



ESTUDO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DE *Lactobacillus paracasei*

Guilherme dos Santos Pozzebon¹
Renata Chequeller de Almeida²
Rafael Rodrigues Dihl³
Mauricio Lehmann⁴

RESUMO

Um número considerável de benefícios para a saúde tem sido postulado como resultado da ingestão de probióticos. As principais preparações probióticas atualmente disponíveis no mercado pertencem ao grupo de bactérias designadas como ácido lácticas (BALs), que apresentam um amplo potencial de aplicação, abrangendo desde sua incorporação como parte do processo de fermentação em produtos lácteos, até à sua utilização como probióticos na saúde humana e animal. Considerando o aumento no consumo humano de produtos lácteos contendo estes microrganismos, cada vez mais se faz necessário avaliarmos a sua segurança, especialmente no que se refere à indução de danos ao material genético. Neste sentido, o presente estudo avaliou a atividade mutagênica de BALs através do teste para detecção de mutação e recombinação em células somáticas de *Drosophila melanogaster* (SMART). Foram avaliadas quatro diferentes concentrações (10^4 , 10^6 , 10^8 e 10^{10} células/mL) de BALs da linhagem LAC 104 de *Lactobacillus paracasei* proveniente de queijo artesanal nativo da Região Nordeste do estado do Rio Grande do Sul. Os resultados obtidos no cruzamento padrão mostram que a linhagem LAC 104 não aumentou a frequência de danos genéticos quando comparada ao controle negativo, o que permite caracterizá-la como destituída de atividade mutagênica e recombinogênica neste bioensaio. Ainda que a atividade mutagênica da linhagem LAC 104 não tenha sido previamente avaliada, a ausência de indução de danos genéticos verificada neste estudo está de acordo com alguns resultados descritos na literatura científica com outras bactérias probióticas, o que reforça as informações que confirmam a segurança do consumo destes microrganismos.

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

INTRODUÇÃO

Os probióticos são considerados suplementos alimentares à base de microrganismos vivos que afetam benéficamente o animal hospedeiro, promovendo o balanço de sua microbiota intestinal. Entretanto, atualmente, a definição aceita internacionalmente é que eles são microrganismos vivos, administrados em quantidades adequadas, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002).

A grande maioria dos probióticos pertence a dois grupos de microrganismos produtores de ácido láctico, sendo as bifidobactérias e as bactérias ácido lácticas (BALs) com baixo conteúdo de GC, as principais, entre as quais se destacam os gêneros: *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* (Kleerebezem; Vaughan, 2009), *Escherichia*, *Bacillus* algumas linhagens de fungos pertencentes ao gênero *Saccharomyces* (GUPTA; GARG, 2009).

Atualmente, as utilizações e aplicações propostas quanto ao uso de 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; VECCHIO, 2013). Para tanto, indústrias agroalimentares integraram novos produtos, sobretudo lácteos, aos quais são atribuídas qualidades probióticas (ASHRAF; SHAH, 2011).

¹Aluno do Colégio ULBRA São João – Bolsista PIBIC-EM/CNPq

²Aluna de Doutorado do PPGBIOSAÚDE

³Professor do Curso de Graduação de Biologia e PPGBIOSAÚDE

⁴Professor do Curso de Graduação de Engenharia Ambiental e PPGBIOSAÚDE – mauriciol@ulbra.br

Um número considerável de benefícios para a saúde tem sido postulado como resultado da ingestão de probióticos, incluindo a modificação da microbiota intestinal, a prevenção da colonização de patógenos, a estimulação da imunidade do intestino, redução de reações inflamatórias, alívio de intolerância à lactose, redução das alergias alimentares (AHMADOVA et al., 2013a,b; FORSBERG et al., 2013; LIU et al., 2013; RASK et al., 2013), prevenção e tratamento de doenças gastrointestinais, trato respiratório e urogenital (NAGPAL et al., 2012) e produção de vitaminas do grupo B, como folato, riboflavina e vitamina B12 (LEBLANC et al., 2011).

Entre os possíveis mecanismos que explicam os benefícios acima citados está a competição dos probióticos com bactérias ou vírus patogênicos por sítios de ligação sobre as células epiteliais, impedindo possíveis infecções. Da mesma forma, os probióticos podem também inibir o crescimento de bactérias patogênicas, produzindo ácidos orgânicos (especialmente os ácidos acético e láctico), peróxido de hidrogênio e outros compostos como as bacteriocinas (ex.: nisina), e peptídeos antifúngicos (AHMADOVA et al., 2013a; CHAI et al., 2013; SCHOSTER et al., 2013).

