



## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TÓXICO-GENÉTICA DE *Lactobacillus paracasei* ATRAVÉS DO TESTE SMART

Felipe de Freitas Knopka<sup>1</sup>  
Renata Chequeller de Almeida<sup>2</sup>  
Rafael Rodrigues Dihl<sup>3</sup>  
Mauricio Lehmann<sup>4</sup>

### RESUMO

De acordo com uma série de estudos científicos, a ingestão de probióticos apresenta diversos benefícios para a saúde, e as principais preparações probióticas atualmente disponíveis no mercado pertencem ao grupo de bactérias designadas como ácido lácticas (BALs). 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 tóxico-genética da linhagem LAC 104 de *Lactobacillus paracasei*, isolada de queijo artesanal nativo da Região Nordeste do estado do Rio Grande do Sul, 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) da bactéria em dois cruzamentos distintos, padrão e aprimorado, que diferem entre si na quantidade de enzimas de metabolização do tipo citocromo P450. Os resultados obtidos no cruzamento padrão e aprimorado mostram que a linhagem LAC 104 não aumentou a frequência total de manchas mutantes quando comparada ao controle negativo, o que permite caracterizá-la como destituída de atividade mutagênica neste bioensaio. Entretanto, no cruzamento aprimorado verificou-se aumento na frequência de manchas gêmeas, que são geradas exclusivamente por eventos recombinacionais. Ainda que a atividade mutagênica da linhagem LAC 104 não tenha sido previamente avaliada, a ausência de indução de danos genéticos, relacionados com mutação gênica ou cromossômica, verificada neste estudo está de acordo com alguns resultados descritos na literatura científica com outras bactérias probióticas.

Palavras-chave: Bactérias ácido lácticas; mutação; recombinação; *Drosophila melanogaster*.

### INTRODUÇÃO

Os probióticos são definidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (ANVISA, 2002). Dentre a vasta gama de bactérias utilizadas como probióticos, os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são mais frequentemente empregados, uma vez que têm sido isolados de todas as porções do trato gastrointestinal de humanos e preenchem as condições para um bom probiótico. Importantes atributos das cepas de probióticas são os fatores de colonização, a capacidade de acumular substâncias inertes a fim de proteger suas enzimas contra a ação do calor, frio, desidratação e exposição ao ambiente gastrointestinal (VASILJEVIC E SHAH, 2008), adesividade às células da mucosa intestinal, velocidade específica de crescimento elevada e capacidade de produzir substâncias antimicrobianas contra bactérias patogênicas (LEBEER,

<sup>1</sup> Aluno do Colégio Ulbra São João – Bolsista PIBIC-EM/CNPq – ffkknopka@gmail.com

<sup>2</sup> Aluna de Doutorado do PPGBIOSAÚDE – re\_cll@yahoo.com.br

<sup>3</sup> Professor do curso de Biologia e PPGBIOSAÚDE – rafael.rodrigues@ulbra.br

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

VANDERLEYDEN, DE KEERSMAECKER, 2010). A atividade antagonística é outro requisito fundamental para a sobrevivência no intestino (SCHILLINGER et al., 2005).

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 lático), 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, cada vez mais se faz necessário avaliarmos a segurança de seu consumo. Neste sentido o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade mutagênica e recombinogênica da linhagem LAC 104 de *Lactobacillus paracasei*, em células somáticas de *Drosophila melanogaster* através do teste para a Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART), utilizando os cruzamentos padrão e aprimorado.

