

Citotoxicidad *in vitro* del Polipéptido Antimicrobiano Nisina sobre Células TumORAles Sanguíneas

In vitro Cytotoxicity of the Antimicrobial Polypeptide Nisin on Blood Tumor Cells

Lorena Salazar¹; Elizabeth Rivas¹; Alequis Pavón¹; Guillermo Wiese¹; Camila Manzano¹;
Paz Orellana¹; Ana Gutierrez-Moraga^{1,2}; Piedad Cortés-Cortés³ & Gino Corsini⁴

SALAZAR, L.; RIVAS, E.; PAVÓN, A.; WIESE, G.; MANZANO, C.; ORELLANA, P.; GUTIERREZ-MORAGA, A.; CORTÉS-CORTÉS, P. & CORSINI, G. Citotoxicidad *in vitro* del polipéptido antimicrobiano nisina sobre células tumorales sanguíneas. *Int. J. Morphol.*, 40(5):1276-1283, 2022.

RESUMEN: Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal secretadas por bacterias. Dentro de estas destaca nisina que posee potenciales usos en terapias antibióticas, como biopreservante de alimentos y probióticos. También se ha descrito que nisina posee citotoxicidad sobre líneas celulares neoplásicas, pero existe poca información de su efecto sobre células tumorales sanguíneas. Debido al potencial uso que presenta nisina, es relevante determinar la toxicidad que presenta sobre líneas celulares tumorales del tipo sanguíneo. Para esto, se realizaron ensayos de actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos y de toxicidad sobre células mononucleares de sangre periférica humanas, determinándose que nisina no posee efecto citotóxico sobre este tipo de células normales humanas sanguíneas. Se realizaron también, ensayos de citotoxicidad con líneas celulares tumorales (K562 y U937), con el fin de determinar dosis, tiempo de exposición y selectividad en el efecto tóxico de nisina sobre las células tumorales humanas. Estos ensayos muestran que nisina presenta actividad citotóxica sobre líneas celulares K562 y U937 a las 72 h de exposición, a una concentración de 40 µg/mL, que corresponde a 100 veces la concentración mínima inhibitoria (MIC) usada para su acción sobre bacterias. Al comparar el efecto de nisina sobre células mononucleares de sangre periférica humanas con las líneas tumorales linfoides y mieloides (K562 y U937 respectivamente), se observa un efecto selectivo de nisina sobre las células tumorales sanguíneas.

PALABRAS CLAVE: Nisina; Citotoxicidad; Bacteriocina; Células tumorales sanguíneas; Células K562 y células U937.

INTRODUCCIÓN

Los péptidos antimicrobianos producidos por bacterias han sido denominados en la literatura como bacteriocinas (Oscáriz & Pisabarro, 2001; Simons *et al.*, 2020). Estas proteínas antimicrobianas son sintetizadas de manera ribosomal y tienen un efecto tóxico sobre otras bacterias, por lo general estrechamente relacionadas con la cepa productora de la bacteriocina, a diferencia de los antibióticos tradicionales (Riley & Wertz, 2002).

Nisina es una bacteriocina tipo lantibiótico sintetizada por la bacteria Gram positivo *Lactococcus lactis* (Cotter *et*

al., 2005) y clasificada dentro de la clase I de bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivo (Etayash *et al.*, 2015). Posee 34 residuos (Fig. 1A), y presenta modificaciones post-traduccionales generando aminoácidos modificados como lantionina y metil-lantionina (Fig. 1B) (Gross & Morell, 1971). Posee actividad antibacteriana principalmente sobre bacterias Gram positivo y se emplea para el control de patógenos alimentarios como *Listeria monocytogenes* y *Clostridium botulinum* (Gao & Ju, 2008; Ibarra-Sánchez *et al.*, 2020) y para bacterias resistentes a antibióticos como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (Szweda *et al.*, 2014).

¹ Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma de Chile, Santiago, Chile.

² Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales, Departamento de Producción Agropecuaria Universidad de La Frontera, Temuco, Chile

³ Dirección de Desarrollo y Transferencia, Vicerrectoría de Investigación, Universidad de Las Américas, Chile.

⁴ Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Ciencias de la Salud y Grupo de Química y Bioquímica Aplicada en Biotecnología. Universidad Autónoma de Chile, Santiago, Chile.

Financiado por Proyecto FONDECYT 11090182 de la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID), Chile y el Proyecto GENERA-UA-2019-017 de la Universidad Autónoma de Chile.

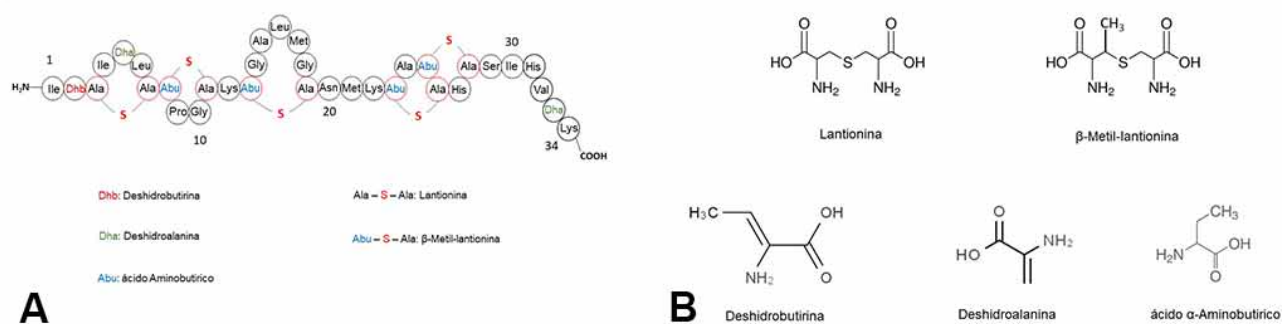


Fig. 1. Estructura primaria del polipéptido antimicrobiano nisina (A) y estructura química de los aminoácidos modificados post-traduccionalmente del tipo lantionina (B).

