



ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMUTAGÊNICA DE *Lactobacillus paracasei*

Vanessa de Souza Bizarro¹
Renata Chequeller de Almeida²
Rafael Rodrigues Dihl³
Mauricio Lehmann⁴

Resumo

Bactérias ácido lácticas (BALs) são microorganismos probióticos 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. O presente estudo avaliou a atividade antimutagênica sobre os danos genéticos induzidos pelo etilmetanossulfonato (EMS) da linhagem LAC104 de *Lactobacillus paracasei*. Foi utilizado o teste para a Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em células somáticas de *Drosophila melanogaster* em dois sistemas de tratamento, pré- e cotratamento. Os resultados mostram que a bactéria apresentou atividade modulatória sobre os danos induzidos pelo EMS apenas no protocolo de pós-tratamento, tendo reduzido de forma estatisticamente significativa os danos induzidos por este mutágeno. No pré-tratamento não foram observadas alterações significativas na frequência de manchas gerada pelo EMS. A redução na frequência de danos no pós-tratamento ocorreu nas bactérias ativas e inativas. Os resultados positivos referentes à redução na frequência de manchas gêmeas encontrados no protocolo de pós-tratamento indicam que a linhagem probiótica possa atuar 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 tipo de evento. Esta conclusão é reforçada pelo fato do efeito protetor observado ter ocorrido apenas no pós-tratamento, caracterizando uma possível ação sobre os mecanismos de reparação do DNA. Estes dados, somados aos da literatura científica, confirmam a atividade protetora dos probióticos sobre danos genéticos induzidos por agentes químicos.

Palavra- chave: Bactérias ácido lácticas; mutação; recombinação; teste SMART; probióticos.

INTRODUÇÃO

Bactérias ácido lácticas (BALs) são consideradas os microorganismos probióticos mais importantes sob o ponto de vista biotecnológico, pois apresentam um amplo potencial de aplicação, abrangendo desde sua incorporação como parte do processo de fermentação em produtos lácteos, tais como queijo, iogurte, sorvetes, sobremesas lácteas e outros, até à sua utilização como candidato probiótico na saúde humana e animal (RANADHEERA et al., 2010), em vista de sua atividade biológica sobre o hospedeiro (AHMADI et al., 2014).

Um número considerável de benefícios como resultado da ingestão de probióticos, incluindo a modificação da microbiota intestinal, redução do risco de distúrbios intestinais, prevenção da colonização de patógenos, modulação do sistema imune, tanto no intestino como a nível sistêmico, redução de reações inflamatórias, alívio de intolerância à lactose, redução das alergias alimentares, prevenção de doenças infecciosas, prevenção de diarreia, atividade anti-fúngica, prevenção e tratamento de doenças gastrointestinais, do trato respiratório e urogenital e produção de vitaminas do grupo B, como folato, riboflavina e vitamina B12 (GARDINER et al., 2002, DE VRESE; SCHREZENMEIR, 2008, SALMINEN et al., 2010, LEBLANC et al., 2011, REMUS et al., 2011, MEIJERINK et al., 2012,

¹ Aluno do curso de graduação em Biomedicina – Bolsista PIBIC/CNPq – vanessa.sbizarro@gmail.com

² Aluna de Doutorado do PPGBIOSAÚDE – re_cll@yahoo.com.br

³ Professor do curso de Biologia e PPGBIOSAÚDE – rafael.rodrigues@ulbra.br

⁴ Professor do curso de Engenharia Ambiental e Sanitária e PPGBIOSAÚDE – mauriciol@ulbra.br

NAGPAL et al., 2012, REIS et al., 2012).

Desta forma, 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, se faz necessário avaliar a amplitude de sua ação antimutagênica frente os diferentes danos genéticos. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimutagênica da linhagem LAC104 de *Lactobacillus paracasei*, com células ativas e inativas, 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 bactérias, 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) ativas e inativas 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 com células ativas e inativas (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 Kastembaum e Bowman, seguindo o procedimento de decisões múltiplas de acordo com Frei e Würigler (1988).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De uma forma geral, a linhagem bacteriana apresentou atividade modulatória apenas sobre os danos induzidos pelo EMS no protocolo de pós-tratamento, reduzindo de forma estatisticamente significativa os danos induzidos por este mutágeno (Tabela 1).

