



# Atividade modulatória de bactérias ácido lácticas sobre os danos genéticos induzidos pelo etil-metano-sulfonato

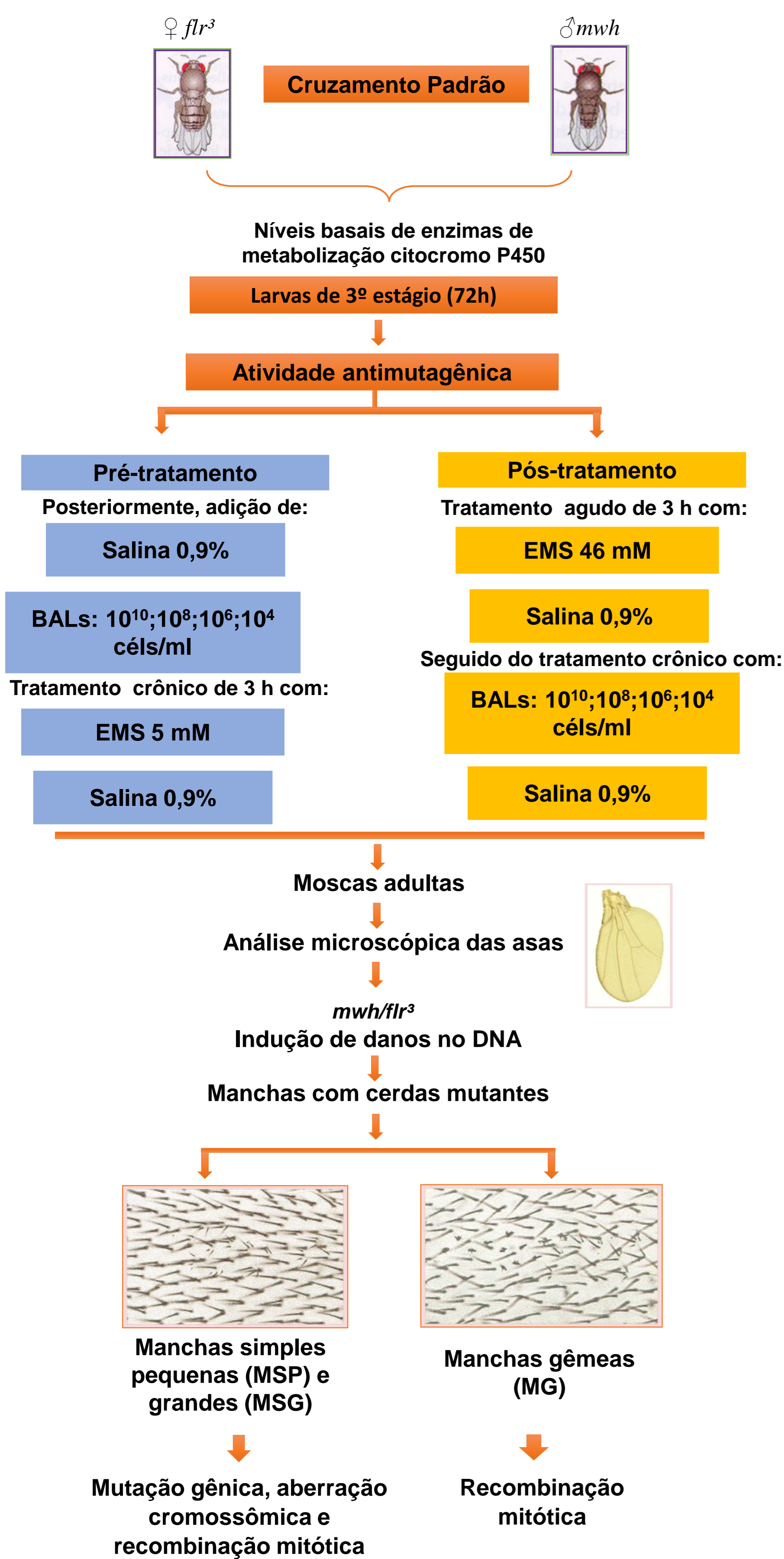
<sup>1,3,4</sup>Renata Schütts Lemos; <sup>2</sup>Renata C. de Almeida; <sup>1,4</sup>Vanessa de Souza Bizarro; <sup>1</sup>Rafael R. Dihl e <sup>1</sup>Maurício Lehmann  
<sup>1</sup>Laboratório de Toxicidade Genética (TOXIGEN), ULBRA Canoas; <sup>2</sup>Aluna de Doutorado do PPG em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde (PPGBioSaúde); <sup>3</sup>Bolsista de IC PIBIC/CNPq-ULBRA; <sup>4</sup>Aluna do Curso de Biomedicina, ULBRA Canoas. mauricio@ulbra.br

## Introdução

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. (Ashraf e Shah, 2011).