Las bacteriocinas ejercen su acción antimicrobiana a través de receptores específicos localizados en la cepa sensible, por lo tanto, es inusual observar actividad citotóxica sobre células eucarióticas. Sin embargo, algunas bacteriocinas inhiben específicamente el crecimiento de líneas celulares neoplásicas. El primer reporte que describe la inhibición del crecimiento celular en líneas tumorales de mamíferos data de 1976. En estos experimentos se utilizaron las bacteriocinas: vivriocina 41-S, vivriocina 506, pyocina P-1, pyocina I-4, colicina HSC y se determinó la acción de estas bacteriocinas sobre una línea celular de fibroblasto de ratón (L6OT) (Farkas-Himsley & Cheung, 1976). Otro estudio donde se demuestra el efecto citotóxico solo sobre células tumorales es el realizado empleando bacteriocinas producidas por *Mycobacterium smegmatis* (Saito & Watanabe, 1979).

Debido al potencial uso de bacteriocinas en la industria alimenticia o farmacéutica se han realizado estudios donde se ha evaluado su citotoxicidad, en líneas celulares humanas (Cotter *et al.*, 2005). El trabajo realizado con los péptidos gallidermina, daunorubicina, vancomicina, megainina I y II, nisina y melittina, sobre líneas celulares de epitelio intestinal humanas (Caco-9, HT29), mostró una baja citotoxicidad sobre células epiteliales. Esto porque la concentración inhibitoria para el 50 % de la población (IC₅₀), calculada tras la exposición de las células a los péptidos, tiene dos órdenes de magnitud mayor a la concentración utilizada para ejercer la actividad antimicrobiana (Maher & McClean, 2006).

También se ha comparado el efecto citotóxico de nisina con la bacteriocina P40 producida por *Bacillus lincheniformis* sobre células Vero encontrándose que ambas bacteriocinas poseen una baja actividad citotóxica (Vaucher *et al.*, 2010).

Uno de los primeros reportes del efecto de nisina sobre células tumorales sólidas fue el realizado por Reddy *et al.* (2004), donde evalúan el efecto sobre células HeLa. Por otra parte, el grupo de Joo *et al.* (2012), determinó las

propiedades citotóxicas y antitumorales de nisina y determinó que esta bacteriocina bloquea la tumorigénesis del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) a través de un mecanismo apoptótico (Kamarajan *et al.*, 2015).

En relación con células linfoides, se ha descrito que nisina tiene actividad citotóxica sobre células Molt-4 y Jurkat con un efecto independiente de la fragmentación del DNA (Begde, *et al.*, 2011).

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto citotóxico de nisina sobre células tumorales sanguíneas humanas, en función de la concentración y tiempo de exposición.

MATERIAL Y MÉTODO

Para los experimentos de citotoxicidad se empleó nisina, producida por *Lactococcus lactis* al 2,5 % de pureza (Sigma-Adrich). La concentración inhibitoria mínima (MIC) de nisina es de 0,4 µg/mL sobre *Lactococcus lactis* 481 (Oman & van der Donk, 2009). Las concentraciones empleadas como MIC, MIC x 10 y MIC X 100 en los diferentes experimentos corresponden a 0,4 µg/mL, 4 µg/mL y 40 µg/mL de nisina respectivamente. Nisina se preparó disolviendo el compuesto en agua nanopura estéril, en condiciones estériles.

Determinación de actividad antibacteriana. La actividad antibacteriana de nisina se determinó mediante ensayo en placa sobre césped sensible de *Staphylococcus aureus* ATCC25923. En condiciones de esterilidad, se agregaron 100 µL de un cultivo de *S. aureus* en fase exponencial de crecimiento, a 4 mL de un agar nutritivo (Difco-BD) al 0,8 % previamente fundido y estabilizado a 50 °C. Este agar de cobertura se colocó sobre una placa de Petri (Ø90 mm) previamente preparada con 15 mL de agar nutritivo (Difco-BD) y se esperó a que gelificara. Posteriormente se añadió sobre

la placa de agar con el agar de cobertura, alícuotas de 5 µL de nisina 0,4 µg/mL y se incubó durante 12 - 24 h a 37 °C. La actividad antibacteriana se determinó por la presencia de una zona de inhibición del crecimiento bacteriano en torno a la muestra de nisina sembrada sobre la superficie del agar de cobertura de la placa. Se utilizaron como control positivo 5 µL del antibiótico kanamicina (Km) 0,1 µg/mL y como control negativo 5 µL de agua nanopura estéril.

Cultivo de líneas celulares. Para el cultivo celular se utilizaron monocitos de sangre periférica (PBMC), la línea celular mieloide U937 (ATCC® CRL-1593.2™) y la línea celular linfoide K562 (ATCC® CCL-243™). Las células se cultivaron en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco®) con alta glucosa, L-glutamina y piruvato de sodio o medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco®) con L-glutamina y HEPES. Los cultivos se suplementaron con suero fetal bovino al 10 % (Gibco®) y penicilina/estreptomina (Gibco®) al 1 % y se incubaron a 37 °C en atmósfera controlada con 5 % de CO₂.

Actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos. Eritrocitos frescos humanos se obtuvieron a través de una centrifugación a 3500 rpm por 10 min en un tubo de vidrio de lumen estrecho (Ø 2 mm). El concentrado de eritrocitos se lavó con PBS y se centrifugó a 1000 rpm durante 8 min, esta operación se repitió hasta que el sobrenadante obtenido fue traslucido. Los eritrocitos se resuspendieron en PBS para lograr una concentración 4 % v/v. En una placa de 96 pocillos, se distribuyeron 100 µL de esta solución, en cada pocillo y se agregó nisina en 3 concentraciones distintas, MIC (0,4 µg/mL), 10 veces la MIC (4 µg/mL) y 100 veces la MIC (40 µg/mL). Se incubaron por 1 h a 37 °C y posteriormente fueron centrifugados a 1000 rpm durante 5 min. Se determinó la hemoglobina libre del sobrenadante por espectrofotometría a 492 nm, Como control se empleó Tritón X-100 al 0,1 % para obtener el 100 % de hemólisis. El ensayo se repitió 3 veces y siempre en triplicado. El porcentaje de hemólisis se calculó según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de hemólisis} = \frac{A_{492} \text{ solución del péptido} - A_{492} \text{ PBS}}{A_{492} \text{ Tritón X100} - A_{492} \text{ PBS}}$$

Actividad citotóxica sobre células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanos. Se obtuvo 10 mL de Sangre periférica humana con EDTA, se diluyó con PBS, logrando una razón 2:1. Luego se realizó un gradiente de densidad con Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) para la purificación de células mononucleares. Se centrifugó durante 20 min a 1.800 rpm. Las células obtenidas se incubaron con medio RPMI suplementado con Suero Fetal Bovino (FBS) al 10 % a 37 °C en condiciones de saturación de aire al 5 % de CO₂.

Viabilidad celular mediante tinción vital con azul de Tripán. Las células se sembraron a una concentración de 1 x 10⁶ células/mL en placas de 24 pocillos. Se incubaron con 3 concentraciones distintas de nisina 0,4 µg/mL (valor de MIC), 4 µg/mL (10 veces la MIC) y 40 µg/mL (100 veces la MIC). Las células se incubaron durante 24, 48 y 72 h a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5 %. Posteriormente, se determinó del número de células viables empleando el colorante vital azul de tripán (Freshney, 2010). Para el conteo celular se utilizó un contador de células automático (Countess® Automated Cell, Life Technologies, Invitrogen).

Viabilidad celular mediante ensayo MTT. Las líneas tumorales U937 y K562 se incubaron y se trataron como se describió anteriormente. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo con bromuro de 3-(4,5 dimetiliazol-2-il) 2,5 difeniltetrazolio (MTT) (Maher & McClean, 2006). La absorbancia se determinó por espectrometría a 492 nm.

Análisis estadístico. Los análisis estadísticos se realizaron empleando test no paramétricos. Se realizó el test Mann Whitney, el test Kruskal-Wallis y un post-test de Dunn's. Datos procesados con el programa estadístico GraphPad Prism 5. *** Valor p < 0,0001; ** valor p < 0,005; * valor p < 0,05.

RESULTADOS

Como primer paso se evaluó la capacidad antibacteriana de nisina sobre la bacteria Gram positivo *Staphylococcus aureus*, empleando la concentración mínima inhibitoria (MIC) de 0,4 µg/mL, documentada en literatura (Oman & van der Donk, 2009). Los resultados de los ensayos de difusión en placa muestran que nisina, a la concentración ensayada, inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus* (Fig. 2).

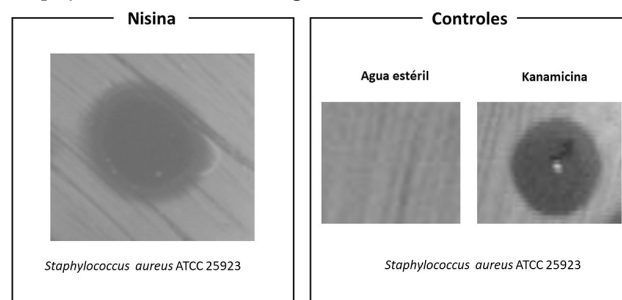


Fig. 2. Actividad antibacteriana de Nisina mediante ensayo de difusión en placa sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Se utilizó una concentración de 0,4 µg/mL de Nisina, como controles se empleó agua nanopura estéril y kanamicina 0,1 µg/mL. La actividad antibacteriana se determinó por la generación de una zona de inhibición de crecimiento radial en el punto de siembra de nisina o el antibiótico kanamicina.

Para determinar si existe un efecto citotóxico diferencial *in vitro* de nisina sobre células sanguíneas a concentraciones con significación biológica (1 vez hasta 100 veces el valor de la MIC), se realizaron experimentos para determinar la viabilidad celular a distintas concentraciones y tiempos de incubación.

Actividad citotóxica de nisina sobre células de sangre periférica. El potencial hemolítico de nisina se evaluó a través de un ensayo de hemólisis de eritrocitos (RBC) humanos. Nisina, mostró una baja actividad hemolítica a las concentraciones ensayadas (Fig. 3A), obteniéndose un promedio de hemólisis de 8,05 % ± 1,21 a 40 µg/mL de nisina. Así mismo, nisina no mostró efecto citotóxico sobre PBMC a las concentraciones ensayadas (Fig. 3B). En cambio, se observó un efecto en la proliferación celular de los PBMC los que aumentaron en un 80 % con relación al valor control, al incubar con 40 µg/mL de nisina durante 24 h. Este aumento se mantuvo constante hasta las 72h de incubación con 40 µg/mL de nisina (Fig. 4).