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.

OBJETIVO

Avaliar a atividade mutagênica da linhagem LAC 104 de *Lactobacillus paracasei* proveniente de queijo artesanal nativo da Região Nordeste do estado do Rio Grande do Sul, *in vivo*, em células somáticas de *Drosophila melanogaster* através do teste para a Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART).

METODOLOGIA

Alinhagem LAC 104 de *Lactobacillus paracasei* foi previamente isolada de queijo tipo “Serrano” (DELAMARE et al., 2012) e armazenada no Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Microbiologia Aplicada do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul (UCS) sob coordenação do Dr. Sérgio Echeverrigaray Laguna. Neste laboratório foram executados todos os procedimentos relacionados à preparação das culturas, que posteriormente foram enviadas ao Laboratório de Toxicidade Genética – TOXIGEN da ULBRA Canoas-RS, para a execução dos experimentos para avaliação da atividade mutagênica. A linhagem bacteriana foi inicialmente incubada em meio MRS, a 37°C por 24h. As células foram coletadas por centrifugação e, após lavagem, foram ressuspensas em solução salina (NaCl 0,9%) para obter a concentração inicial de 10^{10} células/ml, a partir da qual foram preparadas as demais concentrações. Os experimentos foram realizados com bactérias vivas e bactérias mortas, uma vez que a comparação dos resultados obtidos poderá indicar se o efeito observado está relacionado à viabilidade celular.

No teste SMART foi utilizado o cruzamento padrão com as linhagens designadas como *flr³* e *mwh*, originando larvas portadoras de nível basal de atividade metabólica dependente de citocromo P-450. Para maiores detalhes sobre o teste SMART ver Andrade, Lehmann e Reguly (2004). As larvas coletadas a partir do cruzamento foram submetidas ao tratamento crônico em tubos plásticos contendo 1,5 g de meio instantâneo onde foram adicionados 5mL das soluções de tratamento: controle negativo (solução salina), controle positivo (uretano 20 mM) e quatro diferentes concentrações de BALs (10^{10} ; 10^8 ; 10^6 e 10^4 células/mL).

Foram analisadas as asas das moscas observando-se os fenótipos das cerdas existentes

em microscópio óptico com aumento de 400x. O tipo de mancha mutante observada nas asas dos adultos permite a caracterização de eventos genotóxicos distintos. Desta forma, as manchas simples podem originar-se tanto por eventos mutacionais - incluindo mutações pontuais e aberrações cromossômicas - como também por recombinação mitótica. Já as manchas gêmeas, que expressam concomitantemente os fenótipos *flr*³ e *mwh*, são produtos exclusivos de eventos recombinacionais.

Os dados obtidos no controle positivo e nas diferentes concentrações de BAL foram comparados com o controle negativo. Para tanto, foi utilizado o teste binomial condicional de Kastambaum e Bowman, seguindo o procedimento de decisões múltiplas de acordo com Frei e Würzler (1988).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados preliminares obtidos até o momento referem-se à atividade mutagênica da linhagem LAC 104 de *Lactobacillus paracasei* vivas e mortas e estão apresentados na Tabela 1.

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.

A avaliação da atividade mutagênica de BALs não tem sido amplamente estudada e, portanto, há poucos relatos descritos na literatura científica. Neste sentido, não foram observadas atividades mutagênica e clastogênica do sobrenadante obtido de culturas de *Bacillus mojavensis* KJS-3, quando avaliado através do teste de Ames em *Salmonella typhimurium* do teste de aberrações cromossômicas em células pulmonares de hamster Chinês (CHL), na presença e ausência de ativação metabólica (KIM et al., 2012). Adicionalmente, os autores verificaram redução dose-dependente no número de revertentes de *S. typhimurium* quando comparado ao controle negativo, indicando que compostos antimutagênicos foram produzidos durante o processo de fermentação do meio de cultura pela cepa KJS-3 de *B. mojavensis*.

