitos humanos. Mononucleares foram tratados com DMSO (D) ou etanol (E), 150 ou 300 mM e incubadas a 37 °C, por cinco dias, em atmosfera de CO₂. Em alguns experimentos, fitohemaglutinina (PHA) foi adicionada. Em seguida, citocentrifugados foram preparados e corados para revelação de AgNOR. As colunas representam a porcentagem média de células (DP contendo AgNOR) classificados em tipos I, II e complexo (I+II), como descrito em Material e Métodos (n=2, experimentos independentes) de células em estado basal (A), estimuladas por PHA e DMSO (B) e por PHA e etanol (C). **p* ≤ 0,05 em relação a PHA (ANOVA + Tukey).

Para a população previamente incubada com o mitógeno e posteriormente acrescida de DMSO (Fig. 2D), o IP foi significativamente menor para a concentração de 300 mM (D300_{t72}+PHA_{t0}) em relação ao grupo tratado com PHA, sendo de 2,18±0,04 [n=3; *F*(13,41)=7,79; *p*<0,05], enquanto para a concentração de 150 mM (D150_{t72}+PHA_{t0}) o IP foi de 3,06±0,4 (n=3). Importante ressaltar que esses resultados não foram decorrentes de efeito tóxico, uma vez que a viabilidade celular foi avaliada durante todos os procedimentos experimentais (Tabela 2) e somente nas culturas em que o DMSO foi adicio-

Solvente	Viabilidade (%)	
	10 µl/ml	20 µl/ml
DMSO	86,5±6,8	96,99±3,01
DMSO + PHA	96,4±3,6	>99
DMSO _{t0} + PHA _{t24}	91,8±8,2	>99
DMSO _{t72} + PHA _{t0}	49,7±12,0	32,6±2,0
Etanol	>99	>99
Etanol + PHA	>99	92,2±7,8
Etanol _{t0} + PHA _{t24}	90,3±9,7	>99
Etanol _{t24} + PHA _{t0}	87,5±5,9	91,5±4,2

Tabela 2. Toxicidade do DMSO sobre células mononucleares humanas avaliada por citometria de fluxo. Células mononucleares (MNC) obtidas de sangue periférico foram tratadas com as concentrações indicadas dos solventes, incubados a 37 °C, por cinco dias, em atmosfera de CO₂. Em alguns experimentos, os MNC foram simultaneamente expostos a fitohemaglutinina (PHA); em outros, incubou-se suspensão de MNC com as concentrações indicadas dos solventes por 24 horas e, após, adicionou-se meio contendo PHA. Em outros, incubou-se as células com PHA por 72 horas e, em seguida, adicionou-se o solvente. Cada valor representa a porcentagem média de viabilidade ± EPM obtida entre o número de eventos detectados por citometria de fluxo dos experimentos contendo DMSO ou etanol e o número obtido no controle de células não tratadas ou expostas a PHA (n=3).

nado após a ação do mitógeno é que se observou diminuição no número de células viáveis.

Com relação ao número médio de AgNOR/célula (Fig. 4D), observou-se diminuição dose-dependente significativa na população tratada simultaneamente com DMSO e PHA, com 2,0±0,09 [150 mM; *F*(12,13)=21,24; *p*<0,05] e 1,1±0,05 [300 mM; *F*(12,13)=21,24; *p*<0,001] precipitados argênticos por célula, respectivamente. Este valor manteve-se em 1,3±0,1 [*F*(12,13) = 21,24; *p*<0,001] quando 300 mM de DMSO foram adicionados antes de PHA, enquanto que, para 150 mM, o valor encontrado foi de 2,6±0,3. Na população tratada com DMSO após incubação prévia com PHA, 2,5±0,3 e 2,6±0,09 foram os números médios de AgNOR/célula obtidos para 150 e 300 mM, respectivamente.

