



ATIVIDADE MODULATÓRIA DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS SOBRE OS DANOS GENÉTICOS INDUZIDOS PELO ETIL-METANO-SULFONATO

Renata Schütts Lemos¹
Renata Chequeller de Almeida²
Vanessa de Souza Bizarro³
Rafael Rodrigues Dihl⁴
Mauricio Lehmann⁴

RESUMO

As bactérias ácido lácticas (BALs) são consideradas os microrganismos probióticos mais importantes sob o ponto de vista biotecnológico, pois apresentam um amplo potencial de aplicação. Além dos benefícios nutricionais e terapêuticos, evidências revelam propriedades potencialmente importantes destes microrganismos, tais como atividade antígeno-tóxica, antimutagênica e anticarcinogênica. O presente estudo avaliou a atividade antimutagênica de duas linhagens de BALs através do teste para a Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. Foram utilizadas a linhagem LAC 104 de *Lactobacillus paracasei*, proveniente de queijo artesanal nativo (tipo Serrano), e uma linhagem comercial padrão CCT 0360 de *Lactococcus lactis*, em quatro diferentes concentrações (10^4 , 10^6 , 10^8 e 10^{10} UFC/ml), ativas e inativas. Os dados da atividade antimutagênica sobre os danos induzidos pelo mutágeno etil-metano-sulfonato (EMS), utilizando os protocolos de pré- e pós-tratamento, mostram que a linhagem LAC 104 apresentou atividade protetora apenas no pós-tratamento. A redução na frequência de danos no pós-tratamento ocorreu nas concentrações de 10^4 , 10^8 e 10^{10} UFC/mL nas bactérias ativas e nas concentrações de 10^8 e 10^{10} UFC/mL nas bactérias inativas. Verificou-se também que a redução dos danos genéticos gerada por esta linhagem bacteriana ocorreu principalmente sobre os danos de origem mutacional. Por outro lado, a linhagem CCT 0360 não foi capaz de exercer atividade antimutagênica sobre os danos induzidos pelo EMS em ambos os protocolos utilizados, tanto na forma ativa quanto inativa. Estes dados reforçam as informações prévias descritas na literatura científica, que mostram atividade protetora de diferentes probióticos sobre danos genéticos induzidos por agentes químicos.

Palavras chave: *Drosophila melanogaster*; teste SMART; recombinação; mutação.

INTRODUÇÃO

A grande maioria dos probióticos pertence a dois grupos de bactérias ácido lácticas, as *Bifidobacterium* e os *Lactobacillus* (ASHRAF; SHAH, 2014; ZHANG et al., 2015). Ambas são frequentemente empregadas como suplementos probióticos devido sua predominância na microbiota intestinal de um humano saudável. Estudos apontam que quando administrados, apresentam uma taxa de sobrevivência de cerca de 20-40% durante a passagem do trato gastrointestinal (FERREIRA, 2012).

Atualmente, as utilizações e aplicações propostas quanto ao uso de BALs em diversos setores têm crescido notoriamente, devido à sua enorme importância industrial (FGUIRI et al., 2015; ZANINI et al., 2016). 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; VECCHIO, 2013). Para tanto, indústrias agroalimentares integraram novos produtos, sobretudo lácticos, aos quais são atribuídas

¹Aluna do Curso de Graduação em Biomedicina – Bolsista PIBIC/CNPq – renataschutts@hotmail.com

²Aluna de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada À Saúde (PPGBioSaúde) – re_cll@yahoo.com.br

³Aluna do Curso de Graduação em Biomedicina – Bolsista PROBIC/FAPERGS – vanessa.sbizarro@gmail.com

⁴Professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada À Saúde (PPGBioSaúde) – rafael.rodriques@ulbra.br e mauriciol@ulbra.br

qualidades probióticas (SOCCOL et al., 2010; ASHRAF; SHAH, 2011).

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. 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, cada vez mais se faz necessário avaliarmos a segurança de seu consumo e a amplitude de sua ação antimutagênica frente os diferentes danos genéticos.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antimutagênica de *Lactobacillus paracasei* (LAC104) sobre os danos induzidos pelo etil-metano-sulfonato (EMS) em células somáticas de *Drosophila melanogaster* através do teste para a Detecção de Mutações e Recombinação Somática (SMART).

