



## AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMUTAGÊNICO DE *Lactobacillus paracasei* EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster*

Vanessa de Souza Bizarro<sup>1</sup>  
Renata Chequeller de Almeida<sup>2</sup>  
Rafael Rodrigues Dihl<sup>3</sup>  
Mauricio Lehmann<sup>4</sup>

### Resumo

Sendo as bactérias ácido lácticas (BALs) os microorganismos probióticos considerados mais importantes, uma vez que são classificadas como autóctones no trato gastrointestinal humano de pessoas saudáveis, novas perspectivas de estudos relacionados a estes organismos podem fornecer informações para o desenvolvimento de linhagens não patogênicas e de interesse econômico, uma vez que apresentam uma ampla atividade química e probiótica. Considerando a amplitude de efeitos benéficos atribuídos aos probióticos, é também importante avaliarmos a sua ação antimutagênica frente os diferentes danos genéticos. Neste sentido, o presente estudo avaliou a atividade antimutagênica da linhagem LAC104 de *Lactobacillus paracasei* proveniente de queijo artesanal nativo da Região Nordeste do estado do Rio Grande do Sul. Para tanto, foi utilizado o teste para a Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Os resultados da atividade antimutagênica utilizando os protocolos de pré- e pós-tratamento, mostram que houve efeito protetor em algumas concentrações em ambos os sistemas de tratamento com as bactérias vivas e mortas.. Ainda que os dados aqui apresentados sejam preliminares demonstram que a linhagem LAC104 pode ser capaz de modular os efeitos mutagênicos do agente alquilante EMS através de diferentes mecanismos, como interferência nos sistemas de reparação do DNA, atividade de enzimas de detoxificação ou interação direta com o mutágeno. Estes dados reforçam as informações prévias descritas na literatura científica, que mostram a atividade protetora dos probióticos sobre danos genéticos induzidos por agentes químicos.

**Palavras chave:** Bactérias ácido lácticas; mutação; recombinação; teste SMART; antimutagenicidade.

### INTRODUÇÃO

Atualmente, as utilizações e aplicações propostas quanto ao uso de bactérias ácido lácticas (BALs) em diversos setores têm crescido notoriamente devido à sua enorme importância industrial (SANDERS et al., 2013). Paralelamente a este aumento crescente, desenvolveu-se um quadro de evolução comportamental por meio dos consumidores em busca de uma alimentação benéfica à saúde (Annunziata e Vecchio, 2013). Para tanto, indústrias agroalimentares integraram novos produtos, sobretudo lácticos, aos quais são atribuídas qualidades probióticas (ASHRAF; SHAH, 2011). Em virtude dos diversos benefícios, deve-se ter em vista que cada propriedade é cepa-dependente e, portanto, não há uma linhagem capaz de prover todos os benefícios propostos, assim como nem todas as linhagens da mesma espécie proporcionam os mesmos efeitos, devendo ser confirmada por experimentos *in vitro*, experimentos com animais e ensaios clínicos (SUSKOVIC et al., 2010).

Durante a última década, muitos estudos têm tentado determinar se componentes da

<sup>1</sup>Aluna do Curso de Biomedicina – Bolsista PIBIC/CNPq

<sup>2</sup>Aluna de Doutorado do PPGBIOSAUDE

<sup>3</sup>Professor do Curso de Biologia e PPGBIOSAUDE

<sup>4</sup>Professor do Curso de Engenharia Ambiental e PPGBIOSAUDE – mauriciol@ulbra.br

dieta podem ser usados com sucesso para quimioprevenção do câncer. As BALs e seus produtos fermentados são capazes de conferir uma variedade de benefícios nutricionais e terapêuticos importantes, como atividade antimutagênica e antigenotóxica, tanto *in vitro* como *in vivo*, bem como propriedades antitumorais (COMMANE et al., 2005). A partir deste contexto, pode-se concluir que diversos estudos evidenciam os efeitos biológicos através do uso de bactérias lácticas, ou seja, bactérias vivas que sobrevivem à passagem pelo trato gastrointestinal apresentando benefícios a saúde do hospedeiro.

Considerando a amplitude de efeitos benéficos atribuídos aos probióticos, a sua manipulação e inserção em produtos alimentícios, o aumento no consumo humano de produtos lácteos contendo este grupo de microrganismos e a indicação de seu efeito protetor sobre o material genético, cada vez mais se faz necessário avaliar a amplitude de sua ação antimutagênica frente os diferentes danos genéticos.

