



**INMUNOSUPRESIÓN E INMUNOMODULACIÓN DE LAS CÉLULAS SOMÁTICAS DE LA
 UBRE BOVINA EN LAS DIFERENTES ETAPAS DE LA LACTACIÓN**

Carlos Concha Bascuñan
 Médico Veterinario, MSc, PhD.

Departamento de Mastitis, Instituto Nacional de
 Medicina Veterinaria, Uppsala, Suecia

INTRODUCCIÓN

Esta demostrado que la defensa de la glándula mamaria contra los patógenos causantes de mastitis esta mediada por factores celulares protectores. Sin embargo hay indicaciones que los mecanismos celulares en la glándula mamaria son menos efectivos que en otras partes del organismo. Este hecho nos ha motivado a profundizar los estudios de la capacidad funcional de leucocitos polimorfonucleares (LPMN), linfocitos y macrófagos en la secreción de la glándula mamaria en diferentes periodos del ciclo lactacional. Desde que la baja eficiencia de las células mamarias puede deberse a inmunomecanismos deprimidos, estrategias para estimular los inmunomecanismos de la glándula mamaria bovina deben ser considerados (Sordillo y Scott, 1995).

Substancias contenidas en plantas medicinales han sido determinadas como inmunomoduladores, por ejemplo las saponinas (Daalsgard, 1978) y sistemas liberadores de antígenos basados en las saponinas, como por ejemplo ISCOM (Immunostimulating complexes) (Höglund et al. 1989; Morein et al. 1995). Ejemplos de saponinas son aquéllas obtenidas de la corteza del árbol *Quillaja saponaria* Molina y también las saponinas extraídas de la raíz de la planta *Panax ginseng* CA Meyer. El ginseng ha sido usado por más de 3000 años como agente revitalizante para humanos y animales en China (Liu y Xiao, 1992).

Considerando que las respuestas proliferativas de los linfocitos tienen una correlación con la inmunidad celular, las lectinas de plantas, por ejemplo fitomitógenos tales como: Pokeweed mitogen (PWM), concanavalina (ConA) y fitohemoaglutinina (PHA), fueron también incluidos en los experimentos presentes, en los cuales se buscaron respuestas sinérgicas usando las saponinas del ginseng además de estas lectinas, siendo evaluadas tanto en las células de la sangre periférica como en las de la glándula mamaria.

Los objetivos del presente estudio fueron los siguientes:

1. Determinar las fluctuaciones en número de leucocitos de la sangre periférica durante el período comprendido entre 3 semanas antes hasta 3 semanas después del parto; la fagocitosis de los LPMN fue también estudiada en el mismo período (Saad, Concha, Åström, 1989).
2. Estudiar la actividad proliferativa *in vitro* de los linfocitos tanto en las secreciones de la ubre como

de la sangre periférica en respuesta a las lectinas durante el ciclo lactacional, lo que incluyó los períodos: calostrogénesis (21, 14 y 1 día antes del parto), calostro (1 y 5 días después del parto), lactación temprana (2 y 3 semanas después del parto), plena lactación (17 semanas después del parto) y período seco constante (4 semanas antes del parto) (Saad, Concha, Åström 1989; Concha y Holmberg 1990).

3. Analizar la habilidad de los macrófagos de la ubre bovina como estimuladores de la proliferación *in vitro* de linfocitos autólogos de la sangre periférica y de la secreción del periodo seco constante, cuando ellos fueron también tratados previamente con una lectina (Concha y Holmberg 1990).
4. Evaluar la capacidad de modulación de las saponinas del ginseng sobre la fagocitosis y capacidad oxidante de las células LPMN aislados desde la leche y sangre periférica de la vaca (Hu, Concha et al. 1995).
5. Determinar el efecto modulador de las saponinas del ginseng *in vitro* mediante la evaluación de las respuestas proliferativas de los linfocitos a los mitógenos, en células aisladas desde la leche y sangre periférica (Concha et al. 1996).
6. Estudiar el efecto inmunomodulatorio de inyecciones subcutáneas de saponinas del ginseng en vacas con mastitis subclínicas por *Staphylococcus aureus* (Hu, Concha et al. 2001).