A ausência de atividade mutagênica da LAC 104 verificada neste estudo está de acordo com alguns resultados descritos na literatura científica com outras bactérias probióticas. Neste sentido, Kim et al. (2012) não observaram atividades mutagênica e clastogênica do sobrenadante obtido de culturas de *Bacillus mojavensis* KJS-3, quando avaliado através do teste de Ames em *Salmonella typhimurium* e do teste de aberrações cromossômicas em células pulmonares de hamster Chinês (CHL), na presença e ausência de ativação metabólica. Adicionalmente, Chiu et al. (2013) analisaram a atividade mutagênica de uma mistura liofilizada contendo as bactérias probióticas *Lactobacillus rhamnosus* LCR177, *Bifidobacterium adolescentis* BA286 e *Pediococcus acidilactici* PA318. Neste estudo foram utilizados diferentes bioensaios: teste de AMES em 5 linhagens de *Salmonella typhimurium*, o teste de aberrações cromossômicas em células de ovário de hamster Chinês CHO-K1 e o teste de micronúcleos em células do sangue periférico de camundongos ICR. Os resultados obtidos mostraram que a mistura probiótica multi-espécies não apresentou atividade mutagênica nas diferentes avaliações realizadas.

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 de manchas mwh ^c (n)	
		Manchas simples pequenas (1-2 céls) ^b m = 2	Manchas simples grandes (>2 céls) ^b m = 5	Manchas gêmeas m = 5		
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
<i>Bactérias vivas</i>						
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
<i>Bactérias mortas</i>						
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.

CONCLUSÕES

Os dados aqui apresentados demonstram que a linhagem LAC 104 de *Lactobacillus paracasei* com células viáveis e não viáveis não induz danos no DNA quando avaliada através do cruzamento padrão do teste SMART em *D. melanogaster*.

Estes dados reforçam as informações prévias descritas na literatura científica, que mostram a segurança do consumo de probióticos.

REFERÊNCIAS

- AHMADOVA, A. et al. Antimicrobial and antifungal activities of *Lactobacillus curvatus* strain isolated from homemade Azerbaijani cheese. **Anaerobe**, v. 20, p. 42-49, 2013a.
- AHMADOVA, A. et al. Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. **Food Control**, v. 30, p. 631-641, 2013b.
- 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.
- ANNUNZIATA, A.; VECCHIO, R. Consumer perception of functional foods: A conjoint analysis with probiotics. **Food Quality and Preference**, v. 28, p. 348-355, 2013.

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.

CHAI, W. D., et al. Antiviral effects of a probiotic *Enterococcus faecium* strain against transmissible gastroenteritis coronavirus. **Archives of Virology**, v. 158, p. 799-807, 2013.

CHIU, Y.-J., et al. Genotoxicity assessment of multispecies probiotics using reverse mutation, mammalian chromosomal aberration, and rodent micronucleus tests. **The Scientific World Journal**, v. 2013, Article ID 254239.

DELAMARE, A.P.L., et al. Microbiological, physico-chemical and sensorial characteristics of serrano, an artisanal Brazilian cheese. **Food and Nutrition Sciences**, v. 3, p. 1068-1075, 2012.

FAO/WHO, Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organizations Guidelines for the evaluation of probiotics in food. **Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, 2002**. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf>. Acesso em: 15/07/2015.

FORSBERG, A., et al. Re- and post-natal *Lactobacillus reuteri* supplementation decreases allergen responsiveness in infancy. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 43, p. 434-442, 2013.

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.

GUPTA, V.; GARG, R. Probiotics. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 27, p. 202-209, 2009.

KIM, K.M., et al. Evaluation of genotoxicity of *Bacillus mojavensis* KJS-3 on culture supernatant for use as a probiotic. **Molecular & Cellular Toxicology**, v. 8, p. 77-81, 2012.

KLEEREBEZEM, M.; VAUGHAN, E.E. Probiotic and gut lactobacilli and bifidobacteria: molecular approaches to study diversity and activity. **Microbiology**, v. 63, p. 269-290, 2009.

LEBLANC, J.G., et al. 1B-Group vitamin production by lactic acid bacteria - current knowledge and potential applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, p. 1297-1309, 2011.

LIU, X. M., et al. Screening of lactobacilli with antagonistic activity against enteroinvasive *Escherichia coli*. **Food Control**, v. 30, p. 563-568, 2013.

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.

RASK, C., et al. Differential effect on cell-mediated immunity in human volunteers after intake of different lactobacilli. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 172, p. 321-332, 2013.

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.

SCHOSTER, A., et al. *In vitro* inhibition of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* by commercial probiotic strains. **Anaerobe**, v. 20, p. 36-41, 2013.