Efecto citotóxico *in vitro* de nisina sobre líneas tumorales. En células K562 (línea tumoral linfoide) la sobrevida o viabilidad, determinada mediante el ensayo con MTT, se afectó principalmente a una concentración de 40 µg/mL (11,9 µM) de nisina, presentando una sobrevida del 80,70 % ± 13,43 a las 48 h y de 66,79 % ± 19,00 a las 72 h (Fig. 5). Similar resultado se obtuvo con 40 µg/mL de nisina, pero determinando la viabilidad con azul de tripán, encontrándose un 83,93 % ± 5,67 de sobrevida a las 48 h y un 56,67 % ± 18,29 de sobrevida a las 72 h (Fig. 5). También se observó una disminución de viabilidad, al evaluarla con azul de tripán,

para concentraciones de 0,4 µg/mL y 4 µg/mL de nisina a las 24 h y 48 h, pero estas no alcanzaron una disminución del 20 % de la viabilidad.

En las células U937 (línea tumoral mielóide) solo se afectó la sobrevida celular a tiempos prolongados de incubación (72 h) con nisina, tanto en las mediciones con MTT como con la técnica de azul de tripán. A concentraciones de 40 µg/mL de nisina se obtuvo un valor promedio de sobrevida celular de 63,19 % ± 11,74 (MTT) y 77,99 % ± 21,03 (azul de tripán) (Fig. 6). La disminución de sobrevida, determinada con azul de tripán, para concentraciones menores de 40 µg/mL de nisina a las 48 h no alcanzaron una disminución del 20 % de la viabilidad.

Los resultados muestran que en todos los casos se necesitan concentraciones de 40 µg/mL (superiores a 100 veces la MIC) para observar una muerte celular superior al 20 %.

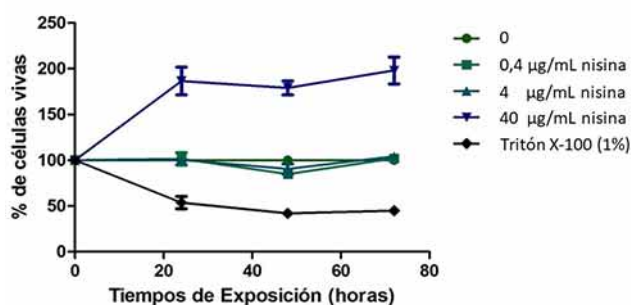


Fig. 4. Análisis en el tiempo de la citotoxicidad de nisina sobre células mononucleares de sangre periférica. Se emplearon concentraciones de 0,4 µg/mL, 4 µg/mL y 40 µg/mL de nisina.

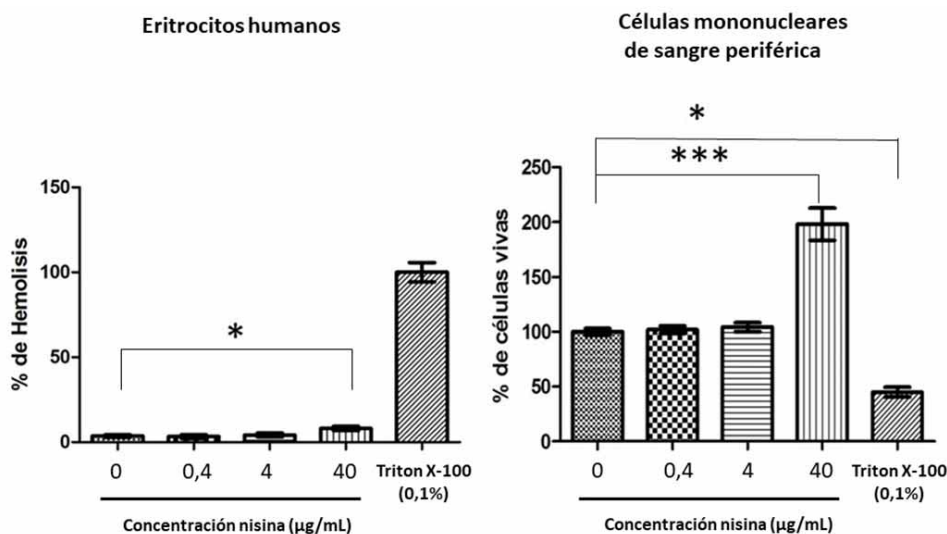


Fig. 3. Actividad citotóxica de nisina sobre eritrocitos humanos (A) y sobre células mononucleares de sangre periférica (B) a las 24 h de incubación. Los resultados representan el promedio ± S.D. Diferencias significativas se calcularon mediante Kruskal-Wallis y el post test Dunn's (***) valor $p < 0,0001$; ** valor $p < 0,001$; * valor $p < 0,05$).