## METODOLOGIA

A linhagem LAC 104 de *Lactobacillus paracasei* foi previamente isolada de queijo tipo “Serrano” (DELAMARE et al., 2012) produzido na região Nordeste do estado do Rio Grande do Sul. Esta linhagem permaneceu 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 ativas e bactérias inativadas pelo calor, 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 *flr<sup>3</sup>* e *mwh*, originando larvas portadoras de nível basal de atividade metabólica dependente de citocromo P-450 (CYP450) e o cruzamento aprimorado, com as linhagens *mwh* e *ORR;flr<sup>3</sup>*, que gera larvas com elevada expressão de enzimas CYP450. Para maiores detalhes sobre o teste SMART ver Andrade, Lehmann e Reguly (2004). As larvas coletadas a partir dos cruzamentos foram submetidas ao tratamento crônico em tubos plásticos contendo 1,5 g de meio instantâneo onde foram adicionados 5 mL 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*<sup>3</sup> 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 Würigler (1988).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos revelam que em ambos os cruzamentos, tanto a cultura de bactérias ativas, como inativas, não aumentaram a frequência total de manchas quando comparadas ao controle negativo em todas as concentrações avaliadas, o que permite caracterizá-las como destituídas de atividade mutagênica no teste SMART (Tabelas 1 e 2). Apesar da ausência de mutagenicidade, é importante destacar que a análise dos diferentes tipos de manchas mostra que, no cruzamento aprimorado (Tabela 2), a bactéria viva, nas concentrações de 10<sup>8</sup> e 10<sup>10</sup>, e morta, nas concentrações de 10<sup>6</sup>, 10<sup>8</sup> e 10<sup>10</sup>, aumentaram a frequência de manchas gêmeas. Considerando o fato de que a ocorrência de manchas gêmeas é o resultado exclusivo de eventos recombinacionais, especificamente envolvendo a região do cromossomo 3 entre o locus do gene *flr*<sup>3</sup> e o centrômero, fica o alerta quanto a ocorrência deste tipo de lesão associada ao consumo destes microrganismos.

A avaliação da atividade mutagênica de BALs não tem sido amplamente estudada e, portanto, há poucos relatos descritos na literatura científica. A ausência de atividade mutagênica da linhagem LAC104 de *Lactobacillus paracasei* 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, 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*.

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.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados aqui apresentados demonstram que a linhagem LAC 104 de *Lactobacillus paracasei* com células viáveis e não viáveis não induz danos no DNA, do tipo mutação gênica e cromossômica, quando avaliada através do cruzamento padrão e aprimorado do teste

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

Tabela 1: Resultados do teste SMART com a progênie *mwh/flr*<sup>3</sup> do cruzamento padrão após exposição crônica de larvas de 3º estágio às concentrações de *L. paracasei* (LAC104) ativas e inativas.

Tratamentos	Nº de moscas (N)	Manchas por indivíduo (nº de manchas) diag. estatístico <sup>a</sup>				Total manchas <i>mwh</i> <sup>c</sup> (n)
		MSP <sup>b</sup> (1-2 céls) <sup>c</sup> m = 2	MSG <sup>d</sup> (>2 céls) <sup>c</sup> m = 5	MG <sup>e</sup> m = 5	TM <sup>f</sup> m = 2	
CN <sup>d</sup>	60	0,52 (31)	0,12 (07)	0,02 (01)	0,65 (39)	39
CP <sup>e</sup>	60	3,38 (203) +	0,58 (35) +	0,20 (12) +	4,17 (250) +	249
<b>LAC 104 ativas</b>						
10 <sup>4</sup> céls/mL	60	0,62 (37) -	0,07 (04) -	0,03 (02) i	0,72 (43) -	43
10 <sup>6</sup> céls/mL	60	0,55 (33) -	0,07 (04) -	0,02 (01) -	0,63 (38) -	38
10 <sup>8</sup> céls/mL	60	0,52 (31) -	0,07 (04) -	0,00 (00) -	0,58 (35) -	35
10 <sup>10</sup> céls/mL	60	0,45 (27) -	0,12 (07) -	0,07 (04) i	0,63 (38) -	38
<b>LAC 104 inativas</b>						
10 <sup>4</sup> céls/mL	60	0,32 (19) -	0,13 (08) i	0,02 (01) -	0,47 (28) -	28
10 <sup>6</sup> céls/mL	60	0,60 (36) -	0,05 (03) -	0,00 (00) -	0,65 (39) -	39
10 <sup>8</sup> céls/mL	60	0,52 (31) -	0,10 (06) -	0,00 (00) -	0,62 (37) -	36
10 <sup>10</sup> céls/mL	60	0,40 (24) -	0,10 (06) -	0,03 (02) i	0,53 (32) -	32