O presente estudo avaliou a atividade antimutagênica sobre os danos genéticos induzidos pelo etil-metano-sulfonato (EMS) da linhagem LAC104 de *Lactobacillus paracasei* e linhagem CCT 0360 de *Lactococcus lactis*. 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 pós-tratamento.

## Teste SMART



## 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 como no pós-tratamento (Tabela 3).

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, além do mecanismo de reparação translesão (Billbao et al., 2002). Assim, é possível que o efeito protetor da linhagem LAC 104 possa estar associado com o aumento de atividades destes mecanismos

## Referências bibliográficas

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.  
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.

## Resultados

**Tabela 1:** Resultados obtidos com a progênie *mwh/flr3* após exposição crônica de larvas de 3º estágio ao pré-tratamento com quatro concentrações de cultura de *Lactobacillus paracasei* ativas e inativas.

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

<sup>a</sup>Diagnóstico 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  $\alpha=0,05$ . <sup>b</sup>Inclui manchas simples *flr3* raras. <sup>c</sup>Considerando *mwh* para as manchas simples *mwh* e para gêmeas.

**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*, (LAC104), ativas e inativas:

Tratamentos		N. de moscas (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico <sup>a</sup>				Total de manchas mwh <sup>c</sup> (n)	Frequência de indução de clones (por 10 <sup>5</sup> células por divisão celular) <sup>d</sup> (n/NC) <sup>e</sup>	Inibição (%) <sup>f</sup>
EMS (mM)	LAC 104 (UFC/mL)		Manchas simples pequenas (1-2 céls) <sup>b</sup> m = 2	Manchas simples grandes (>2 céls) <sup>b</sup> m = 5	Manchas gêmeas <sup>c</sup> m = 5	Total de manchas m = 2			
<b><i>mwh/flr3</i></b>									
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	1,88 16,29 [14,41]	
<b><i>flr3/TM3</i></b>									
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]	
<b>Ativas</b>									
46	10 <sup>4</sup>	60	2,32 (139) +	3,20 (192) -	1,17 (70) +	6,68 (401) +	344	11,75 [9,87]	
46	10 <sup>6</sup>	60	2,55 (153) +	2,93 (176) -	1,58 (95) -	7,07 (424) -	372	12,70 [10,82]	
46	10 <sup>8</sup>	60	1,83 (110) +	2,60 (156) -	1,55 (93) +	5,98 (359) +	323	11,03 [9,15]	
46	10 <sup>10</sup>	60	2,43 (146) +	2,63 (158) -	1,65 (99) +	6,72 (403) +	343	11,71 [9,84]	
<b><i>flr3/TM3</i></b>									
46	10 <sup>4</sup>	60	1,32 (79) -	0,87 (52) -		2,18 (131) -	131	4,47 [3,69]	
46	10 <sup>6</sup>	60	1,08 (65) +	0,62 (37) -		1,70 (102) +	102	3,48 [2,70]	
46	10 <sup>10</sup>	60	1,20 (72) +	0,92 (55) -		2,12 (127) -	127	4,34 [3,55]	
<b>Inativas</b>									
46	10 <sup>4</sup>	60	2,92 (175) -	3,37 (202) +	1,78 (107) +	8,07 (484) -	416	14,21 [12,33]	
46	10 <sup>6</sup>	60	2,77 (166) +	3,65 (219) +	1,88 (113) -	8,30 (498) -	409	13,97 [12,09]	
46	10 <sup>8</sup>	60	2,65 (159) +	3,02 (181) -	1,55 (93) +	7,22 (433) +	371	12,67 [10,79]	
46	10 <sup>10</sup>	60	2,60 (156) +	3,22 (193) -	1,65 (99) +	7,47 (448) +	382	13,05 [11,17]	
<b><i>flr3/TM3</i></b>									
46	10 <sup>4</sup>	60	0,93 (56) +	0,70 (42) -		1,63 (98) +	98	3,35 [2,56]	
46	10 <sup>6</sup>	60	0,88 (53) +	0,75 (45) -		1,63 (98) +	98	3,35 [2,56]	