Observou-se, simultaneamente, que a morfologia do tipo I foi que predominou quando os MNC foram expostos a 300mM de DMSO, com uma média de 95,5(0,7% [*F*(20,21)=172,08; *p*<0,001] no tratamento simultâneo de DMSO e PHA, e de 93,0±1,4% [*F*(20,21)=172,08; *p*<0,001] quando DMSO foi adicionado antes da PHA (Fig. 5B). A morfologia complexa apareceu em somente 1,0±0,0% [*F*(20,21)=172,08; *p*<0,01] das células quando da adição concomitante de mitó-

geno e solvente, e em $3,0 \pm 2,8\%$ [$F(20,21) = 172,08$; $p < 0,05$] das células na adição prévia de DMSO, deixando $3,5 \pm 0,7\%$ e $4,0 \pm 1,4\%$, respectivamente, para a morfologia do tipo II.

Para o etanol, quando se incubou os MNC previamente com DMSO e, após, adicionou-se PHA, os valores de IP observados foram de $4,41 \pm 0,9$ ($n=3$, $E150_{t0}+PHA_{t24}$) e $4,37 \pm 0,8$ ($n=3$, $E300_{t0}+PHA_{t24}$), respectivamente, para as concentrações de 150 e 300 mM (Fig. 2D). Na incubação concomitante de etanol e PHA, deve-se ressaltar que, quanto à morfologia, $86,6 \pm 2,7\%$ e $82,6 \pm 2,4\%$ de blastos, respectivamente, foram observados (Tabela 1). De igual modo, o etanol não interferiu com o número médio de AgNOR por célula (Fig. 4, C e D), assim como não alterou a morfologia destes (Fig. 5, A e C), independente do protocolo experimental usado e da presença de PHA.

Os resultados apresentados sugerem que o DMSO, mas não o etanol, interfere, de forma dose-dependente, na imunomodulação de linfócitos humanos, quando submetidos às condições experimentais propostas. Análise mais minuciosa dos dados indica que esta interferência é mais acentuada na etapa de ativação celular, ou seja, nos mecanismos que promovem sua transformação, imediatamente anterior à proliferação. Esta afirmação encontra suporte no fato de que os MNC pré-tratados com DMSO mantiveram morfologia predominante de linfócitos após exposição ao mitógeno e com baixos números de AgNOR, cuja morfologia simples (tipo D) implica características de células com reduzida atividade mitótica, como já sugerido por outros¹⁸.

Estes resultados contrastam com aqueles observados para o etanol, os quais foram semelhantes aos obtidos nas culturas crescidas somente de mitógeno e que demonstraram presença intensa de blastos, com alta prevalência de células com morfologia de AgNOR complexa.

Deve-se ressaltar que a possibilidade de um efeito tóxico do DMSO sobre os MNC foi descartada ao se analisar a viabilidade dessas células. Entretanto, é interessante notar que nas culturas em que ele foi adicionado 72 h após a ação do mitógeno, elevada porcentagem de células foram registradas na região R3, onde se localizam debris celulares. Porém, essas mesmas culturas registraram a presença majoritária de células blásticas, independente da concentração de DMSO, com quantidade de AgNOR próximo aos valores obtidos para os controles. Sendo assim, é possível que haja uma ação tóxica do DMSO seletiva para células blásticas.

A interferência do DMSO no metabolismo

celular não é desconhecida. Há relatos, por exemplo, de que sua presença é capaz de induzir diferenciação celular em várias linhagens mielóides leucêmicas, como a HL-60^{20,21}, e a eritroleucemia murina de Friend^{22,23}, enquanto que, para células de linhagem linfóide²⁴, como as dos linfomas de Raji e Akata, L1210^{25,26}, o DMSO mostrou-se hábil em bloquear, de forma reversível, o ciclo celular em G1. Sua atuação sobre a apoptose celular tem sido amplamente descrita, tanto para células de linhagem mielóide²⁷ como linfóide²⁸.

