

VII JORNADAS DE DIFUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN – FCV-UNL

RESUMEN EXTENDIDO

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ADYUVANTE DEL GINSENÓSIDO RG1 EN RATONES BALB/C INMUNIZADOS CON UN LISADO DE *Staphylococcus aureus*

Silvestrini P^{1*}, Beccaria C¹, Reidel I², Veaute C², Engler C¹, Renna MS^{1,3},
Dallard^{1,4} B, Baravalle C^{1,5}.

¹Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (UNL-CONICET);

²Laboratorio de Inmunología Experimental, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB-UNL);

³Cátedra de Microbiología (FCV-UNL);

⁴Cátedra de Histología y Embriología (FCV-UNL);

⁵Cátedra de Biología Celular (FCV-UNL);

* Correspondencia: Silvestrini P., E-mail: paula.silvestrini@yahoo.com.ar

Editado por: R. Sobrero y V. Matiller

EVALUATION OF ADJUVANT CAPACITY OF GINSENOSE Rg1 IN BALB/C MICE IMMUNIZED WITH A *Staphylococcus aureus* LYSATE.

SUMMARY

Rg1 ginsenoside, the main active compound of *Panax ginseng* extract, could be a promising vaccine adjuvant against *Staphylococcus aureus* bovine mastitis. The aim was to evaluate the adjuvant effects of Rg1 combined with liposomes or alone against *S. aureus* lysate from bovine mastitis in mice. Female Balb/c mice were divided into 4 groups: *S. aureus* Lysate + IFA (Group I), *S. aureus* lysate + liposomes (Group II), *S. aureus* lysate + Rg1 (Group III) and *S. aureus* lysate + liposomes + Rg1 (Group IV). All mice were subcutaneously immunized with all formulations 3 times at 2-weeks intervals. Humoral response was evaluated by indirect IgG ELISA assay in plasma collected at the end of the assay. Cellular response was evaluated by MTT kit assay in spleen cells from immunized mice. Groups I and IV showed higher IgG values than groups II and III ($p < 0.05$). Groups I and II showed higher proliferation values than groups III and IV ($p < 0.05$). The Rg1-liposome combination increased *S. aureus*-specific IgG production. However, Rg1 was not able to stimulate lymphocyte proliferation from immunized mice, possibly due to the short *S. aureus*-specific stimulation time. New assays with different experimental conditions are needed to elucidate adjuvant effects of Rg1 in a murine model.

Palabras clave: Ginsenósido Rg1, respuesta inmune humoral, respuesta inmune celular, Lisado *S. aureus*

Keywords: Ginsenoside Rg1, humoral response, cellular response, Lisado *S. aureus*

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 reducción en 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 veterinario (Song et al. 2009). 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 antígenos (Reidel et al. 2017). 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 (IFA)
- 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 respuesta humoral frente a *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 (presencia de 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 (1/5000, Invitrogen). Finalmente, se midió la absorbancia a 450 nm en espectrofotómetro. El valor de densidad óptica de corte para cada muestra fue aquel que superó dos veces el valor de densidad óptica del *pool* del grupo control. A partir de este valor, se calculó el título como la inversa de la dilución donde se observó el efecto. Los resultados

se expresaron como la media del título de cada grupo ± DEM.

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 2x10⁶ células/ml fueron estimuladas con 5 µg/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:

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

Los resultados se expresaron como la media del IP ± DEM.

En relación a la respuesta humoral, los grupos "*Lisado S. aureus + IFA*" 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).

En relación a la inmunidad celular, los IP de los grupos "*Lisado S. aureus + IFA*" 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).

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 + IFA*). 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.

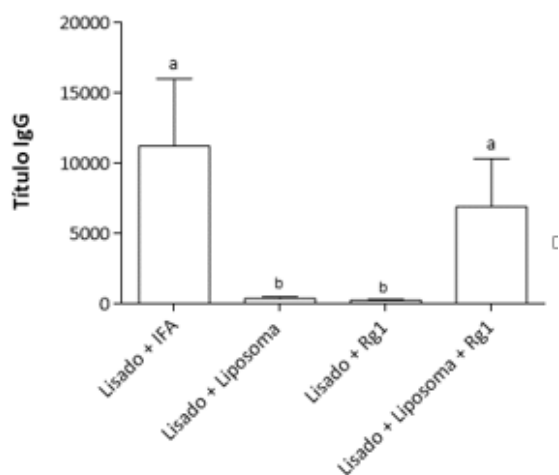


Figura 1. Título de IgG total anti-*S. aureus* producidos por los diferentes grupos experimentales medidos por ELISA. Los resultados fueron expresados como la media del título de IgG \pm DEM. Letras distintas significan diferencias significativas entre grupos experimentales.

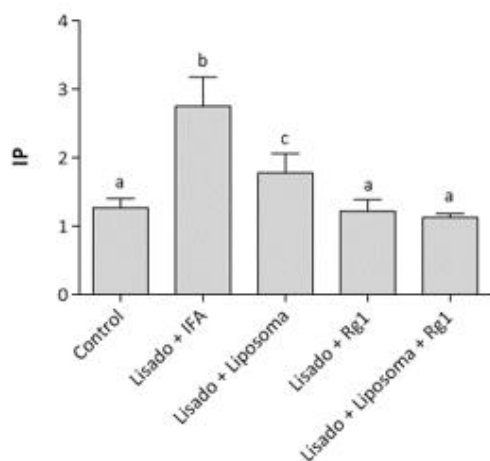


Figura 2. Índice de proliferación celular provenientes del bazo de los animales inmunizados y reestimulados con 5 μ g/ml de lisado de *S. aureus*. Los resultados fueron expresados como la media del IP \pm DEM. Letras distintas significan diferencias significativas entre grupos experimentales.

Bibliografía

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.

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.