Células K562

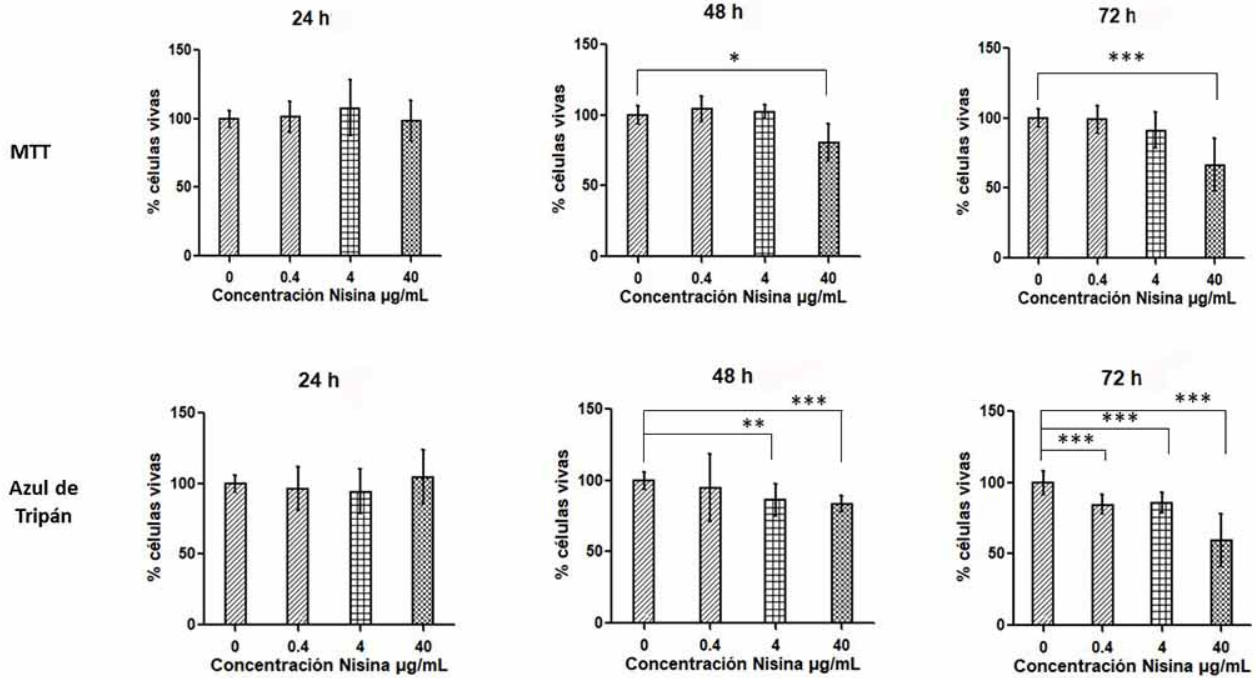


Fig. 5. Citotoxicidad de nisina sobre línea celular K562. Las mediciones de viabilidad celular se realizaron mediante las técnicas de MTT y azul de tripan después de 24, 48 y 72 h de exposición. Los resultados representan el promedio \pm S.D. *** Valor $p < 0,0001$ ** valor $p < 0,005$, * valor $p < 0,05$.

Células U937

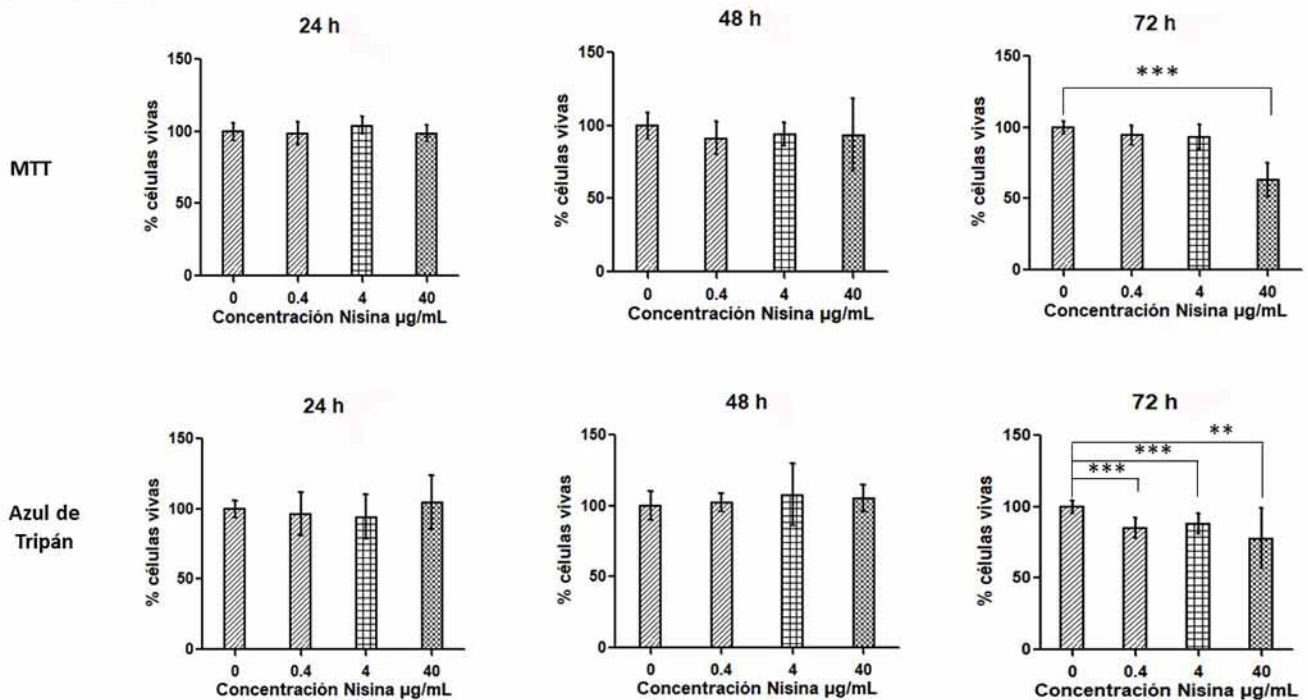


Fig. 6. Citotoxicidad de nisina sobre línea celular U937. Las mediciones de viabilidad celular se realizaron mediante las técnicas de MTT y azul de tripan después de 24, 48 y 72 h de exposición. Los resultados representan el promedio \pm S.D. *** Valor $p < 0,0001$; ** valor $p < 0,005$; * valor $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

Por lo general, los agentes quimioterapéuticos antitumorales actúan sobre el ciclo celular o el control de la proliferación, en consecuencia, su efecto depende del potencial proliferativo de la célula tumoral (Mihlo *et al.*, 2010). Pero también afectan a células que normalmente se dividen como las células de la médula ósea, las células del tracto digestivo y las células de folículo piloso, provocando efectos secundarios no deseados. Por esta razón, se realizan grandes esfuerzos en la búsqueda de nuevos fármacos que sean más selectivos, y que afecten solo a las células tumorales, sin afectar a las normales.