**INMUNOSUPRESIÓN CELULAR DURANTE EL
 PERÍODO DEL PERIPARTUM**

En los presentes estudios (Saad, Concha, Åström 1989) fue determinado que el número total de leucocitos en la sangre fue mayor en el día anterior al parto, pero con diferencias significativas solamente si se compa con los días 11 al 18 postpartum, concordando con los trabajos de Guidry et al. (1976); Kehrlí et al. (1989 a); Lee y Kehrlí (1998) y Meglia et al. (2001). El incremento total de los leucocitos fué principalmente debido al alto número de neutrófilos y en menor grado al incremento de los monocitos.

Al parto los niveles de corticoesteroides y plasma estradiol están elevados (Saad y Åström, 1988). Ambas hormonas inducen neutrofilia por un incremento del rendimiento del sistema hematopoyético más que por un mayor redimiento de la fuente de neutrófilos maduros (Guidry et al. 1976; Lee y Kehrlí, 1998). Es por esta causa que la presencia de dos poblaciones de neutrófilos puede observarse en el flujo citológico de células de la sangre cerca del parto, que representan una población de neutrófilos inmaduros; similar flujo citológico fue observado en vacas tratadas con benzoato de estradiol (Saad y Åström, 1988). Aumento del número de neutrófilos inmaduros fue observado también al parto por



X Congreso Latinoamericano de Buiatría XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría

otros autores con las proporciones más altas durante la primera semana después del parto (Guidry et al. 1976; Kehrlí et al., 1989 a). Estos neutrófilos inmaduros tienen funciones claramente reducidas, tales como: fagocitosis, capacidad intracelular de matar y quemotaxis (Jain et al. 1991; Dosogne et al. 1997).

El aumento del número de neutrófilos y monocitos de la sangre detectada al parto en nuestros estudios, concuerda con resultados recientes de Meglia et al. (2001) que muestran una proporción más baja de fagocitos con la expresión de CD62L entre las células de la sangre al momento del parto. Estos resultados sugieren que una menor cantidad de estas células pueden migrar hacia los tejidos de la glándula mamaria, con consecuencias negativas para la defensa del órgano contra los agentes infecciosos.

El flujo de LPMN hacia el tracto reproductivo es la principal causa de la neutropenia observada en la sangre después del parto (Gunnik, 1984). Una disminución del número de neutrófilos fue también demostrada por otros autores (Guidry et al., 1976; Kehrlí et al., 1989 a; Gilbert et al., 1993; Dettleux et al., 1995).

Una gradual elevación en el porcentaje de bacterias fagocitadas hacia el momento parto fue también determinada aquí, lo que es consistente con los hallazgos de Guidry et al. (1993). Una elevación experimental de oestradiol en plasma de vacas ovariectomizadas al nivel comparable de aquellas encontradas antes del parto, fue hallado como incrementando la fagocitosis de los neutrófilos (Saad y Åström, 1988). Normalmente, los glucocorticoides del plasma aumentan casi cuatro veces en el momento del parto en el bovino (Goff et al. 1989). La baja habilidad fagocítica de los neutrófilos de la sangre determinada aquí durante el periodo inmediato al post parto, ha sido observada por otros autores (Kehrlí et al. 1989; Cai et al. 1994; Dettleux et al. 1995). La predominancia de neutrófilos inmaduros en el periodo del postpartum explicaría este fenómeno. Está claro que la capacidad de fagocitar las bacterias patógenas es importante en la defensa de la ubre. Otros importantes mecanismos protectores incluyen migración al lugar de la infección y la correspondiente capacidad oxidante (respiratory burst) como medio de eliminación de las bacterias. Estas funciones han sido demostradas como deprimidas durante el peripartum (Kehrlí et al., 1989 a; Heyneman et al., 1990).

CAPACIDAD DEFENSIVA DE LOS LINFOCITOS DE LA UBRE BOVINA

Nuestros resultados (Saad, Concha, Åström 1989) muestran una depresión en la respuesta de los linfocitos de la sangre por estimulación con mitógenos alrededor del parto y luego inmediatamente en el postpartum en las vacas, lo cual está en general de acuerdo con los resultados de otros investigadores (Wells et al., 1977; Kashiwazaki et al., 1985; Ishikawa, 1987; Kehrlí et al., 1989 b). Diferentes mitógenos son considerados como

estimuladores de diferentes subpoblaciones de linfocitos. No obstante en nuestros resultados la inhibición de la proliferación linfocitaria fue similar para los tres mitógenos considerados. La estimulación de los linfocitos permaneció baja desde una semana antes hasta una semana después del parto, mostrando posteriormente una gradual alza. De la misma manera el número total de linfocitos de la sangre declina significativamente desde 10 días antes hasta 4 días después del parto.