<sup>a</sup>Diagnóstico estatístico através do teste binomial condicional: -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância  $\alpha=\beta=0,05$ . <sup>b</sup>MSP: manchas simples pequenas. <sup>c</sup>Inclui manchas simples *flr*<sup>3</sup>raras. <sup>d</sup>MSG: manchas simples grandes. <sup>e</sup>MG: manchas gêmeas. <sup>f</sup>TM: total de manchas. <sup>g</sup> Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas. <sup>h</sup>CN: controle negativo, solução salina 0,9%. <sup>i</sup>CP: Controle positivo, uretano 20 mM.

Tabela 2: Resultados do teste SMART com a progênie *mwh/flr*<sup>3</sup> do cruzamento aprimorado após exposição crônica de larvas de 3º estágio às concentrações de *L. paracasei* (LAC104) ativas e inativas.

Tratamentos	Nº de moscas (N)	Manchas por indivíduo (nº de manchas) diag. estatístico <sup>a</sup>				Total manchas <i>mwh</i> <sup>g</sup> (n)
		MSP <sup>b</sup> (1-2 céls) <sup>c</sup> m = 2	MSG <sup>d</sup> (>2 céls) <sup>c</sup> m = 5	MG <sup>e</sup> m = 5	TM <sup>f</sup> m = 2	
CN <sup>h</sup>	60	1,43 (86)	0,15 (09)	0,05 (03)	1,63 (98)	97
CP <sup>i</sup>	60	29,18 (1751) +	8,08 (485) +	4,48 (269) +	41,75 (2505) +	2460
<b>LAC 104 ativas</b>						
10 <sup>4</sup> céls/mL	60	1,22 (73) -	0,08 (05) -	0,07 (04) i	1,37 (82) -	81
10 <sup>6</sup> céls/mL	60	1,20 (72) -	0,20 (12) i	0,05 (03) -	1,45 (87) -	86
10 <sup>8</sup> céls/mL	60	0,40 (24) -	0,17 (10) i	0,45 (27) +	1,02 (61) -	55
10 <sup>10</sup> céls/mL	60	0,50 (30) -	0,03 (02) -	0,62 (37) +	1,15 (69) -	65
<b>LAC 104 inativas</b>						
10 <sup>4</sup> céls/mL	60	1,22 (73) -	0,20 (12) i	0,07 (04) i	1,48 (89) -	87
10 <sup>6</sup> céls/mL	60	0,82 (49) -	0,20 (12) i	0,45 (27) +	1,47 (88) -	81
10 <sup>8</sup> céls/mL	60	0,77 (46) -	0,12 (07) -	0,48 (29) +	1,37 (82) -	77
10 <sup>10</sup> céls/mL	60	0,73 (44) -	0,08 (05) -	0,55 (33) +	1,37 (82) -	78

<sup>a</sup>Diagnóstico estatístico através do teste binomial condicional: -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância  $\alpha=\beta=0,05$ . <sup>b</sup>MSP: manchas simples pequenas. <sup>c</sup>Inclui manchas simples *flr*<sup>3</sup>raras. <sup>d</sup>MSG: manchas simples grandes. <sup>e</sup>MG: manchas gêmeas. <sup>f</sup>TM: total de manchas. <sup>g</sup> Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas. <sup>h</sup>CN: controle negativo, solução salina 0,9%. <sup>i</sup>CP: Controle positivo, uretano 20 mM.

## 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.
- ANVISA. Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução RDC N.º 2, de 7 de janeiro de 2002.
- 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 ScientificWorld 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.
- 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.
- 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.
- LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 171-84, 2010.
- 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.
- SCHILLINGER, U.; GUIGAS, C.; HOLZAPFEL, W. H. *In vitro* adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1289-97, 2005.
- SCHOSTER, A., et al. *In vitro* inhibition of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* by commercial probiotic strains. **Anaerobe**, v. 20, p. 36-41, 2013.
- VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics - From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 714-28, 2008.