

Evaluación de la capacidad adyuvante del ginsenósido Rg1 en ratones Balb/c inmunizados con un lisado de *Staphylococcus aureus*.

Silvestrini P⁴, Beccaria C⁴, Engler C⁴, Renna MS^{2,4}, Dallard^{3,4}, Baravalle C^{1,4}.

¹Cátedra de Biología Celular (FCV-UNL); ²Cátedra de Microbiología (FCV-UNL); ³Cátedra de Histología y Embriología (FCV-UNL); ⁴Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (UNL-CONICET). paula.silvestrini@yahoo.com.ar

Los avances tecnológicos en inmunología han proporcionado nuevas herramientas para el estudio de la inmunidad de la glándula mamaria y la patogénesis de la mastitis, principal enfermedad que afecta a los rodeos lecheros. En los últimos años, se ha planteado la necesidad de desarrollar nuevos inmunógenos que permitan una mayor reducción de la prevalencia de mastitis. En este sentido, los adyuvantes juegan un rol importante en la formulación de vacunas, incrementando la inmunogenicidad de los antígenos co-administrados. Los ginsenósidos (componentes activos de la raíz del extracto de *Panax ginseng* (Pg)) han sido utilizados como adyuvantes de vacunas de uso veterinario¹. Hasta el momento han sido identificados más de 40 ginsenósidos, siendo uno de los más abundantes el ginsenósido Rg1, constituyendo entre el 0,37-0,50 % de un extracto de Pg. Por otro lado, los liposomas son vesículas biocompatibles, capaces de estimular respuesta inmune de base humoral y celular hacia diferentes antígenos². En este contexto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta humoral y celular producida por Rg1 en ratones inmunizados con un lisado de la cepa 5011 de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).

Brevemente, se utilizaron ratones hembras de la cepa Balb/c de 4 semanas de edad divididos en 5 grupos experimentales, detallados a continuación:

- » Lisado *S. aureus* (100 µg/ml) + Adyuvante incompleto de Freund
- » Lisado *S. aureus* (100 µg/ml) + Liposomas (4 mM)
- » Lisado *S. aureus* (100 µg/ml) + Rg1 (500 µg/ml)
- » Lisado *S. aureus* (100 µg/ml) + Liposomas (4 mM) + Rg1 (500 µg/ml)
- » Control (sin inocular)

Los animales fueron inoculados 3 veces por vía subcutánea (200 µl/dosis) en intervalos de 14 días. Dos semanas después de la última inoculación, los animales fueron sacrificados y por punción cardíaca se extrajo sangre (para la obtención de plasma), para evaluar la producción de anticuerpos anti-*S. aureus*. Paralelamente, en condiciones de esterilidad, se realizó la extracción de los bazo de los animales de todos los grupos experimentales, para la evaluación de la respuesta celular inducida.

La respuesta humoral (IgG) inducida frente al lisado de *S. aureus* en los ratones inmunizados se evaluó mediante un ELISA indirecto. Previa sensibilización con 3 µg/pocillo de lisado *S. aureus*, los pocillos fueron lavados y bloqueados con PBS – suero fetal bovino al 10%. Luego se incubaron con las muestras de plasma provenientes de los animales inoculados. La presencia de anticuerpos específicos fue evaluada mediante la incubación con el anticuerpo *goat anti-mouse IgG* conjugado con peroxidasa. Finalmente, se midió la absorbancia a 450 nm en espectrofotómetro. Los resultados obtenidos fueron expresados como el promedio del título ± desvío estándar. Como valor de corte se utilizó dos veces el valor de densidad óptica del grupo control.

Los grupos “Lisado *S. aureus* + Adyuvante incompleto de Freund” y “Lisado *S. aureus* + Liposomas + Rg1” mostraron títulos de IgG mayores a los grupos “Lisado *S. aureus* + Liposomas” y “Lisado *S. aureus* + Rg1” ($p < 0,05$) (Figura 1A).