<sup>a</sup>Diagnóstico 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  $\alpha=0,05$ . <sup>b</sup>Inclui manchas simples *flr3* raras. <sup>c</sup>Apenas clones *mwh* podem ser observados nas moscas *mwh/TM3*, já que o cromossomo balancerador *TM3* não contém o gene mutante *flr3*. <sup>d</sup>Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas. <sup>e</sup>Calculado de acordo com Frei et al. (1992). <sup>f</sup>C = 48.000 (aproximadamente o número de células analisadas por mosca). <sup>g</sup>Valores entre colchetes representam as frequências de manchas induzidas corrigidas pela incidência espontânea estimada a partir dos controles negativos. <sup>h</sup>Calculado de acordo com Abraham (1994): % de inibição quando comparado ao tratamento com EMS 46 mM = [(mutágeno sozinho - genotóxina mais LAC 104) / genotóxina sozinho] x 100.

**Tabela 3:** Resultados obtidos com a progênie *mwh/flr3* após exposição crônica de larvas de 3º estágio ao pré-tratamento e pós-tratamento com quatro concentrações de *Lactococcus lactis* ativas e inativas.

Tratamentos		N. de moscas (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico <sup>a</sup>				Total de manchas mwh <sup>c</sup> (n)
CCT 0360 (UFC/mL)	EMS (mM)		Manchas simples pequenas (1-2 céls) <sup>b</sup> m = 2	Manchas simples grandes (>2 céls) <sup>b</sup> m = 5	Manchas gêmeas m = 5	Total de manchas m = 2	
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) *	
<b>Ativas</b>							
10 <sup>4</sup>	5	50	7,76 (388) -	2,82 (141) -	1,22 (61) -	11,80 (590) -	
10 <sup>6</sup>	5	50	8,06 (403) -	2,92 (146) -	1,42 (71) -	12,40 (620) -	
10 <sup>8</sup>	5	50	8,76 (438) -	2,98 (149) -	1,50 (75) -	13,24 (662) -	
10 <sup>10</sup>	5	50	7,02 (351) +	2,54 (127) -	1,70 (85) -	11,26 (563) -	
<b>Inativas</b>							
10 <sup>4</sup>	5	50	6,92 (346) +	3,08 (154) -	1,08 (54) -	11,08 (554) -	
10 <sup>6</sup>	5	50	7,28 (364) +	2,42 (121) -	1,36 (68) -	11,06 (553) -	
10 <sup>8</sup>	5	50	7,06 (353) +	2,74 (137) -	1,28 (64) -	11,08 (554) -	
10 <sup>10</sup>	5	50	7,58 (379) -	2,62 (131) -	1,52 (76) -	11,72 (586) -	

## PÓS-TRATAMENTO

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) *
<b>Ativas</b>						
10 <sup>4</sup>	46	50	3,40 (170) -	3,00 (150) -	2,12 (106) -	8,52 (426) -
10 <sup>6</sup>	46	50	2,46 (123) -	3,20 (160) -	1,50 (75) -	7,16 (358) -
10 <sup>8</sup>	46	50	3,76 (188) -	2,70 (135) -	2,22 (111) -	8,68 (434) -
10 <sup>10</sup>	46	50	3,14 (157) -	2,64 (132) -	1,44 (72) -	7,22 (361) -
<b>Inativas</b>						
10 <sup>4</sup>	46	50	2,36 (118) -	2,58 (129) -	1,38 (69) -	6,32 (316) -
10 <sup>6</sup>	46	50	3,06 (153) -	2,72 (136) -	1,34 (67) -	7,12 (356) -
10 <sup>8</sup>	46	50	2,68 (134) -	2,76 (138) -	1,88 (94) -	7,32 (366) -
10 <sup>10</sup>	46	50	3,66 (183) -	2,80 (140) -	1,62 (81) -	8,08 (404) -

<sup>a</sup>Diagnóstico 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  $\alpha=0,05$ . <sup>b</sup>Inclui manchas simples *flr3* raras. <sup>c</sup>Considerando *mwh* para as manchas simples *mwh* e para gêmeas.