En la literatura se han descrito diversas aplicaciones de las bacteriocinas, ya sea como antibióticos, probióticos, preservantes de alimentos e incluso como agentes antitumorales. Esta última aplicación, la que se aborda en diversos trabajos desde 1976 (Farkas-Himsley & Cheung, 1976), muestra la existencia de bacteriocinas que presentan actividad específica antitumoral, como pyocina S2 (Abdi-Ali *et al.*, 2004) y la microcina E492 (Hetz *et al.*, 2002). Este trabajo se ha concentrado en determinar la citotoxicidad de nisina para evaluar su potencial aplicación como agente antitumoral, ya que esta bacteriocina ha sido autorizada por la FDA, en el año 2000, para ser usada en alimentos por su estatus GRAS (Generalmente reconocido como seguro). La concentración inhibitoria mínima (MIC) de esta bacteriocina es de 0,4 µg/mL sobre *Lactococcus lactis* 481 (Oman & van der Donk, 2009).

Para determinar la citotoxicidad que presenta la bacteriocina nisina, se realizaron ensayos *in vitro* sobre células sanguíneas humanas, midiendo la acción hemolítica sobre eritrocitos humanos y la toxicidad en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas.

Los datos obtenidos muestran que nisina es segura para las células sanguíneas, ya que presenta un bajo poder hemolítico sobre eritrocitos humanos. Varios trabajos determinaron el poder hemolítico de bacteriocinas y mostraron que algunas no son hemolíticas a las concentraciones utilizadas, como Megainina I (Maher & McClean, 2006) y otras mostraron una actividad hemolítica 5 veces superior a nisina, como el péptido P40 (Vaucher *et al.*, 2010). Las diferencias en las toxicidades son el resultado de a los distintos modos de acción de los péptidos antimicrobianos, lo que lleva a que no todos son hemolíticos. Además, nisina no presentó efecto citotóxico sobre las células PBMC humanas. Lo anterior sugiere su seguridad en una eventual administración de nisina por vía intravenosa, aunque se prefieren administraciones por vía oral.

Un resultado interesante que se obtuvo fue el efecto de nisina sobre PBMC humanas, específicamente el aumento del número de linfocitos, esto probablemente debido a que los PBMC se activaron al reconocer a nisina como un antígeno, por la presencia de aminoácidos poco comunes como las lantioninas. Este efecto se relaciona con lo informado en otros trabajos, donde se ha observado el efecto activador de la nisina, aumentando la producción de interleuquina 8 (IL8) por PBMC humanas, Incluso se ha sugerido una actividad inmuno-moduladora de nisina, en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Kindrachuk *et al.*, 2013). Mouritzen *et al.* (2019), demostraron que nisina afecta significativamente la migración tanto de células endoteliales de vena umbilical humana como de células HaCaT pero no afectan la proliferación, porque disminuyen los niveles de citoquinas proinflamatorias, factor de necrosis tumoral α (TNF α), interleucina 6 (IL6) e IL 8. Malaczewska *et al.* (2019) determinaron que 50 µg/mL de nisina presenta actividad proliferativa, ya que, estimuló la producción de interleucina-1 beta (IL-1 β) e IL-6 y aumentó el porcentaje de células T CD4+ CD8+. Sin embargo, después del “peak” de estimulación causado por la acción de nisina, las células T tenían disminuidas sus funciones fagocíticas y estaba presentaban una disminución en la síntesis de IL-6 (efecto dependiente del tiempo y de la concentración). Por lo tanto, el efecto de la nisina en las células T fue probablemente una consecuencia de la modulación de la actividad de las células presentadoras de antígenos (Malaczewska *et al.*, 2019).

En la literatura se conoce del efecto modulador que tienen los péptidos antimicrobianos sobre el sistema inmune. Las β -defensinas, péptidos antimicrobianos producidos por células epiteliales humanas, desempeñan un papel inmuno-modulador, ya que atraen quimiotácticamente a las células dendríticas y los linfocitos T de memoria, a través de la unión del receptor de quimioquinas, CCR6 (Yang *et al.*, 1999). También se ha determinado que la utilización de probióticos (cepas de *Lactobacillus salivarius* y *Lactobacillus murinus* aislados de porcinos) mejora la respuesta clínica contra la infección por *Salmonella enterica* serovar Typhimurium PT12 en cerdos, disminuyendo la incidencia, la gravedad y el tiempo de la diarrea (Casey *et al.*, 2007). Por otra parte, el análisis de la expresión génica en *Lactobacillus plantarum* WCFS1, ha determinado que los genes relacionados con la producción de la bacteriocina plantaricina están involucrados en el aumento de citoquinas (IL10, IL12) en monocitos (Meijerink *et al.*, 2010).