No pré-tratamento não foram observadas alterações significativas na frequência total de manchas gerada pelo EMS quando a bactéria foi utilizada (Tabela 2). A redução na frequência de danos no pós-tratamento ocorreu em três das quatro concentrações utilizadas, 10^4 , 10^8 e 10^{10} céls/mL nas bactérias ativas e nas concentrações de 10^8 e 10^{10} céls/mL nas bactérias inativas.

Os resultados positivos referentes à redução na frequência de manchas gêmeas encontrados no protocolo de pós-tratamento em algumas concentrações indicam que a linhagem probiótica atue 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 tipo de evento. Esta conclusão também é reforçada pelo fato de que o efeito protetor observado ocorreu apenas no pós-tratamento, caracterizando uma possível ação sobre os mecanismos de reparação do DNA.

Tabela 1: Resultados obtidos no teste SMART com a progênie *mwh/flr3* do cruzamento padrão (CP) após exposição aguda de larvas de 3º estágio ao EMS (46 mM), seguida do pós-tratamento com quatro concentrações de culturas ativas e inativas de *Lactobacillus paracasei* (Lac 104).

Tratamentos		N. de moscas (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a				Total manchas <i>mwh</i> ^c (n)
EMS (mM)	LAC 104 (cél./mL)		Manchas simples pequenas (1-2 céls) ^b m = 2	Manchas simples grandes (>2 céls) ^b m = 5	Manchas gêmeas m = 5	Total de manchas m = 2	
0	0	60	0,70 (42)	0,15 (09)	0,07 (04)	0,92 (55)	55
46	0	60	3,45 (207) *	2,75 (165) *	2,50 (150) *	8,70 (522) *	477
Ativas							
46	10 ⁴	60	2,32 (139) +	3,20 (192) -	1,17 (70) +	6,68 (401) +	344
46	10 ⁶	60	2,55 (153) -	2,93 (176) -	1,58 (95) -	7,07 (424) -	372
46	10 ⁸	60	1,83 (110) +	2,60 (156) -	1,55 (93) +	5,98 (359) +	323
46	10 ¹⁰	60	2,43 (146) -	2,63 (158) -	1,65 (99) +	6,72 (403) +	343
Inativas							
46	10 ⁴	60	2,92 (175) -	3,37 (202) +	1,78 (107) +	8,07 (484) -	416
46	10 ⁶	60	2,77 (166) +	3,65 (219) +	1,88 (113) -	8,30 (498) -	409
46	10 ⁸	60	2,65 (159) +	3,02 (181) -	1,55 (93) +	7,22 (433) +	371
46	10 ¹⁰	60	2,60 (156) +	3,22 (193) -	1,65 (99) +	7,47 (448) +	382

^aDiagnóstico estatístico: *, positivo quando comparado ao controle negativo através do teste binomial condicional; -, negativo quando comparado ao tratamento com EMS 5 mM através do teste binomial condicional e teste U de Mann, Whitney e Wilcoxon (Frei e Würigler, 1995); m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha=\beta=0,05$. ^bInclui manchas simples *flr3* raras. ^cConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

Tabela 2: Resultados obtidos no teste SMART com a progênie *mwh/flr3* do cruzamento padrão (CP) após exposição crônica de larvas de 3º estágio ao pré-tratamento com quatro concentrações de cultura de *L. paracasei* (LAC104) ativas e inativas seguido do tratamento com EMS (5 mM)