## **OBJETIVO**

Avaliar a atividade antimutagênica da linhagem LAC104 de *Lactobacillus paracasei*, proveniente de queijo artesanal nativo da Região Nordeste do estado do Rio Grande do Sul, *in vivo*, sobre os danos genéticos induzidos pelo etilmetanossulfonato (EMS) através do teste para a Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*.

## **METODOLOGIA**

O teste SMART foi aplicado de acordo com Andrade; Lehmann e Reguly (2004). Com o objetivo de avaliar a antigenotoxicidade das cepas de bactérias ácido lácticas, as larvas provenientes do cruzamento padrão foram submetidas a dois protocolos de tratamento:

- Pré-tratamento: as larvas foram inicialmente submetidas ao tratamento com controle negativo (solução salina) e quatro diferentes concentrações de BALs ( $10^{10}$ ;  $10^8$ ;  $10^6$  e  $10^4$  céls/ml) por um período de 3 horas. Após este período, foi adicionado ao meio de tratamento 2 mL das seguintes soluções: (i) água destilada e (ii) EMS 5 mM.
- Pós-tratamento: as larvas foram inicialmente divididas em dois grupos para serem submetidas ao tratamento agudo com o EMS (46 mM) e controle negativo (água destilada) por um período de 3 h. Posteriormente, estas larvas foram lavadas com água e transferidas para o tratamento com: (i) solução salina e (ii) quatro diferentes concentrações de bactérias ácido lácticas ( $10^4$ ;  $10^6$ ;  $10^8$  e  $10^{10}$  céls/ml).

As asas das moscas adultas nascidas após o tratamento foram submetidas à montagem em lâminas de vidro e analisadas em microscópio óptico com aumento de 400 vezes para a quantificação de clones de células mutantes gerados pelos tratamentos. Os resultados obtidos nos pré- e pós-tratamentos foram comparados à frequência de danos observada nos tratamentos nos quais foi administrada apenas a genotoxina (EMS). Por outro lado, os dados dos tratamentos apenas com as genotoxinas foram comparados com o controle negativo. Para tanto, foi utilizado o teste binomial condicional de Kastebaum e Bowman, seguindo o procedimento de decisões múltiplas de acordo com Frei e Würigler (1988).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados preliminares da atividade antimutagênica obtidos com a linhagem LAC104 referem-se à modulação exercida sobre os danos induzidos pelo mutágeno EMS, utilizando os protocolos de pré- e pós-tratamento, que estão descritos nas Tabelas 1 e 2.

Considerando o total de manchas, foi observado efeito protetor da linhagem viva estudada sobre os danos induzidos pelo EMS nas concentrações de  $10^4$  e  $10^8$  céls/mL no sistema de pré-tratamento. Resultados semelhantes foram encontrados no pré-tratamento com as bactérias mortas. Houve redução na frequência total de manchas nas concentrações de  $10^4$ ,

10<sup>8</sup> e 10<sup>10</sup> céls/mL (Tabela 1).

Tabela 1: Resultados obtidos no teste SMART com a progênie *mwh/flr*<sup>3</sup> do cruzamento padrão (CP) após exposição crônica de larvas de 3º estágio ao pré-tratamento com quatro concentrações de cultura de *Lactobacillus paracasei* (LAC104) vivas e mortas seguido do tratamento com EMS (5 mM)

Tratamentos		N. de moscas (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico <sup>a</sup>				Total manchas <i>mwh</i> <sup>c</sup> (n)
LAC104 (céls/mL)	EMS (mM)		Manchas simples pequenas (1-2 céls) <sup>b</sup> m = 2	Manchas simples grandes (>2 céls) <sup>b</sup> m = 5	Manchas gêmeas m = 5	Total de manchas m = 2	
<i>Vivas</i>							
0	0	30	0,43 (13)	0,03 (01)	0,00 (00)	0,47 (14)	14
0	5	50	7,94 (397) *	3,72 (186) *	1,72 (86) *	13,38 (669) *	630
10 <sup>4</sup>	5	50	5,84 (292) f+	3,38 (169) -	1,64 (82) -	10,86 (543) f+	498
10 <sup>6</sup>	5	50	6,38 (319) -	2,86 (143) f+	1,70 (85) -	10,94 (547) -	520
10 <sup>8</sup>	5	60	7,00 (420) f+	3,23 (194) -	1,55 (93) -	11,78 (707) f+	672
10 <sup>10</sup>	5	30	6,63 (199) f+	4,20 (126) -	1,67 (50) -	12,50 (375) -	364
<i>Mortas</i>							
0	0	30	0,43 (13)	0,03 (01)	0,00 (00)	0,47 (14)	14
0	5	50	7,94 (397) *	3,72 (186) *	1,72 (86) *	13,38 (669) *	630
10 <sup>4</sup>	5	50	7,86 (393) -	3,62 (181) -	1,90 (95) -	13,38 (669) f+	627
10 <sup>6</sup>	5	60	6,88 (413) f+	3,25 (195) f+	1,72 (103) -	11,85 (711) -	671
10 <sup>8</sup>	5	50	6,58 (329) f+	3,00 (150) -	1,64 (82) f+	11,22 (561) f+	594
10 <sup>10</sup>	5	30	6,27 (188) f+	2,90 (87) -	1,97 (59) -	11,13 (334) f+	302