El efecto selectivo de nisina sobre células tumorales se evaluó mediante ensayos de citotoxicidad en líneas celu-

lares sanguíneas. Los resultados muestran que nisina es tóxica de manera dosis dependiente sobre las células tumorales. Esto puede deberse a que nisina afectaría a las células que tienen una alta tasa de división celular, ya que todas estas líneas celulares tienen una tasa de división de alrededor de 24 h, pudiendo ser efectiva sólo cuando las células están en mitosis.

Los resultados muestran un efecto citotóxico diferente sobre líneas tumorales linfoides (K562) en comparación a la línea celular mieloide U937, siendo más tóxica sobre la primera. Otras bacteriocinas, como la microcina E492 no presentan esta diferencia entre tipos celulares, ya que los porcentajes de sobrevivencia son similares tanto para una línea celular proveniente de tejido como células HeLa como para las células de la línea RJ2.2.5 derivadas de linfocitos B de sangre periférica (Hetz *et al.*, 2002).

Al comparar el efecto de nisina sobre las células sanguíneas normales versus células sanguíneas tumorales, como en el caso de células PBMC con respecto a las células U937 y K562, se puede observar la selectividad de nisina sobre las células tumorales. La manera que nisina genera su efecto citotóxico probablemente sea por la inducción de un mecanismo apoptótico, como lo han descrito varios autores (Joo *et al.*, 2012; Zainodini *et al.*, 2018), pero también se ha reportado que nisina produce muerte celular sobre células Jurkat por un mecanismo independiente de la fragmentación del DNA (Begde, *et al.*, 2011), por lo cual, el mecanismo por el cual nisina ejerce su efecto citotóxico sobre células tumorales particulares debe seguir profundizándose.

CONCLUSIONES

Nisina presentaría actividad citotóxica *in vitro* a concentraciones iguales o superiores a 40 µg/mL (100 veces la MIC reportada) sobre líneas celulares con alta tasa de división y a tiempos de exposición prolongados.

Por otra parte, nisina ejercería un efecto proliferativo sobre linfocitos de sangre periférica, dependiente de su concentración.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Proyecto FONDECYT 11090182 de la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID), Chile y el Proyecto GENE-RA-ÚA-2019-017 de la Universidad Autónoma de Chile.

SALAZAR, L.; RIVAS, E.; PAVÓN, A.; WIESE, G.; MANZANO, C.; ORELLANA, P.; GUTIERREZ-MORAGA, A.; CORTÉS-CORTÉS, P. & CORSINI, G. *In vitro* cytotoxicity of the antimicrobial polypeptide nisin on blood tumor cells. *Int. J. Morphol.*, 40(5):176-1283, 2022.

SUMMARY: Bacteriocins are antimicrobial peptides of ribosomal synthesis secreted by bacteria. Among these, nisin stands out, which has potential uses in antibiotic therapies, as a food bio preservative and probiotics. Nisin has also been reported to have cytotoxicity on neoplastic cell lines, but there is little information on its effect on blood tumor cells. Due to the potential use that nisin presents, it is relevant to determine the toxicity it presents on tumor cell lines of the blood type. For this, hemolytic activity tests were carried out on human erythrocytes and toxicity on human peripheral blood mononuclear cells, determining that nisin does not have a toxic effect on this type of normal human blood cells. Cytotoxicity tests were also carried out with tumor cell lines (K562 and U937), to determine dose, exposure time and selectivity in the toxic effect of nisin on human tumor cells. These tests show that nisin shows cytotoxic activity on K562 and U937 cell lines at 72 h of exposure, at a concentration of 40 µg / mL, which corresponds to 100 times the minimum inhibitory concentration (MIC) used for its action on bacteria. When comparing the effect of nisin on human peripheral blood mononuclear cells with lymphoid and myeloid tumor lines (K562 and U937 respectively), a selective effect of nisin on blood tumor cells is observed.

KEY WORDS: Nisin; Cytotoxicity; Bacteriocin; Blood tumor cells; K562 cell and U937 cells.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdi-Ali, A.; Worobec, E. A.; Deezagi, A. & Malekzadeh, F. Cytotoxic effects of pyocin S2 produced by *Pseudomonas aeruginosa* on the growth of three human cell lines. *Can. J. Microbiol.*, 50(5):375-81, 2004.
- Begde, D.; Bundale, S.; Mashitha, P.; Rudra, J.; Nashikkar, N. & Upadhyay, A. Immunomodulatory efficacy of nisin--a bacterial lantibiotic peptide. *J. Pept. Sci.*, 17(6):438-44, 2011.
- Casey, P. G.; Gardiner, G. E.; Casey, G.; Bradshaw, B.; Lawlor, P. G.; Lynch, P. B.; Leonard, F. C.; Stanton, C.; Ross, R. P.; Fitzgerald, G. F.; *et al.*, A five-strain probiotic combination reduces pathogen shedding and alleviates disease signs in pigs challenged with *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(6):1858-63, 2007.
- Cotter, P. D.; Hill, C. & Ross, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3(10):777-88, 2005.
- Etayash, H.; Azmi, S.; Dangeti, R. & Kaur, K. Peptide bacteriocins--Structure activity relationships. *Curr. Top. Med. Chem.*, 16(2):220-41, 2015.
- Farkas-Himsley, H. & Cheung, R. Bacterial proteinaceous products (bacteriocins) as cytotoxic agents of neoplasia. *Cancer Res.*, 36(10):3561-7, 1976.
- Freshney, R. I. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 6a ed. Hoboken, Wiley-Blackwell, 2010. pp.365-81.
- Gao, Y. L. & Ju, X. R. Exploiting the combined effects of high pressure and moderate heat with nisin on inactivation of *Clostridium botulinum* spores. *J. Microbiol. Methods*, 72(1):20-8, 2008.
- Gross, E. & Morell, J. L. The structure of nisin. *J. Am. Chem. Soc.*, 93(18):4634-5, 1971.