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 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 Würzler (1988). Adicionalmente, com o objetivo de confirmar os resultados positivos e excluir *outliers* foi efetuado o teste U de Wilcoxon, Mann e Whitney (Frei e Würzler, 1995).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que a linhagem LAC 104 de *Lactobacillus paracasei* não apresentou atividade antigenotóxica quando avaliada no protocolo de co-tratamento sobre os danos genéticos induzidos pelo EMS (Tabela 1), ao mesmo tempo em que foi capaz de reduzir a genotoxicidade do mutágeno no protocolo de pós-tratamento (Tabela 2). Adicionalmente, através da comparação dos genótipos *mwh/flr³* e *mwh/TM3*, verificou-se também que esta ação protetora ocorreu principalmente sobre os danos originados por mutação gênica e/ou cromossômica (Tabela 2). Por outro lado a linhagem CCT 0360 de *Lactococcus lactis* não apresentou efeito modulador sobre os danos induzidos pelo EMS tanto no protocolo de pré-tratamento (Tabela 3) como no pós-tratamento (Tabela 4).

Tabela 1: 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 *Lactobacillus paracasei* (LAC 104), ativas e inativas, seguido do tratamento com EMS (5mM)

Tratamentos		Nº de moscas (N)	Manchas por mosca (nº de manchas) diagnóstico estatístico ^a				Total de manchas <i>mwh</i> ^c (n)
LAC 104 (UFC/mL)	EMS (mM)		Manchas simples pequenas (1-2 céls) ^b <i>m</i> = 2	Manchas simples grandes (>2 céls) ^b <i>m</i> = 5	Manchas gêmeas <i>m</i> = 5	Total de manchas <i>m</i> = 2	
0	0	60	0,47 (28)	0,08 (05)	0,02 (01)	0,57 (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.

Além de observar o efeito antimutagênico da bactéria *Lactobacillus paracasei*, o presente estudo quantificou sua ação protetora quanto à origem dos danos genéticos. Esta avaliação permitiu observar que o efeito protetor difere entre as bactérias ativas e inativas. Enquanto nas primeiras a redução dos danos de origem recombinacional e mutacional ocorreu em proporções semelhantes, nas bactérias inativas a redução ocorreu principalmente nos danos originados por mutação gênica ou cromossômica. Além disso, o efeito protetor da linhagem LAC 104 foi observado apenas no protocolo de pós-tratamento, indicando um possível efeito sobre os mecanismos de reparação do DNA. Neste sentido, o EMS, utilizado como indutor de danos no DNA, é um agente alquilante monofuncional capaz de doar grupos etil a sítios nucleofílicos reativos no DNA (ZHANG et al., 2001), formando especificamente O6-etilguaninas e N-etilações responsáveis por mutações do tipo transições A → T (DAVIES et al., 1995), corrigidas preferencialmente pelos mecanismos de reparo por excisão de bases e de nucleotídeos (BRANDA et al., 1999), além do mecanismo de reparação translesão (BILBAO et al., 2002). Assim, é possível que o efeito protetor da linhagem LAC 104 possa estar associado com o aumento de atividades destes mecanismos de reparação.

Tabela 2: Resultados obtidos no teste SMART com a progênie *mwh/flr³* e *mwh/TM3* 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), ativas e inativas

Tratamentos		Nº de moscas (N)	Manchas por mosca (nº de manchas) diagnóstico estatístico ^a				Total de manchas <i>mwh</i> ^d (n)	Frequência de indução de clones ^e (n/NC) ^{f,g}	I (%) ^h
EMS (mM)	LAC 104 (UFC/mL)		Manchas simples pequenas (1-2 céls) ^b <i>m</i> = 2	Manchas simples grandes (>2 céls) ^b <i>m</i> = 5	Manchas gêmeas ^c <i>m</i> = 5	Total de manchas <i>m</i> = 2			
<i>mwh/flr³</i>									
0	0	60	0,70 (42)	0,15 (09)	0,07 (04)	0,92 (55)	55	1,88	