Nuestros resultados muestran que la proliferación de los linfocitos de la secreción del periodo seco constante y desde el calostro fueron considerablemente menores que la correspondiente de los linfocitos de la sangre. Considerando los tres mitógenos, una clara supresión fue determinada en las células provenientes de la glándula mamaria 5 días antes hasta 14 días después del parto. Fuera de ese periodo, solamente PWM fue usado. De 3 a 4 semanas después del parto la proliferación de los linfocitos de la glándula mamaria también fue consistentemente baja, aproximadamente 4 veces más baja que la proliferación obtenida con células de la sangre del mismo periodo. Este fenómeno ha sido observado por Concha et al. (1980), Schore, Harp y Nonnecke (1986); Collins y Oldham (1986); Park et al. (1992); Ayoub y Yang (1997).

Los cambios en subpoblaciones de linfocitos - T alrededor del parto, principalmente la baja proporción de linfocitos CD4⁺:CD8⁺ ha sido relacionada con mecanismos inmunosupresores en varias especies (Paape et al., 2000). Trece días antes del parto, Kimura et al. (1999) determina en sangre que 47% de linfocitos que eran T-linfocitos y que estas células bajaron a 35% en el día 1 después del parto, aumentando gradualmente a 10 días postpartum hasta aproximadamente 50%. Van Kampen et al., (1999) informan que la proporción de células CD4⁺ fue más alta en sangre que en leche en todos los periodos y que lo inverso sucedió con células CD8⁺. Las células CD8⁺ de la leche tenían una mayor expresión de receptor L-selectin. Las células con receptor WC1⁺ fueron más frecuentes en sangre que en leche, excepto al parto. Al parto, las células WC1⁺ y L-selectin⁺ fueron abundantes en leche, decreciendo hacia las 16 semanas postpartum. Los autores concluyeron que la expresión L-selectin⁺ puede regular el movimiento de CD8⁺ y WC1⁺ de ambas células T, hacia la glándula mamaria. La secreción reducida de importantes citocinas inmunoreguladoras, tales como IL-2, IFN-gamma y IL-4 (Sordillo et al., 1991 b; Ishikawa et al., 1994; Shafer-Weaver et al., 1996) determinada al periodo del postpartum podría ser explicada por los menores porcentajes de linfocitos CD4⁺ durante este periodo (Shafer-Weaver et al., 1999) con los niveles más bajos entre 13 días antes y 10 días después del parto (Kimura et al., 1999).

Las citocinas producidas por los linfocitos CD4⁺ activan y regulan la inmunidad humoral y la inmunidad celular mediata. Los linfocitos CD4⁺ son los linfocitos-T predominantes en la sangre bovina periférica y en el ganglio linfático supramamario con una proporción CD4⁺:CD8⁺ >1 independientemente de la etapa de la lactación (Yang et al., 1988; Shafer-Weaver et al., 1996). Sin embargo, los linfocitos CD4⁺ de la sangre periférica bovina son productores de citocinas del tipo Th2, en comparación con células efectoras Th1 durante el periodo



