

Evaluación del efecto del ginsenosido Rg1 sobre la viabilidad celular y de su potencial como inmunoestimulante en células bovinas *in vitro*.

Silvestrini, P.^{1,4}; Beccaria, C.^{2,4}; Gonzalez, G.⁴; Renna, MS.^{2,4}; Calvino, L.²; Dallard, B.^{3,4}; Baravalle, C.^{1,4}

¹Cátedra de Biología Celular (FCV-UNL); ²Cátedra de Enfermedades Infecciosas (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

La terapia antibiótica es en la actualidad uno de los pilares de los programas de control frente a ciertas enfermedades infecciosas, como la mastitis bovina; sin embargo, esta terapia no siempre es totalmente efectiva para combatir la enfermedad. Además, el uso indiscriminado de antibióticos ha llevado a la generación de cepas bacterianas resistentes y a la aparición de residuos en leche, lo cual impacta directamente en la salud pública. Es por esto que, en los últimos años, se ha planteado la necesidad de contar con nuevas alternativas terapéuticas y preventivas dirigidas a disminuir el uso de antibióticos, de manera de complementar las medidas de control universalmente aceptadas. Una de ellas, es la utilización de compuestos inmunomoduladores capaces de interactuar con el sistema inmune y modular la respuesta del hospedador. Nuestro grupo de trabajo ha centrado las investigaciones en el estudio del extracto de *Panax ginseng* (Pg) como inmunomodulador, tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*^{1,2}. Por otro lado, los ginsenosidos, también conocidos como saponinas triterpenoides, son los principales componentes activos de este extracto, y han sido utilizados como adyuvantes en vacunas de uso veterinario³. Hasta el momento han sido identificados más de 40 ginsenosidos y uno de los más abundantes es el ginsenosido Rg1, constituyendo entre el 0,37-0,50 % de un extracto de Pg.

En base a los antecedentes mencionados, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del ginsenosido Rg1 sobre la viabilidad de células epiteliales mamarias bovinas (MAC-T) y macrófagos bovinos; y por otra parte, evaluar su potencial inmunomodulatorio en los mismos cultivos celulares.

Los ensayos *in vitro* planteados en este trabajo se llevaron a cabo con dos tipos de cultivos celulares: una línea de células epiteliales mamarias bovinas (*Transformed mammary epithelial cells*, MAC-T) y un cultivo primario de macrófagos aislados de secreción mamaria de vacas Holando Argentino libres de infecciones intramamarias obtenidas a los 10-14 días luego de la interrupción de la lactancia. En una primera instancia, para descartar un efecto citotóxico de Rg1 sobre las células epiteliales y macrófagos, se realizaron ensayos de viabilidad celular con diferentes concentraciones de Rg1 y a diferentes tiempos post-tratamiento utilizando un kit comercial (*Cell Proliferation Kit II (XTT)*, Roche). Los resultados se expresaron como densidad óptica (DO). Las DO obtenidas de los diferentes grupos a los diferentes horarios fueron analizadas individualmente mediante ANOVA seguido de un post-test de Duncan.

Posteriormente, con el objetivo de caracterizar ciertos aspectos de la respuesta inmune inducida luego del tratamiento con Rg1 tanto en MAC-T como en macrófagos aislados de secreción mamaria, se llevó a cabo el análisis de la expresión de ARNm por PCR en tiempo real de los receptores de reconocimiento tipo *toll* -2 y -4 (TLR-2 y TLR-4) y de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α . Brevemente, las MAC-T fueron tratadas con 10, 20, 50 y 100 μ g de Rg1/ml durante 2, 6 y 24 horas mientras que los macrófagos fueron tratados con 50, 100 y 250 μ g de Rg1/ml durante 2, 4, 8, 12 y 24 hs. Paralelamente, ciertos pocillos fueron incubados solo con medio (células sin tratar como

grupo control). A partir de los pocillos tratados con los diferentes estímulos, las células fueron tratadas con Trizol (Invitrogen), para la extracción de ARN, y luego se realizó la retrotranscripción a ADNc y posteriormente la realización de PCR en tiempo real. Los ensayos se realizaron por triplicado y de manera independiente.

Para analizar la expresión de los ARNm de cada una de las muestras tratadas con las diferentes concentraciones de Rg1 en diferentes horarios y de los controles, se utilizó un protocolo de PCR en tiempo real previamente puesto a punto para cada par de cebadores y utilizando SYBR Green I (Invitrogen). Las condiciones ensayadas para cada gen fueron: desnaturalización inicial 98°C por 3 min; 40 ciclos de desnaturalización a 98°C por 5 seg, hibridación a 58°C por 20 seg (TLR-2), 58°C por 15 seg (TLR-4), 61°C por 30 seg (IL-1 β), 56°C por 15 seg (IL-6), 62°C por 25 seg (TNF- α) y 60°C por 15 seg (β -actina) y extensión a 72°C por 20 seg. La cuantificación de las muestras se realizó utilizando el método de Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) empleando el gen de la β -actina como normalizador⁴.

Los ensayos de viabilidad mostraron que Rg1 no tuvo efecto tóxico sobre ninguno de los cultivos celulares evaluados. Del análisis estadístico aplicado se observó que no se encontraron diferencias significativas en la viabilidad celular entre las MAC-T tratadas con las diferentes concentraciones de Rg1 y el grupo control ($p>0,05$) en las distintas horas post-tratamiento, ni entre los macrófagos tratados con Rg1 respecto a los controles ($p>0,05$).

En cuanto a los niveles de expresión génica de TLR-2, TLR-4 y de citoquinas pro-inflamatorias en células epiteliales y macrófagos, no se observaron diferencias ($p>0,05$) entre las células tratados con diferentes concentraciones de Rg1 y controles para ninguno de los genes evaluados.

Se puede concluir que si bien el ginsenósido Rg1 no causó efectos adversos en la viabilidad de las células epiteliales mamarias y macrófagos bovinos, no fue capaz de inducir la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune innata. Si bien los resultados obtenidos en el modelo *in vitro* no son los esperados, se propone a futuro evaluar la capacidad adyuvante del ginsenósido Rg1 en un modelo *in vivo*, lo cual permitirá continuar con el estudio y desarrollo de nuevos productos alternativos y complementarios para el control y prevención de la mastitis bovina.

¹ Baravalle, C.; Dallard, B.E.; Ortega, H.H.; Neder, V.E.; Canavesio, V.R. y Calvino, L.F. 2010. *Effect of Panax ginseng on cytokine expression in bovine mammary glands at drying off*. Veterinary Immunology Immunopathology. 138:224-230.

² Silvestrini, P.; Beccaria, C.; Pereyra, E.A.L, Renna, M.S., Ortega, H.H. Calvino, L.F.; Dallard B.E. y Baravalle, C. 2017. *Intramammary inoculation of Panax ginseng plays an immunoprotective role in Staphylococcus aureus infection in a murine model*. Research in Veterinary Science. 115: 211–220.

³ Su, F.; Yuan, L.; Zhang, L.; Hu, S. 2012. *Ginsenosides Rg1 and Re act as adjuvant via TLR4 signaling pathway*. Vaccine. 30:4106–4112.

⁴ Livak K y Schmittgen T. 2001. *Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method*. Methods. 25:402-408.