46	0	60	3,45 (207) *	2,75 (165) *	2,50 (150) *	8,70 (522) *	477	16,29 [14,41]	
<i>flr³/TM3</i>									
0	0	60	0,45 (27)	0,00 (00)		0,45 (27)	23	0,79	
46	0	59	1,85 (109) *	0,85 (50) *		2,69 (159) *	159	5,52 [4,74]	
Ativas									
<i>mwh/flr³</i>									
46	10 ⁴	60	2,32 (139) +	3,20 (192) -	1,17 (70) +	6,68 (401) +	344	11,75 [9,87]	31,52
46	10 ⁶	60	2,55 (153) -	2,93 (176) -	1,58 (95) -	7,07 (424) -	372	12,70 [10,82]	-
46	10 ⁸	60	1,83 (110) +	2,60 (156) -	1,55 (93) +	5,98 (359) +	323	11,03 [9,15]	36,49
46	10 ¹⁰	60	2,43 (146) -	2,63 (158) -	1,65 (99) +	6,72 (403) +	343	11,71 [9,84]	31,75
<i>flr³/TM3</i>									
46	10 ⁴	60	1,32 (79) -	0,87 (52) -		2,18 (131) -	131	4,47 [3,69]	-
46	10 ⁸	60	1,08 (65) +	0,62 (37) -		1,70 (102) +	102	3,48 [2,70]	43,04
46	10 ¹⁰	60	1,20 (72) +	0,92 (55) -		2,12 (127) -	127	4,34 [3,55]	-
Inativas									
<i>mwh/flr³</i>									
46	10 ⁴	60	2,92 (175) -	3,37 (202) -	1,78 (107) +	8,07 (484) -	416	14,21 [12,33]	-
46	10 ⁶	60	2,77 (166) +	3,65 (219) -	1,88 (113) -	8,30 (498) -	409	13,97 [12,09]	-
46	10 ⁸	60	2,65 (159) +	3,02 (181) -	1,55 (93) +	7,22 (433) +	371	12,67 [10,79]	25,12
46	10 ¹⁰	60	2,60 (156) +	3,22 (193) -	1,65 (99) +	7,47 (448) +	382	13,05 [11,17]	22,51
<i>flr³/TM3</i>									
46	10 ⁸	60	0,93 (56) +	0,70 (42) -		1,63 (98) +	98	3,35 [2,56]	45,92
46	10 ¹⁰	60	0,88 (53) +	0,75 (45) -		1,63 (98) +	98	3,35 [2,56]	45,92

^aDiagnóstico estatístico: *, positivo quando comparado ao controle negativo através do teste binomial condicional; +, positivo; -, 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. ^cApenas clones *mwh* podem ser observados nas moscas *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr³*. ^dConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas. ^eCalculado de acordo com Frei et al. (1992). ^fFrequência por 10⁵ células por divisão celular, *C* = 48.000 (aproximadamente o número de células analisadas por mosca). ^gValores entre colchetes representam as frequências de manchas induzidas corrigidas pela incidência espontânea estimada a partir dos controles negativos. ^hI = % de inibição, calculado de acordo com Abraham (1994): % de inibição quando comparado ao tratamento com EMS 46 mM = [(mutágeno sozinho – genotoxina mais LAC 104) / genotoxina sozinha] x 100.

Tabela 3: 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 *Lactococcus lactis* (CCT 0360), ativas e inativas, seguido do tratamento com EMS (5mM)

Tratamentos		Nº de moscas (N)	Manchas por mosca (nº de manchas) diagnóstico estatístico ^a				Total de manchas <i>mwh</i> ^c (n)
			Manchas simples pequenas (1-2 céls) ^b <i>m</i> = 2	Manchas simples grandes (>2 céls) ^b <i>m</i> = 5	Manchas gêmeas <i>m</i> = 5	Total de manchas <i>m</i> = 2	
CCT 0360 (UFC/mL)	EMS (mM)						
0	0	50	0,88 (44)	0,06 (03)	0,00 (00)	0,94 (47)	
0	5	50	8,26 (413) *	2,74 (137) *	1,32 (66) *	12,32 (616) *	588
Ativas							
	10 ⁴	50	7,76 (388) -	2,82 (141) -	1,22 (61) -	11,80 (590) -	537
	10 ⁶	50	8,06 (403) -	2,92 (146) -	1,42 (71) -	12,40 (620) -	581
	10 ⁸	50	8,76 (438) -	2,98 (149) -	1,50 (75) -	13,24 (662) -	610
	10 ¹⁰	50	7,02 (351) +	2,54 (127) -	1,70 (85) -	11,26 (563) -	529
Inativas							
	10 ⁴	50	6,92 (346) +	3,08 (154) -	1,08 (54) -	11,08 (554) -	512
	10 ⁶	50	7,28 (364) -	2,42 (121) -	1,36 (68) -	11,06 (553) -	511
	10 ⁸	50	7,06 (353) +	2,74 (137) -	1,28 (64) -	11,08 (554) -	511
	10 ¹⁰	50	7,58 (379) -	2,62 (131) -	1,52 (76) -	11,72 (586) -	534