del postpartum (Shafer-Weaver et al., 1999), explicándose así los más bajos niveles de IL-2 y IFN-gamma observados en este periodo (Paape et al., 2000). En contraste con la sangre periférica y el ganglio linfático supramamario, los linfocitos CD8⁺ son altamente prevalentes en los tejidos y secreciones de ubres no infectadas constituyendo cerca de 50-60% de los linfocitos-T con una proporción CD4:CD8 <1 (Taylor et al., 1994; Shafer-Weaver et al., 1996; Yang et al., 1997; Asai et al., 1998). Parece ser que los linfocitos CD8⁺ trafican preferentemente la ubre bovina en condiciones normales con significación funcional para la elevada frecuencia de los linfocitos CD8⁺ sobre CD4⁺ leche y tejidos mamaros bovinos que no ha sido bien definida (Paape et al., 2000). Igualmente el tráfico celular depende de la adhesión de moléculas como fué analizado por Van Kampen et al. (1999). La mayoría de los linfocitos-T en el parénquima y secreciones lacteas son CD8⁺gamma-delta linfocitos-T que poseen características de células con memoria (Taylor et al., 1994). Estas células con estatus de linfocitos-T con memoria podrían explicar la respuesta muy pobre de ellas a la estimulación con mitógenos si se compara con las respuestas células "naive" de la sangre periférica (Concha et al., 1995; Taylor et al., 1997), pero ellas son responsables por la estimulación antigenica-especifica (Ayanwale et al., 1981; Nonnecke and Harp, 1989). Los linfocitos CD8⁺ coexpresan la molécula de activación denominada ACT2⁺ descrita previamente por Park et al. (1992, 1993), que es un tipo similar a la de aquellos linfocitos aislados desde el tejido intraepitelial del íleo bovino (intestino) "IEL" (Walters et al., 1995; Asai et al., 1998). En contraste los T-linfocitos CD8⁺ y las células T gamma-delta de la sangre periférica, no muestran la molécula de activación ACT2⁺ y ambos tipos de células fueron halladas en extremadamente bajos niveles en los leucocitos de la sangre periférica (Asai et al., 2000). En el bovino hay un gran nivel de linfocitos T-CD8⁺, y también linfocitos-T gamma-delta que coexpresan la molécula de activación ACT2⁺ en las secreciones de la glándula mamaria durante la lactación, lo mismo que en el epitelium alveolar o en el intraepitelium de la glándula mamaria (Yamaguchi et al., 1999 y 2000; Asai et al., 2000).

Machugh et al. (1997) sostiene que los rumiantes expresan los mas altos niveles de linfocitos T gamma-delta en las secreciones mamaras y en el parenquima relacionado con la sangre periférica. El porcentaje de linfocitos-T gamma-delta en el parénquima de la glándula mamaria decrece significativamente durante los periodos de incremento de la susceptibilidad a las infecciones bacterianas, por ejemplo durante el periodo del postpartum, cuando los linfocitos-T gamma-delta estan significativamente reducidos (Shafer-Weaver et al., 1996; Kimura et al., 1999).

Paape et al. (2000) resume las funciones de los linfocitos B expresando que no solamente son productores de anticuerpos sino que estas células a diferencia de macrófagos y células dendríticas, usan sus receptores superficiales para reconocer patógenos específicos, procesarlos y presentar antígenos en el contexto de MHCII a los linfocitos-T "helper". Posteriormente se

produce la proliferación y diferenciación de los linfocitos B en productores de anticuerpos como "plasma cells" o células con memoria "memory cells". Diferente a los linfocitos-T, el porcentaje de linfocitos-B permanece constante en la sangre periférica durante las distintas etapas de la lactación. Sin embargo, durante el período del postpartum los linfocitos-B muestran en la sangre una funcionalidad significativamente disminuida (Nagahata, 1992).

INMUNOSUPRESIÓN EN MACRÓFAGOS Y NEUTRÓFILO. EFECTO DEL STRESS AL PARTO E INICIO DE LA LACTANCIA

Macrófagos y neutrófilos son activos fagocitos en la glándula mamaria y son células capaces de ingerir bacterias, detritus celulares y componentes acumulados de la leche (Sordillo y Nickerson, 1988). No obstante, a causa de esta ingestión indiscriminada que incluye componentes lacteos como grasa, caseína etc., macrófagos y neutrófilos son menos efectivos en comparación con los fagocitos correspondientes en la sangre periférica (Outteridge y Lee, 1988; Coray, 1996). Además los macrófagos muestran una capacidad deprimida como células presentadoras de antígeno, APC, a los T-linfocitos CD4⁺ (Fitzpatrick et al., 1992; Politis et al., 1992). En la glándula mamaria los linfocitos tienen dificultades para reconocer los antígenos sobre los linfocitos-B y macrófagos para una mayor y necesaria producción de citocinas e inmunoglobulinas; esto causado porque estas células ya habían sido anteriormente encomendadas en funciones antigénicas específicas (Sordillo et al., 1997). Esta limitación en la función antígeno-respuesta específica puede influir en las proliferaciones como respuesta los mitógenos.

