



ESTUDO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA E ANTIMUTAGÊNICA DE BACTÉRIAS LÁCTICAS EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster*

^{1,2}Renata C. da Silveira; ^{2,3}Vanessa de S. Bizarro; ^{2,4}Guilherme dos S. Pozzebon; ²Rafael R. Dihl e ²Mauricio Lehmann*

¹Aluna de Doutorado do PPG em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde (PPGBioSaúde); ²Laboratório de Toxicidade Genética (TOXIGEN), PPGBioSaúde, ULBRA Canoas; ³Bolsista de IC PIBIC/CNPq-ULBRA, aluna do Curso de Biomedicina, ULBRA Canoas; ⁴Bolsista PIBIC-EM/CNPq-ULBRA, estudante do Ensino Médio do Colégio ULBRA São João, Canoas-RS. *mauriciol@ulbra.br

Introdução

As 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 probióticos na saúde humana e animal. A utilização de BALs e seus produtos fermentados tem conferido uma variedade de benefícios nutricionais e terapêuticos importantes, entre eles, propriedades antitumorais (Soccol et al., 2010). Entretanto, a avaliação da atividade antimutagênica de BALs não têm sido amplamente estudada e, portanto, há poucos relatos descritos na literatura científica. O presente estudo tem o objetivo de avaliar a atividade mutagênica e antimutagênica de uma cepa de *Lactobacillus paracasei* (LAC104) isolada de queijo tipo "Serrano" produzido no Estado do Rio Grande do Sul em células somáticas de *Drosophila melanogaster*, através do teste para a Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART). Quatro diferentes concentrações de LAC104 (10^{10} , 10^8 , 10^6 e 10^4 céls/mL) foram utilizadas através do cruzamento padrão. Como controle positivo nos estudos de antimutagenicidade genética foi utilizado o etilmetanossulfonato (EMS) e foram realizados pré-tratamento e pós-tratamento.

Resultados

Tabela 1. Resultados obtidos no teste SMART com a progênie *mwh/flr³* do cruzamento padrão (CP) após exposição crônica de larvas de 3º estágio a quatro concentrações de cultura de *Lactobacillus paracasei* (LAC104) vivas e mortas.

Tratamentos	N. de moscas (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a				Total 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	
Controle negativo	60	0,48 (29)	0,07 (04)	0,02 (01)	0,57 (34)	34
Controle Positivo	60	3,38 (203) +	0,58 (35) +	0,20 (12) +	4,17 (250) +	249
Bactérias vivas						
LAC104 10^4 céls/mL	60	0,62 (37) -	0,07 (04) -	0,03 (02) i	0,72 (43) -	43
LAC104 10^6 céls/mL	60	0,55 (33) -	0,07 (04) -	0,02 (01) -	0,63 (38) -	38
LAC104 10^8 céls/mL	60	0,52 (31) -	0,07 (04) -	0,00 (00) -	0,58 (35) -	35
LAC104 10^{10} céls/mL	60	0,45 (27) -	0,12 (07) i	0,07 (04) i	0,63 (38) -	38
Bactérias mortas						
LAC104 10^4 céls/mL	60	0,32 (19) -	0,13 (08) i	0,02 (01) -	0,47 (28) -	28
LAC104 10^6 céls/mL	60	0,60 (36) -	0,05 (03) -	0,00 (00) -	0,65 (39) -	39
LAC104 10^8 céls/mL	60	0,52 (31) -	0,10 (06) i	0,00 (00) -	0,62 (37) -	36
LAC104 10^{10} céls/mL	60	0,40 (24) -	0,10 (06) i	0,03 (02) i	0,53 (32) -	32

^aDiagnóstico estatístico através do teste binomial condicional: -, negativo; i, inconclusivo; m, fator demultiplicação 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 após exposição crônica de larvas de 3º estágio ao pré-tratamento com quatro concentrações de cultura de *Lactobacillus paracasei* (LAC104) vivas e mortas ou salina 0,9%, seguido do tratamento com EMS (5 mM) ou salina 0,9%.