Para evaluar la respuesta inmune celular inducida en los ratones inmunizados provenientes de los 4 grupos, se realizaron ensayos de proliferación celular mediante la medición de la actividad metabólica empleando el MTT *Cell Proliferation Assay Kit* (Abcam). Las células del bazo de los animales inmunizados fueron obtenidas por disgregación mecánica del órgano. Luego de realizar un buffer de

lisis para eliminar los glóbulos rojos, las células fueron acondicionadas en placas de cultivo. Una cantidad de 2×10^6 células/ml fueron estimuladas con $5 \mu\text{g/ml}$ de lisado de *S. aureus*. Paralelamente, se estimularon pocillos con anti-CD3 como control positivo y con medio de cultivo como control negativo. Cada condición se evaluó por triplicado. Luego de 72 hs de incubación, se retiró el sobrenadante de cada pocillo y se agregó el reactivo MTT en medio libre de suero. Luego de 3 hs de incubación, se adicionó el solvente y se leyó la absorbancia a 590 nm. Finalmente, el índice de proliferación (IP) se calculó de la siguiente manera:

$$\text{IP} = (\text{DO células estimuladas}) / (\text{DO células no estimuladas})$$

Los IP de los grupos “Lisado *S. aureus* + adyuvante incompleto de Freund” y “Lisado *S. aureus* + Liposomas” fueron mayores en comparación a los grupos “Lisado *S. aureus* + Rg1” y “Lisado *S. aureus* + Liposomas + Rg1” ($p < 0,05$) (Figura 1B).

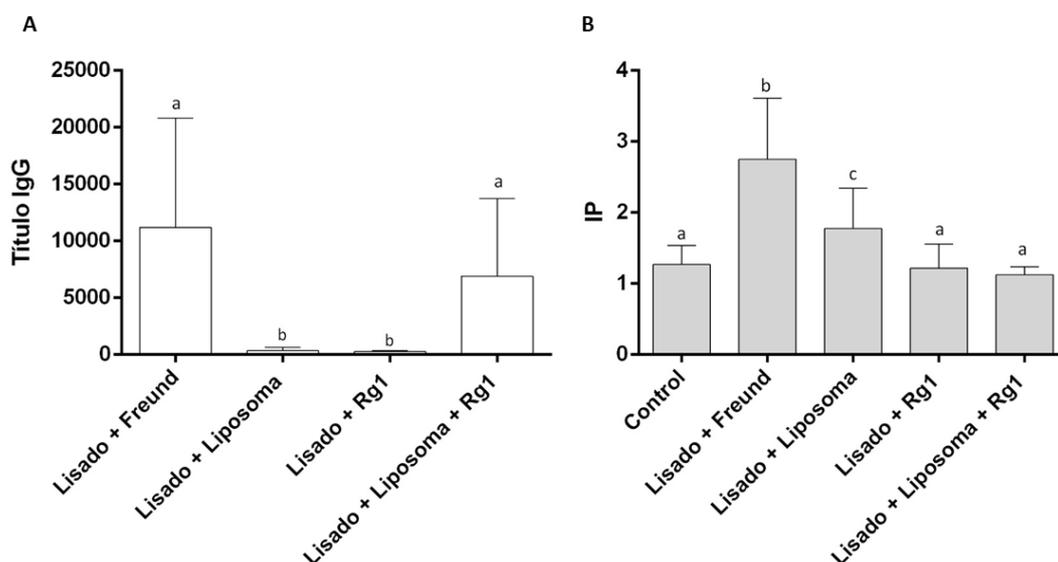


Figura 1: A) Título de IgG total anti-*S. aureus* producidos por los diferentes grupos experimentales medidos por ELISA. B) Índice de proliferación celular provenientes del bazo de los animales inmunizados y reestimulados con $5 \mu\text{g/ml}$ de lisado de *S. aureus*. En ambos casos, los resultados fueron expresados como el promedio de las densidades ópticas (DO) \pm desvío estándar. Letras distintas significan diferencias significativas entre grupos experimentales.

En base a los resultados obtenidos, podemos concluir que la combinación Liposoma + Rg1 estimuló la respuesta humoral de manera similar al control positivo (Lisado *S. aureus* + adyuvante incompleto de Freund). Respecto a la respuesta celular, Rg1 no logró estimular la proliferación de los linfocitos provenientes de ratones inmunizados. Esto puede deberse a que el tiempo de estimulación elegido (72 hs) no fue suficiente como para provocar la estimulación específica hacia el lisado de *S. aureus*. Nuevos ensayos con un mayor número de animales por grupo y modificando las condiciones de estimulación *in vitro*, permitirán dilucidar de manera certera la capacidad adyuvante del Rg1.

Bibliografía

- ¹ Song X, Bao S, Wu L y Hu S. 2009. Ginseng stem-leaf saponins (GSLs) and mineral oil act synergistically to enhance the immune responses to vaccination against foot-and-mouth disease in mice. *Vaccine* 27:51–55.
- ² Reidel IG, García MI, González V, Giorello A, Calvinho LF, Gennarod AM y Veaute C. 2017. Effects of the liposomal co-encapsulation of antigen and PO-CpG oligonucleotide on immune response in mice. *International Journal For Research In Applied And Natural Science* Vol. 3.