Vários estudos relacionam a interferência do DMSO com o influxo de íons cálcio. Bloqueio do aumento de Ca^{++} intracelular induzido por hipóxia em células murinas na presença de DMSO²⁹ já foi relatado, assim como o aumento de Ca^{++} intracelular induzido por neurotensina em células HL-60 desapareceu após tratamento com DMSO³⁰. Michel mostrou redução significativa nas elevações de Ca^{++} causada por adrenalina e pelo neuropeptídeo Y em presença de DMSO em células humanas de eritroleucemia³¹. Reynaud e colaboradores relataram similar interferência do DMSO sobre o efeito da hepoxilina A₃ em neutrófilos humanos³². O grupo de McConnell, usando membranas isoladas de eritrócitos humanos, mostrou que o DMSO inibe a estimulação da calmodulina ATPase Ca^{++} - Mg^{++} dependente e Na^{+} - K^{+} dependente, sem nenhum efeito significativo sobre a calmodulina ATPase independente de Ca^{++} - Mg^{++} ou sobre a atividade da ATPase dependente de Mg^{++} ³³.

Como o influxo de Ca^{++} é central na ativação de linfócitos e ocorre em menos de cinco minutos após a interação do mitógeno PHA com receptores na superfície de linfócitos humanos³⁴, um bloqueio nesta etapa pelo DMSO ratificaria os efeitos observados neste trabalho relacionados à inibição da proliferação de linfócitos, provavelmente pela atuação deste nas etapas que envolvem a ativação celular. Em adição, o fato de que o conteúdo de RNA em linfócitos estimulados dobra em 48 h³⁵ contribuiria para sustentar as alterações na morfologia e no número médio de AgNOR encontrado por célula, quando DMSO e PHA estavam simultaneamente presentes no meio de cultura, ou quando da adição primária do DMSO, fato não observado quando o solvente foi acrescentado somente após a incubação com o mitógeno. Neste último caso, é possível que as células já tivessem sofrido estimulação pela PHA e aumentado seu conteúdo em RNA quando da adição do solvente, não alterando, dessa forma, o perfil morfológico dos AgNOR.

CONCLUSÃO

A coerência entre os resultados obtidos com diferentes sistemas biológicos e moduladores de Ca^{++} intracelular e o conjunto de dados aqui relatados sugerem uma ação inespecífica do DMSO, como já sugerido por outros². Entretanto, os resultados deste estudo indicam que o DMSO inibe, de forma clara e significativa, a proliferação de linfócitos humanos estimulados por fitohemaglutinina, de maneira dose-dependente. Além disso, sugerem interferência do DMSO sobre os mecanismos de ativação celular.

Os dados relatados têm relevância potencial no sentido de que a ausência de compreensão dos efeitos do DMSO sobre um sistema biológico *in vitro* pode ocasionar interpretação equivocada dos resultados, provocada por artefatos experimentais e que deve ser considerada, particularmente quando se deseja incorporar substâncias em meio aquoso com a finalidade de se investigar atividades imunomodulatórias usando células mononucleares humanas como modelo biológico.