Tratamentos		N. de moscas (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a				Total manchas <i>mwh</i> ^c (n)
LAC 104 (cél./mL)	EMS (mM)		Manchas simples pequenas (1-2 céls) ^b m = 2	Manchas simples grandes (>2 céls) ^b m = 5	Manchas gêmeas m = 5	Total de manchas m = 2	
0	0	60	0,47 (28)	0,08 (05)	0,02 (01)	0,57 (34)	34
0	5	60	7,45 (447) *	3,62 (217) *	1,65 (99) *	12,72 (763) *	717
Ativas							
10 ⁴	5	60	6,15 (369) -	3,27 (196) -	1,45 (87) -	10,87 (652) -	599
10 ⁶	5	60	6,65 (399) -	2,85 (171) -	1,65 (99) -	11,15 (669) -	637
10 ⁸	5	60	7,00 (420) -	3,23 (194) -	1,55 (93) -	11,78 (707) -	672
10 ¹⁰	5	60	6,90 (414) -	3,75 (225) -	1,87 (112) -	12,52 (751) -	703
Inativas							
10 ⁴	5	60	7,80 (468) -	3,45 (207) -	1,72 (103) -	12,97 (778) -	733
10 ⁶	5	60	6,88 (413) -	3,25 (195) -	1,72 (103) -	11,85 (711) -	871
10 ⁸	5	60	7,90 (474) -	2,98 (179) -	1,73 (104) -	12,62 (757) -	708
10 ¹⁰	5	60	7,88 (473) -	3,07 (184) -	1,48 (89) -	12,43 (746) -	705

^aDiagnóstico estatístico: *, positivo quando comparado ao controle negativo através do teste binomial condicional; -, negativo quando comparado ao tratamento com EMS 5 mM através do teste binomial condicional e teste U de Mann, Whitney e Wilcoxon (Frei e Würigler, 1995); m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha=\beta=0,05$. ^bInclui manchas simples *flr3* raras. ^cConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

Neste sentido, a literatura científica apresenta alguns dados referentes à atividade antimutagênica 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 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 antígenotóxico de diferentes espécies de lactobacilos em ratos tratados com o carcinógeno de cólon 1,2-dimetilhidrazina. 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).

Estudos relacionados relatam que cepas de lactobacilos e bifidobactérias, 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, HSIEH;CHOU, 2006). Adicionalmente estudo conduzido por Vyas et al. (2015) revelou redução *in vivo* da atividade genotóxica e mutagênica do N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina causado pela linhagem de células vivas de *Lactobacillus rhamnosus*.

Villarini *et al.* (2008), investigando os efeitos antígenotóxicos através do uso de linhagens de *Lactobacillus casei* na dieta de ratos tratados com o carcinógeno de cólon 1,2-dimethylhydrazine 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.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados aqui apresentados demonstram que a linhagem LAC 104 de *L. paracasei* é capaz de modular os efeitos mutagênicos do agente alquilante EMS, no protocolo de 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

- AHMADI, M. A. et al. Antimutagenic and anticancer effects of lactic acid bacteria isolated from Tarhana through Ames test and phylogenetic analysis by 16S rDNA. **Nutrition and Cancer**, v. 66, p. 1406-13, 2014.
- 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.
- DE VRESE, M.; SCHREZENMEIR, J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. **Advances in Biochemical Engineering-Biotechnology**, v. 111, p. 1-66, 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.
- FREI, H.; WÜRGLER, F. E. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. **Mutation Research**, v. 334, p. 247-58, 1995.

- GARDINER, G. E. et al. Persistence of *Lactobacillus fermentum* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 but not L-rhamnosus GG in the human vagina as demonstrated by randomly amplified polymorphic DNA. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, p. 92-96, 2002.
- 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.
- MEIJERINK, M. et al. Immunomodulatory effects of potential probiotics in a mouse peanut sensitization model. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 65, p. 488-96, 2012.
- NAGPAL, R. et al. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. **Fems Microbiology Letters**, v. 334, p. 1-15, 2012.
- 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.
- RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v.43, p. 1-7, 2010.
- REIS, J. A. et al. Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. **Food Engineering Reviews**, v.4, p. 124-40, 2012.
- SALMINEN, S. et al. Interaction of probiotics and pathogens-benefits to human health? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, p. 157-67, 2010.
- SOLIERI, L.; RUTELLA, G.S.; TAGLIAZUCCHI, D. Impact of non-starter lactobacilli on release of peptides with angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidant activities during bovine milk fermentation. **Food Microbiology**, v. 51, p. 108 -16, 2015.
- 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.
- VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative *in vitro* study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. **Food Research International**, v. 36, p. 895-904, 2003.
- VYAS, B. R., et al. Antigenotoxic and Antimutagenic Activities of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* Vc against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. **Nutrition and Cancer**, v. 67, p. 1142-50, 2015.