Yamaguchi et al. (2000) y Asai et al. (2000) han analizado el rol de los linfocitos-T, CD8⁺ citotóxicos/supresores, así como también los linfocitos-T gamma-delta en el epitelio de la glándula mamaria de vacas en lactancia. Un alto porcentaje de células-T, CD8⁺ con efecto supresor puede ser la razón de inmunosupresión mediante la disminución de citocinas producidas durante la lactación. Los mismos autores antes nombrados sostienen que este mismo fenómeno sucede en los linfocitos-T intraepiteliales intestinales, en donde las células CD8⁺ tienen funciones especiales defensivas: capacidad citolítica y activación para remover células tumorales o células infectadas. Estas células expresan la molécula de activación ACT2⁺ lo que ha sido también demostrada en las células del tejido mamario y en las células de las distintas secreciones de la ubre.

La supresión de la respuesta inmune en el intestino puede ser determinada como una manera de prevenir respuestas inmunes adversas a causa del enorme número de antígenos que llegan al intestino durante la ingestión de los alimentos (Kraehenbuhl y Neutra, 1992). Un fenómeno similar puede estar presente en la glándula mamaria bovina (Asai et al., 2000).



X Congreso Latinoamericano de Buiatría XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría

Kehrli et al. (1999) analizan los efectos del stress en el tráfico de leucocitos y en la respuesta inmunitaria, consideran el peripartum como un periodo dependiente del stress del parto y el inicio de la lactancia, ambos factores alteran el tráfico leucocitario dejando así al animal más susceptible a las enfermedades, como por ejemplo a la mastitis. El alto nivel de corticoesteroides con efectos supresivos puede influir tanto el número como en las funciones de los leucocitos, con un incremento de la susceptibilidad de la ubre a las infecciones (Guidry et al., 1976).

Kimura et al., (1998) han demostrado el rol de la alta producción de leche y comparado vacas mastectomizadas vs vacas intactas, encontrando que ambos INF-gamma e IgM secretados por las células de la sangre disminuyó significativamente en las vacas no operadas (intactas), concluyendo que la producción lechera juega un importante papel en la supresión de la inmunidad durante el peripartum por disminución de la función linfocitaria. Los mismos autores determinan significativas diferencias en, bajos niveles de estrógenos plasmáticos en las vacas intactas así como también bajos niveles de Ca, ácidos no estéricos y en general un balance energético negativo. Estas características todas son igualmente depresoras de las inmunofunciones alrededor del parto en la vaca lechera. En resumen, las vacas mastectomizadas fueron menos inmunosuprimidas que las no operadas (intactas) y se recuperaron más rápidamente de los efectos del parto. Los cambios hormonales durante el peripartum están reconocidos como relacionados con la inmunidad de la ubre, el cortisol presentando niveles considerablemente altos al parto, es crucial para la expulsión del feto. Sin embargo, como con los corticoesteroides ellos puede tener un negativo efecto en la inmunidad de la ubre (Erskine, 2001).

Kehrli et al., (1998) han resumido los cambios desarrollados por el incremento de los corticoesteroides del plasma durante el período del peripartum, como sigue:

1. La producción de citocinas por los leucocitos bovinos es perjudicada, la producción de INF-gamma e IL-2 es reducida sugiriendo una supresión de las respuestas de los linfocitos-Th1.
2. La incapacidad de los linfocitos-B de secretar IgM, esta relacionada también con la incapacidad de producir IFN-gamma e IL-2.
3. Altas concentraciones de estrógenos y progesterona son determinadas paralelamente por el incremento de los niveles de corticoesteroides, prolactina, hormona del crecimiento e insulina en el periodo del peripartum
4. Todos estos factores aumentan la capacidad de los linfocitos de enlazar hormonas durante el periodo del peripartum, factor que deteriora sus funciones.

Barta et al., (1991) expresó que las funciones de los linfocitos en la leche están inhibidas por factores presentes en el suero de la leche. La más grande inhibición del ADN de los linfocitos fue en muestras de suero de leche de glándulas mamarias con mastitis clínicas, pero esta inhibición fue también detectada en menor grado en muestras provenientes de ubres

normales. Las moléculas responsables por la inhibición fueron glycoproteínas .