Agradecimentos. Os autores agradecem a CAPES, ao CNPq e a Fundação Araucária pelo suporte financeiro aos bolsistas A.F., F.V.R.M. e F.H.R., respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Galmes, A., J. Besalduch, J. Bargay, N. Matamoros, M. Morey, A. Novo & A. Sampol (1995) *Leuk. Lymphoma* **17**: 181-4.
- Santos, N.C., J. Figueira-Coelho, J. Martins-Silva & C. Saldanha (2003) *Biochem. Pharmacol.* **65**: 1035-41.
- Civin, C.I. & M.R. Loken (1987) *Int. J. Cell Cloning* **5**: 267-88.
- Paraskevas, F. & J. Foerster (1993) In "Wintrobe's clinical hematology" (G.R. Lee, J. Foerster, J. Lukens, F. Paraskevas, J.P. Greer & G.M. Rodgers, eds.), p. 326-53. Lea & Febiger, Philadelphia, págs. 326-53.
- Trere, D. (2000) *Micron* **31**: 127-31.
- Gaines, H., L. Andersson & G. Biberfeld (1996) *J. Immunol. Meth.* **195**: 63-72.
- Shome, D.K. & N. Khurana (1999) *Am. J. Hematol.* **61**: 149-52.
- Shapiro, H.M. (1985) "Practical flow cytometry." Alan R. Liss, Inc., New York, págs. 1-84.
- Crocker, J. (1998) In "Pathology of the nucleus" (Underwood, J.C.E., ed.). Springer-Verlag, London, págs. 91-149.
- Derenzini, M. & D. Ploton (1991) *Int. Rev. Exp. Pathol.* **32**: 149-92.
- Mamaev, N.N. & S.E. Mamaeva (1990) *Int. Rev. Cytol.* **121**: 233-66.
- Goodpasture, C. & S.E. Bloom (1975) *Chromosoma* **53**: 37-50.
- Howell, W.M. & D.A. Black (1980) *Experientia* **36**: 1014-15.
- Ploton, D., M. Menager, P. Jeannesson, G. Himber, F. Pigeon & J.J. Adnet (1986) *Histochem. J* **18**: 5-14.
- Derenzini, M., A. Pession & D. Trere (1990) *Lab. Invest.* **63**: 137-40.
- Trere, D., A. Pession & M. Derenzini (1989) *Exp. Cell Res.* **184**: 131-7.
- Ofner, D., A. Hittmair, C. Marth, C. Ofner, M. Totsch, G. Daxenbichler, G. Mikuz, R. Margreiter & K.W. Schmid (1992) *Pathol. Res. Pract.* **188**: 742-6.
- Ivanyi, J.L., A. Kiss & B. Telek (1992) *Acta Histochem.* **93**: 453-61.
- Lee, W., Y. Kim, K.Y. Lee, C.S. Kang, K.S. Lee, S.I. Shim & K. Han (1999) *Cancer Genet. Cytogenet.* **113**: 14-8.
- Koeffler, H.P. & D.W. Golde (1980) *Blood* **56**: 344-50.
- Yen, A., D. Brown & J. Fishbaugh (1987) *Exp. Cell Res.* **173**: 80-4.
- Traganos, F., C. Buetti, Z. Darzynkiewicz & M.R. Melamed (1984) *J. Natl. Cancer Inst.* **73**: 193-204.
- Suthanthiran, M., A.L. Rubin, A. Novogrodsky & K.H. Stenzel (1982) *Transplantation* **33**: 534-40.
- Takase, K., M. Sawai, K. Yamamoto, J. Yata, Y. Takasaki, H. Teraoka & K. Tsukada (1992) *Cell Growth Differ.* **3**: 515-21.
- Kudo, H., T. Nakayama, Y. Mano, S. Suzuki, S. Sassa & S. Sakamoto (2002) *Cell. Biol. Int.* **26**: 211-15.
- Sawai, M., K. Takase, H. Teraoka & K. Tsukada (1990) *Exp. Cell Res.* **187**: 4-10.
- Vondracek, J., K. Soucek, M.A. Sheard, K. Chramostova, Z. Andrysik, J. Hofmanova & A. Kozubik (2006) *Leuk. Res.* **30**: 81-9.
- Trubiani, O., E. Salvolini, R. Staffolani, R. Di Primio & L. Mazzanti (2003) *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **16**: 253-59.
- Zhang, X.Q. & C. Eyzaguirre (1999) *Brain Res.* **818**: 118-26.
- Choi, S.Y., H.D. Chae, T.J. Park, H. Ha & K.T. Kim (1999) *Br. J. Pharmacol.* **126**: 1050-56.
- Michel, M.C. (1998) *Eur. J. Pharmacol.* **348**: 135-41.
- Reynaud, D., P.M. Demin, M. Sutherland, S. Nigam & C.R. Pace-Asciak (1999) *FEBS Lett.* **446**: 236-38.
- McConnell, E.J., M.J. Wagoner, C.E. Keenan & B.U. Raess (1999) *Biochem. Pharmacol.* **57**: 39-44.
- Cooper, H.L. (1972) *Transplant Rev.* **11**: 3-38.
- Greaves, M. & G. Janossy (1972) *Transplant Rev.* **11**: 87-130.