<sup>a</sup>Diagnóstico estatístico através do teste binomial condicional: \*, positivo quando comparado ao controle negativo; -, negativo; f+, fraco positivo, quando comparado ao tratamento com EMS 5 mM. m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância  $\alpha=\beta=0,05$ .

<sup>b</sup>Inclui manchas simples *flr*<sup>3</sup> raras. <sup>c</sup>Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

Da mesma forma, quando avaliada no sistema de pós-tratamento, observa-se que a LAC104 viva reduziu significativamente a frequência de manchas gêmeas em todas as concentrações e do total de manchas nas concentrações de 10<sup>6</sup>, 10<sup>8</sup> e 10<sup>10</sup> células/mL (Tabela 2). Os resultados positivos na redução da frequência de manchas gêmeas indicam que as bactérias probióticas estejam atuando na promoção dos mecanismos de reparo envolvidos na correção de danos de origem recombinacional, uma vez que este tipo de mancha é causado exclusivamente por este evento.

Neste sentido, a literatura científica apresenta alguns dados referentes à atividade antimutagênica/antigenotóxica de probióticos, mostrando que, de forma geral, estes microrganismos são capazes de reduzir a atividade mutagênica de diferentes agentes químicos. Pool-Zobel et al. (1993) demonstraram que a administração de *L. casei* Shirota a ratos expostos ao mutágeno N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) reduziu a frequência de danos no DNA de células da mucosa do esôfago, estômago, duodeno e cólon quando avaliado através do teste cometa. Em estudo subsequente, utilizando este mesmo bioensaio, em células da mucosa colônica, foi confirmado o efeito antigenotóxico de diferentes espécies de lactobacilos (*L. acidophilus*, *L. gasseri* (P79), *L. confusus* (DSM

20196), *Bifidobacterium breve* e *B. longum*) em ratos tratados com o carcinógeno de cólon 1,2-dimetilhidrazina (DMH). Este efeito protetor não foi observado no tratamento com *Streptococcus thermophilus* NCIM 50038 e também quando as culturas de *L. acidophilus* foram submetidas ao calor. Este último resultado associa o efeito protetor à presença de organismos vivos (POOL-ZOBEL et al., 1996).

Tabela 2: Resultados obtidos no teste SMART com a progênie *mwh/flr*<sup>3</sup> do cruzamento padrão (CP) após exposição aguda de larvas de 3º estágio ao EMS (5 mM), seguida do pós-tratamento com quatro concentrações de cultura de *Lactobacillus paracasei* (LAC104) vivas

Tratamentos		N. de moscas (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico <sup>a</sup>				Total manchas <i>mwh</i> <sup>c</sup> (n)
EMS (mM)	LAC 104 (célis./mL)		Manchas simples pequenas (1-2 células) <sup>b</sup> m = 2	Manchas simples grandes (>2 células) <sup>b</sup> m = 5	Manchas gêmeas m = 5	Total de manchas m = 2	
0	0	30	0,63 (19)	0,20 (06)	0,10 (03)	0,93 (28)	28
46	0	30	1,47 (44) *	2,63 (79) *	1,90 (57) *	6,00 (180) *	167
46	10 <sup>4</sup>	30	1,73 (52) -	2,60 (78) -	0,93 (28) +	5,27 (158) -	144
46	10 <sup>6</sup>	30	1,30 (39) -	2,40 (72) -	0,77 (23) +	4,47 (134) f+	120
46	10 <sup>8</sup>	30	0,83 (25) +	2,17 (65) -	0,87 (26) +	3,87 (116) f+	103
46	10 <sup>10</sup>	30	1,73 (52) -	1,63 (49) +	1,13 (34) +	4,50 (135) f+	122

<sup>a</sup>Diagnóstico estatístico através do teste binomial condicional: \*, positivo quando comparado ao controle negativo; -, negativo; i, inconclusivo; +, positivo, quando comparado ao tratamento com EMS 46 mM. m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância  $\alpha=\beta=0,05$ .