Ayoub et al., (1996) informa que el factor de transformación, factor de crecimiento-beta (TGF-beta), una citokina multifuncional, aparece en ambas leches; normales y mastíticas. En ausencia de niveles detectables de IL-2 esta TGF-beta es inmunosupresiva para las células Th1 en la leche. El posible efecto de este factor en nuestros experimentos no debe ser dejado de lado.

LOS MACRÓFAGOS SON RELEVANTES CÉLULAS EN LA INMUNODEFENSA LOCAL DE LA UBRE

Los macrófagos son tipos predominantes de células en la leche y tejidos de la ubre involucionada y lactante (Sordillo et al., 1997). En el presente estudio (Concha y Holmberg 1990) se encontró que los macrófagos mamarios activados por el mitógeno PWM eran capaces de estimular la proliferación de linfocitos autólogos aislados desde la sangre y secreción del periodo seco.

La media del índice de estimulación inducida por macrófagos activados del periodo seco fue significativamente mayor que la media del índice de estimulación inducido por macrófagos activados pero obtenidos de la secreción lactea de plena lactación. El índice de estimulación de estos últimos fue significativamente menor que la media del índice de estimulación de linfocitos de la sangre incubados solo con el mitógeno PWM. De esta manera, mientras macrófagos del periodo seco aumentan la proliferación, macrófagos de la leche activados ejercen una clara acción supresiva de las respuestas linfocitarias. Para explicar las diferentes habilidades de macrófagos mamarios Gershwin et al., (1995) han considerado que linfocitos estimulados por mitógenos son eficientes productores de varios factores diferentes tales como TNF-beta, factor macrófago-inhibidor o factor macrófago-agregador, IL-2, IFN-gamma y otras interleukinas. Durante el periodo seco constante hay un predominio de los linfocitos TCD4⁺ con una típica capacidad, inmunoestimuladora, mientras durante la plena lactación hay un predominio de los linfocitos-T CD8⁺, determinados como poseedores de funciones supresoras (Concha et al., 1995; Yang et al., 1997; Asai et al., 1998, 2000). Es necesario caracterizar cuales factores están presentes en los macrófagos del período seco que son capaces de específicamente inducir a los linfocitos T para iniciar la producción de IL-2, IFN-gamma, TNF-beta, IL-4, todos factores estimuladores y en cambio a los macrófagos de la leche separados de la mitad de la lactación a inducir factores supresores relacionados con los T-linfocitos CD8⁺. Otra explicación para las mejores respuestas inducidas por los macrófagos del periodo seco sobre los linfocitos de la sangre sería la posible existencia de mecanismos de modulación dependientes de la etapa de maduración de los macrófagos (Unanue, 1984). Estos mecanismos son más pronunciados durante el periodo seco donde las células no son removidas en la misma



extensión como sucede en la lactación, permitiendo a ellas madurar progresivamente. Es también posible que dos o más, diferentes subpoblaciones de macrófagos, puedan haber sido involucradas.

En estudios anteriores, linfocitos del periodo seco han mostrado una habilidad solo limitada para proliferar en respuesta a los mitógenos *in vitro* (Concha et al. 1980, 1995; Schore et al. 1981; Holmberg y Concha, 1985; Collins y Oldham, 1986). En consecuencia fué de interés el evaluar los efectos del PWM activando macrófagos de la ubre del período seco sobre linfocitos autólogos, es decir separados de la secreción del mismo periodo y el mismo animal. La media del índice de estimulación de los linfocitos en este caso fué significativamente mayor (por lo menos tres veces) que la media del índice de estimulación para los mismos linfocitos estimulados por incubación con PWM (sin macrófagos). Así estos resultados indicaron que es posible modular la respuesta celular local, aumentando la proliferación de los linfocitos del periodo seco hasta alcanzar un nivel tan alto como aquel mostrado por los linfocitos de la sangre periférica.