- Hetz, C.; Bono, M. R.; Barros, L. F. & Lagos, R. Microcin E492, a channel-forming bacteriocin from *Klebsiella pneumoniae*, induces apoptosis in some human cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99(5):2696-701, 2002.
- Ibarra-Sánchez, L.; El-Haddad, N.; Mahmoud, D.; Miller, M. J. & Karam, L. Invited review: Advances in nisin use for preservation of dairy products. *J. Dairy Sci.*, 103(3):2041-52, 2020.
- Joo, N. E.; Ritchie, K.; Kamarajan, P.; Miao, D. & Kapila, Y. L. Nisin, an apoptogenic bacteriocin and food preservative, attenuates HNSCC tumorigenesis via CHAC1. *Cancer Med.*, 1(3):295-305, 2012.
- Kamarajan, P.; Hayami, T.; Matte, B.; Liu, Y.; Danciu, T.; Ramamoorthy, A.; Worden, F.; Kapila, S. & Kapila, Y. Nisin ZP, a bacteriocin and food preservative, inhibits head and neck cancer tumorigenesis and prolongs survival. *PLoS One*, 10(7):e0131008, 2015.
- Kindrachuk, J.; Jenssen, H.; Elliott, M.; Nijnik, A.; Magrangeas-Janot, L.; Pasupuleti, M.; Thorson, L.; Ma, S.; Easton, M.; Bains, M.; *et al.*, Manipulation of innate immunity by a bacterial secreted peptide: lantibiotic nisin Z is selectively immunomodulatory. *Innate Immun.*, 19(3):315-27, 2013.
- Maher, S. & McClean, S. Investigation of the cytotoxicity of eukaryotic and prokaryotic antimicrobial peptides in intestinal epithelial cells *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.*, 71(9):1289-98, 2006.
- Malaczewska, J.; Kaczorek-?ukowska, E.; Wójcik, R.; Re_kawek, W. & Siwicki, A. K. *In vitro* immunomodulatory effect of nisin on porcine leucocytes. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)*, 103(3):882-93, 2019.
- Meijerink, M.; van Hemert, S.; Taverne, N.; Wels, M.; de Vos, P.; Bron, P.A.; Savelkoul, H.F.; van Bilsen, J.; Kleerebezem, M. & Wells, J. M. Identification of genetic loci in *Lactobacillus plantarum* that modulate the immune response of dendritic cells using comparative genome hybridization. *PLoS One*, 5(5):e10632, 2010.
- Mihlo, F.; Ray, C. E. & Messersmith, W. Chemotherapy agents: a primer for the interventional radiologist. *Semin. Intervet. Radiol.*, 27(4):384-90, 2010.
- Mouritzen, M.; Andrea, A, Qvist, K.; Poulsen, S. S. & Jenssen, H. Immunomodulatory potential of Nisin A with application in wound healing. *Wound Repair Regen.*, 27(6):650-60, 2019.
- Oman, T. J. & van der Donk, W. A. Insights into the mode of action of the two peptide lantibiotic haloduracin. *ACS Chem. Biol.*, 4(10):865-74, 2009.
- Oscáriz, J. C. & Pisabarro, A. G. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Int. Microbiol.*, 4(1):13-9, 2001.
- Reddy, K. V. R.; Aranha, C.; Gupta, S. M. & Yedery, R. D. Evaluation of antimicrobial peptide nisin as a safe vaginal contraceptive agent in rabbits: *in vitro* and *in vivo* studies. *Reproduction*, 128(1):117-26, 2004.
- Riley, M. A. & Wertz, J. E. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie*, 84(5-6):357-64, 2002.
- Saito, H. & Watanabe, T. Effect of a bacteriocin produced by *Mycobacterium smegmatis* on growth of cultured tumor and normal cells. *Cancer Res.*, 39(12):5114-7, 1979.
- Simons, A.; Alhanout, K. & Duval, R. E. Bacteriocins, antimicrobial peptides from bacterial origin: overview of their biology and their impact against multidrug-resistant bacteria. *Microorganisms*, 8(5):639, 2020.
- Szweda, P.; Schielmann, M.; Frankowska, A.; Kot, B. & Zalewska, M. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in eastern Poland and analysis of susceptibility of resistant strains to alternative nonantibiotic agents: lysostaphin, nisin and polymyxin B. *J. Vet. Med. Sci.*, 76(3):355-62, 2014.
- Vaucher, R.; Teixeira, M. L. & Brandelli, A. Investigation of the cytotoxicity of antimicrobial peptide P40 on eukaryotic cells. *Curr. Microbiol.*, 60(1):1-5, 2010.
- Yang, D.; Chertov, O.; Bykovskaia, S.N.; Chen, Q.; Buffo, M.J.; Shogan, J.; Anderson, M.; Schröder, J.M.; Wang, J.M.; Howard, O.M.; *et al.*, Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science*, 286(5439):525-8, 1999.
- Zainodini, N.; Hassanshahi, G.; Hajizadeh, M.; Falahati-Pour, S. K.; Mahmoodi, M. & Mirzaei, M. R. Nisin induces cytotoxicity and apoptosis in human astrocytoma cell line (SW1088). *Asian Pac J. Cancer Prev.*, 19(8):2217-22, 2018.

Dirección para correspondencia:
Gino Corsini
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma de Chile
El Llano Subercaseaux 2801
San Miguel, Santiago
CHILE

E-mail: gino.corsini@uautonoma.cl

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0418-8616>