<sup>b</sup>Inclui manchas simples *flr3* raras. <sup>c</sup>Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

Estudos relacionados relatam que cepas de lactobacilos e bifidobactérias (HSIEH; CHOU, 2006), bem como cepas de *E. coli* Nissle 1917, mostraram atividade antimutagênica *in vitro*, provavelmente devido à sua capacidade de metabolizar e inativar compostos mutagênicos (GEIER et al., 2006).

Villarini et al. (2008), investigando os efeitos antígenotóxicos através do uso de linhagens de *L. casei* na dieta de ratos tratados com o carcinógeno de cólon 1,2-dimetilhidrazina hydrochloride (DMH), evidenciaram claramente os efeitos protetores no DNA pelo uso destes microrganismos, isolados a partir de um produto lácteo comercialmente disponível, através da versão alcalina do teste cometa em células do fígado e cólon intestinal. (BALANSKY et al., 1999).

Cepas de *L. casei* isoladas de queijos de ovelha italianos tradicionais mostraram um alto potencial de redução de danos genéticos induzidos pelo MNNG e 4-nitroquinoleína-1-óxido (4NQO) quando avaliadas *in vitro* através do SOS Cromoteste em *E. coli* PQ37 (CALDINI et al, 2008; CORSETTI et al, 2008). Neste mesmo bioensaio, Raipulis et al. (2005) verificaram que diferentes linhagens de *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Bifidobacterium* foram capazes de reduzir a atividade genotóxica da furazolidona.

## CONCLUSÕES

Ainda que os dados aqui apresentados sejam preliminares demonstram que a linhagem LAC 104 de *Lactobacillus paracasei* é capaz de modular os efeitos mutagênicos do agente alquilante EMS, nos protocolos de pré e pós-tratamento, entretanto sem relação dose-efeito.

Estes dados reforçam as informações prévias descritas na literatura científica, que

mostram a segurança do consumo de probióticos e sua atividade de proteção sobre danos genéticos induzidos por agentes químicos.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, H. H. R.; REGULY, M. L.; LEHMANN, M. Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART). In: HENDERSON, D. S. (Ed.). **Drosophila Cytogenetics Protocols**. Totowa: Human Press Inc., 2004. p. 389-412.
- ASHRAF, R.; SHAH, N. P. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium spp.* in yoghurt - A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, p. 194-208, 2011.
- BALANSKY, R. et al. Inhibitory effects of freeze-dried milk fermented by selected *Lactobacillus bulgaricus* strains on carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats and by diethylnitrosamine in hamsters. **Cancer Letters**, v. 147, p. 125-137, 1999.
- CALDINI, G., et al. Evidence for *in vitro* antigenotoxicity of cheese non starter lactobacilli. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 93, p. 51-59, 2008.
- COMMANE, D. et al. The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. **Mutation Research**, v. 591, p. 276-289, 2005.
- CORSETTI, A. et al. Raw milk traditional Italian ewe cheeses as a source of *Lactobacillus casei* strains with acid-bile resistance and antigenotoxic properties. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, p. 330-335, 2008.
- FREI, H.; WÜRGLER, F. E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate positive, negative or inconclusive result. **Mutation Research**, v. 203, p. 297-308, 1988.
- GEIER, M. S.; BUTLER, R. N.; HOWARTH, G. S. Probiotics, prebiotics and synbiotics: A role in chemoprevention of colorectal cancer? **Cancer Biology & Therapy**, v. 5, p. 1265-1269, 2006.
- HSIEH, M. L.; CHOU, C.C. Mutagenicity and antimutagenic effect of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, p. 43-47, 2006.
- POOL-ZOBEL, B. et al. Antigenotoxic properties of lactic acid bacteria *in vivo* in the GI tract of rats. **Nutrition and Cancer**, v. 20, p. 271-281, 1993.
- POOL-ZOBEL, B. L. et al. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* mediated antigenotoxicity in the colon of rats. **Nutrition and Cancer**, v. 26, p. 365-380, 1996.
- RAIPULIS, J.; TOMA, M. M.; SEMJONOV, P. The effect of probiotics on the genotoxicity of furazolidone. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, p. 343-347, 2005.
- SANDERS, M. E. et al. An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. **Gut**, v. 62, p. 787-796, 2013.
- SUSKOVIC, J. et al. Antimicrobial activity – The most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. **Food Technology and Biotechnology**, v.48, p. 296- 307, 2010.
- VILLARINI, M. et al. Modulatory activity of a *Lactobacillus casei* strain on 1,2-dimethylhydrazine induced genotoxicity in rats. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 49, p. 192-199, 2008.