La clara capacidad mostrada por los macrófagos del período seco para modular las respuestas de linfocitos de la sangre tanto como de la secreción de la ubre *in vitro*, tiene un gran significado en aspectos relacionados con la inmunoestimulación local de la ubre que puede abrir nuevos caminos en el tratamiento de la mastitis. No obstante, es necesario diferenciar entre la función presentadora de antígeno y la activación de los macrófagos por PWM, que es una lectina proveniente de plantas, las cuales tienen la propiedad de ligarse y enlazarse con residuos de carbohidratos en la superficie de la célula. De acuerdo con Gershwin et al. (1995) el lugar específico donde se liga a la célula el PWM es desconocido. La capacidad local de macrófagos del periodo seco ha sido examinada recientemente *in vivo* mediante la infusión intramamaria de beta,3-glucan, un potente estimulador de macrófagos (Inchaisri et al., 2000). Ellos han obtenido un aumento en la cantidad de monocitos/macrófagos, MHC class II leucocitos, CD4⁺ linfocitos e IgG1+IgG2 etc., concluyendo que la infusión local de beta,3-glucan puede ser utilizada para aumentar la capacidad defensiva local de la glándula mamaria bovina.

ACTIVACIÓN DE LOS LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES (LPMN)

LPMN constituyen la primera línea de defensa inmunológica contra las infecciones intramamarias (Paape et al., 1979). Sin embargo, los LPMN tanto como las células mononucleares de la sangre (monocitos) están consideradas como inmunológicamente disminuidas durante el periodo del peripartum. En el mismo sentido las células de la glándula mamaria están disminuidas inmunológicamente durante todo el ciclo lactacional, como ha sido revisado por varios autores (Sordillo et al., 1997; Mallard et al., 1998; Paape et al., 2000). En nuestros resultados, la capacidad de matar

bacterias (respiratory burst) fue reducida durante el peripartum. Específicamente en la ubre bovina, Smits et al., (1999) demostraron una significativa reducción de la fagocitosis y la capacidad oxidante, como secuela de la diapedesis de los LPMN cruzando los tejidos mamaros y epitelios desde la sangre hasta la glándula mamaria. Además, en contraste con la situación en una lactancia corriente y normal, los receptores Fc de las células fagocitarias del calostrum, secreción del periodo seco y de la leche mastítica, aparecen bloqueados.

Las deficiencias de los fagocitos de la leche fueron resumidas por Targowski (1983); Targowski y Nielmatowski (1986, 1988) y Sandholm y Korhonen (1995), de la manera siguiente:

1. Los receptores Fc de las células fagocitarias del calostrum, secreción del periodo seco y leche mastítica, están bloqueados.
2. Los LPMN de la leche son menos efectivos como fagocitos y en la destrucción de los patógenos que las correspondientes células de la sangre
3. La capacidad fagocitaria de los LPMN es relativamente pobre en la leche debido a la baja reserva energética (bajo contenido de glucosa) y bajo contenido opsónico (como ejemplo: bajos anticuerpos y complemento)
4. En la leche los LPMN pierden su capacidad luego de fagocitar caseína y glóbulos de grasa

Gershwin et al., (1995) afirman que la fagocitosis ocurre cuando las células han llegado al sitio de invasión bacteriana y pueden engolfar y matar los microorganismos, utilizando los receptores para el componente-Fc de inmunoglobulinas y complemento. Defectos que deterioran estas funciones causan que el paciente presente infecciones crónicas requiriendo del uso de antibiótico. El mal uso de los antibióticos en terapia de mastitis en muchos países que conlleva al desarrollo de resistencia bacteriana y contaminación de los alimentos con severas implicaciones de la salud animal y humana (Lingaas, 1998). Así, alternativas a los antibióticos, tales como productos naturales con propiedades inmunoestimuladoras como las saponinas, pueden ser alternativas en el tratamiento de la mastitis. Tizard (1996) ha definido a las saponinas químicamente como triterpene glycosides que tienen una potente actividad de "adjuvante" de vacunas actuando como agentes activos de superficie que estimulan el procesamiento y mejoramiento de la actividad de linfocitos B y T.

Para evaluar la fagocitosis, la determinación de su índice de fagocitosis y capacidad de matar por engolfamiento de microorganismos y su resultante quemiluminiscencia son parámetros suficientes (Gershwin et al., 1995).