^aDiagnóstico estatístico: *, positivo quando comparado ao controle negativo através do teste binomial condicional; +, positivo; -, 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 4: 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 *Lactococcus lactis* (CCT 0360)

Tratamentos		Nº de moscas (N)	Manchas por indivíduo (nº de manchas) diagnóstico estatístico ^a				Total de manchas <i>mwh</i> ^c (n)
			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	
CCT 0360 (UFC/mL)	EMS (mM)						
0	0	50	0,76(38)	0,10(05)	0,04 (02)	0,90 (45)	
0	46	50	3,06(153) *	2,66(133) *	1,62 (81) *	7,34 (367) *	330
Ativas							
10 ⁴	46	50	3,40(170) -	3,00(150) -	2,12 (106) -	8,52 (426) -	364
10 ⁶	46	50	2,46(123) -	3,20(160) -	1,50 (75) -	7,16 (358) -	295
10 ⁸	46	50	3,76(188) -	2,70(135) -	2,22 (111) -	8,68 (434) -	388
10 ¹⁰	46	50	3,14(157) -	2,64(132) -	1,44 (72) -	7,22 (361) -	305
Inativas							
10 ⁴	46	50	2,36(118) -	2,58(129) -	1,38 (69) -	6,32 (316) -	278
10 ⁶	46	50	3,06(153) -	2,72(136) -	1,34 (67) -	7,12 (356) -	304
10 ⁸	46	50	2,68(134) -	2,76(138) -	1,88 (94) -	7,32 (366) -	319
10 ¹⁰	46	50	3,66(183) -	2,80(140) -	1,62 (81) -	8,08 (404) -	354

^aDiagnóstico estatístico: *, positivo quando comparado ao controle negativo através do teste binomial condicional; -, negativo quando comparado ao tratamento com EMS 46 mM através do teste binomial condicional e teste U de Mann, Whitney e Wilcoxon (Frei e Würzler, 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.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos mostram que a linhagem LAC 104 apresentou atividade protetora apenas no protocolo de pós-tratamento, entretanto sem relação dose-efeito. Verificou-se também que a redução dos danos genéticos gerada pela bactéria ocorreu principalmente sobre os danos de origem mutacional. Por outro lado, a linhagem CCT 0360 não foi capaz de exercer atividade antimutagênica sobre os danos induzidos pelo EMS em ambos os protocolos utilizados, tanto na forma ativa quanto inativa.

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. Immune system stimulation by probiotic microorganisms. **Critical Reviews of Food Science and Nutrition**, v. 54, p. 938-56, 2014.

BILBAO, C. et al. Influence of *mus201* and *mus308* mutations of *Drosophila melanogaster* on the genotoxicity of model chemicals in somatic cells in vivo measured with the comet assay. **Mutation Research**, v. 503, p.11-9, 2002.

BRANDA, R. F. et al. The effect of folate deficiency on the *hprt* mutational spectrum in Chinese hamster ovary cells treated with monofunctional alkylating agents. **Mutation Research**, v. 427, p. 79-87, 1999.

FERREIRA, C. L. L. F. Grupo de bactérias láticas e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. In: Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção. (ed) Rio de Janeiro: Rubio, 2012. p.1-6.

FGUIRI, I., et al. Isolation and characterisation of lactic acid bacteria strains from raw camel milk for potential use in the production of fermented tunisian dairy products. **International Journal of Dairy Technology**, v. 69, p. 103-13, 2016.

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.

ZHANG, Y. J., et al. Impacts of gut bacteria on human health and diseases. **International Journal of Molecular Science**, v. 16, p. 7493-19, 2015.