Tratamentos	N. de moscas (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a				Total manchas <i>mwh</i> ^c (n)		
		LAC104 (céls/mL)	EMS (mM)	MSP (1-2 céls) ^b m = 2	MSG (>2 céls) ^b m = 5		MG m = 5	TM m = 2
Vivas								
0	30	0	0	0,43 (13)	0,03 (01)	0,00 (00)	0,47 (14)	14
0	50	5	5	7,94 (397) *	3,72 (186) *	1,72 (86) *	13,38 (669) *	630
10^4	50	5	5	5,84 (292) f+	3,38 (169) -	1,64 (82) -	10,86 (543) f+	498
10^6	50	5	5	6,38 (319) -	2,86 (143) f+	1,70 (85) -	10,94 (547) -	520
10^8	60	5	5	7,00 (420) f+	3,23 (194) -	1,55 (93) -	11,78 (707) f+	672
10^{10}	30	5	5	6,63 (199) f+	4,20 (126) -	1,67 (50) -	12,50 (375) -	364
Mortas								
0	30	0	0	0,43 (13)	0,03 (01)	0,00 (00)	0,47 (14)	14
0	50	5	5	7,94 (397) *	3,72 (186) *	1,72 (86) *	13,38 (669) *	630
10^4	50	5	5	7,86 (393) -	3,62 (181) -	1,90 (95) -	13,38 (669) f+	627
10^6	60	5	5	6,88 (413) f+	3,25 (195) f+	1,72 (103) -	11,85 (711) -	671
10^8	50	5	5	6,58 (329) f+	3,00 (150) -	1,64 (82) f+	11,22 (561) f+	594
10^{10}	30	5	5	6,27 (188) f+	2,90 (87) -	1,97 (29) -	11,13 (334) f+	302

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): *, positivo quando comparado ao controle negativo; -, negativo; f+, fraco-positivo, quando comparado ao tratamento com salina + EMS, $P \leq 0,05$. ^bIncluindo manchas simples *flr³* raras. ^cForam considerados apenas os clones *mwh* das manchas simples *mwh* e das manchas gêmeas.

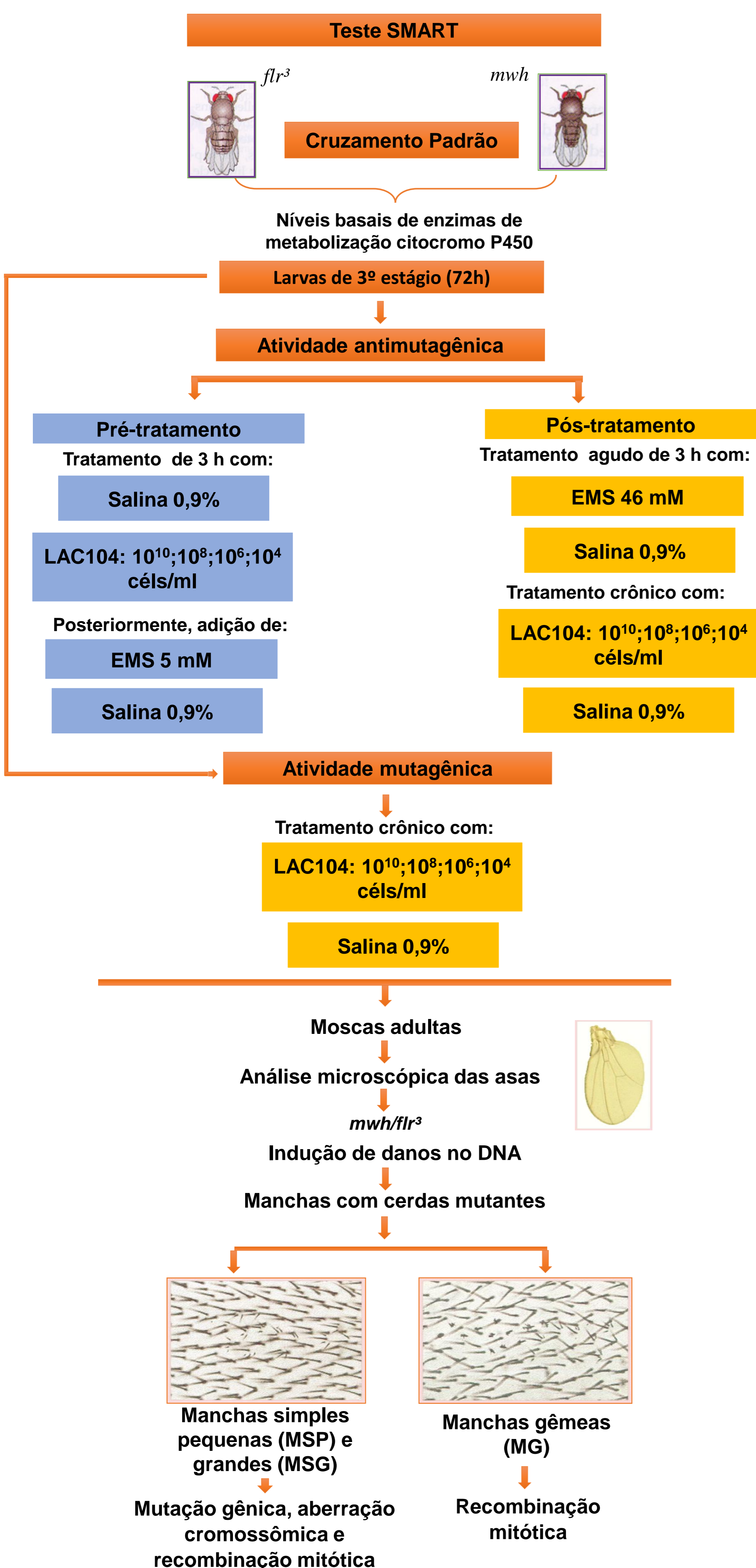
Tabela 3. Resultados obtidos no teste SMART com a progênie *mwh/flr³* do cruzamento padrão após exposição aguda (3 h) de larvas de 3º estágio ao mutágeno etilmetanossulfonato (EMS 46 mM), seguida do pós-tratamento com quatro concentrações de *Lactobacillus paracasei* (LAC104) ou salina 0,9%.

Tratamentos	N. de moscas (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a				Total manchas <i>mwh</i> ^c (n)		
		EMS (mM)	LAC104 (céls/mL)	MSP (1-2 céls) ^b m = 2	MSG (>2 céls) ^b m = 5		MG m = 5	TM m = 2
0	30	0	0	0,63 (19)	0,20 (06)	0,10 (03)	0,93 (28)	28
46	30	0	0	1,47 (44) *	2,63 (79) *	1,90 (57) *	6,00 (180) *	167
46	30	10^4	10^4	1,73 (52) -	2,60 (78) -	0,93 (28) +	5,27 (158) -	144
46	30	10^6	10^6	1,30 (39) -	2,40 (72) -	0,77 (23) +	4,47 (134) f+	120
46	30	10^8	10^8	0,83 (25) +	2,17 (65) -	0,87 (26) +	3,87 (116) f+	103
46	30	10^{10}	10^{10}	1,73 (52) -	1,63 (49) +	1,13 (34) +	4,50 (135) f+	122

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): *, positivo quando comparado ao controle negativo; -, negativo; f+, fraco-positivo, quando comparado ao tratamento com EMS + salina, $P \leq 0,05$. ^bIncluindo manchas simples *flr³* raras. ^cForam considerados apenas os clones *mwh* das manchas simples *mwh* e das manchas gêmeas.

Discussão

- Os resultados referentes à atividade mutagênica obtidos no cruzamento padrão mostram que a linhagem LAC 104, tanto viva quanto morta, não aumentou a frequência de danos genéticos quando comparada ao controle negativo, o que permite caracterizá-la como destituída de atividade mutagênica e recombinogênica no teste SMART (Tabela 1). Este resultado está de acordo com alguns dados descritos na literatura científica com outras bactérias probióticas (Kim et al., 2012; Chiu et al., 2013).
- 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 , 10^8 e 10^{10} céls/mL (Tabela 2).
- 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 10^6 , 10^8 e 10^{10} células/mL (Tabela 3). 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.
- 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 Bibliográficas

- CALDINI, G., TROTTA, F., CORSETTI, A., CENCI, G. Evidence for in vitro antigenotoxicity of cheese non starter lactobacilli. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 93, p. 51-59, 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, n. 4, p. 297-308, 1988.
- SOCOL, C.R., VANDENBERGHE, L.P.S., SPIER, M.R., MEDEIROS, A.B.P., YAMAGISHI, C.T., LINDNER, J.D., PANDEY, A., THOMAZ-SOCOL, T. The Potential of Probiotics, *Food Technology and Biotechnology*, v. 48, p. 413-434, 2010.
- VILLARINI, M., CALDINI, G., MASSIMO, M., TROTTA, F., PASQUINI, R., CENCI, G., 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.

Suporte financeiro: CNPq e FAPERGS