Así la respuesta oxidativa y la actividad fagocitaria de LPMN tanto de la sangre como de la leche usando partículas de zymosan, fue aumentada *in vitro* por saponinas del ginseng en una manera dependiente a la dosis y evaluada por quemiluminiscencia (CL). Los LPMN de la leche fagocitaron una significativa mayor cantidad de partículas cuando fueron cultivadas en presencia de saponinas del ginseng que sin saponinas. La mayor



X Congreso Latinoamericano de Buiatría XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría

actividad para "respiratory burst" detectada para las células de la leche que para las células de la sangre puede ser debida a que en la leche solamente el 50% eran LPMN vs 90% para la sangre. De esta manera la contaminación en la leche con macrófagos pudo aumentar los valores de CL. El porcentaje de células activamente fagocíticas con partículas ingeridas, después de la incubación con saponinas del ginseng aumentó en un 12,7% y 11,2% para sangre y leche respectivamente. El incremento para "respiratory burst" medido por CL fué mucho más predominante para el tratamiento con saponinas del ginseng, 31,7% y 23,0% más alto, para sangre y leche respectivamente.

En general los resultados obtenidos con células de bovino en los presentes experimentos parecen estar de acuerdo con los resultados con saponinas del ginseng en otras especies. Así, Soloveva et al., (1989) observó una activación de la capacidad fagocitaria de LPMN y macrófagos en cuyes. Scaglione et al. (1990) informa de un aumento de la quimiotaxis y habilidad fagocítica de LPMN humanos después de la administración oral de saponinas del ginseng. Scaglione et al., (1994) también demuestra un incremento de la fagocitosis y capacidad de matar intracelular en macrófagos después de la administración oral de saponinas del ginseng.

No está claro en nuestros resultados, si las saponinas del ginseng han actuado directamente sobre la superficie de las células influyendo los mecanismos enzimáticos de la membrana de la célula relacionados con la producción de oxígeno y radicales hidroxílicos. Sin embargo, las saponinas del ginseng inducen también la producción de citocinas como ejemplo, interferón en células humanas *in vitro* como ha descrito Gupta et al., (1980) e interferón +IL-2 de linfocitos de ratones (Jie et al., 1984; Yang et al., 1990).

Tizard (1996) sostiene que los LPMN son activados por citocinas, aumentando su actividad antimicrobiana. Sordillo y Babiuk (1991 a, b) han demostrado que LPMN de la sangre tratados con IFN-gamma *in vitro*, incrementan su CL y la fagocitosis más su efecto bactericida. Los mismos autores han demostrado *in vivo* una detención del crecimiento bacteriano y una inhibición de la respuesta inflamatoria local.

ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS POR LAS SAPONINAS DEL GINSENG

Los resultados de nuestros trabajos muestran que las respuestas proliferativas de los linfocitos de las secreciones del periodo seco constante y calostrum fueron considerablemente más bajas que las de los correspondientes linfocitos de la sangre periférica después de las estimulaciones con PHA, Con A y PWM. También se ha demostrado que fuera de los periodos mencionados (colostrum, periodo seco constante) 3 a 4 semanas antes y 3 a 17 semanas después del parto las proliferaciones linfocitarias continuaron siendo consistentemente más bajas que en los linfocitos de la sangre periférica, en este caso usando solamente PWM. Resultados semejantes fueron observados por otros

autores (Concha et al., 1980; Schore et al., 1981; Nonnecke y Kehrl, 1985; Collins y Oldham, 1986; Park et al., 1992; Ayoub y Yang, 1997). Diferentes explicaciones han sido propuestas para esta inmunosupresión en los linfocitos de la sangre periférica (al peripartum) y en todas las etapas de la lactación (en los linfocitos de la ubre), en resumen: 1) bajo número total de linfocitos 2) Stress al parto y comienzo de la lactancia 3) reducida secreción de importantes citocinas como: IL-2, IFN-gamma, e igualmente del número de linfocitos efectores Th1 4) linfocitos-B en la sangre presentando una significativa disminución funcional.. Además, los efectos supresores en los linfocitos de las secreciones mamarias están asociados con: 1) una alta prevalencia de linfocitos-T CD8⁺ supresores 2) una predominante prevalencia de células T con memoria (memory cells) que responden pobremente a la estimulación inespecífica de los mitógenos 3) linfocitos-T que coexpresan la molécula supresora ACT2 4) los factores productores de stress que desencadenan supresión.

Estudios con saponinas del ginseng en otras especies indican que el extracto seco de la raíz tiene efectos potenciadores de los linfocitos. Así Scaglione et al., (1990) observaron que las respuestas de linfocitos de la sangre en humanos usando Con A, PWM y LPS significativamente aumentaron después de una administración oral del extracto de saponinas del ginseng. Yang y Yu (1990) observaron un efecto similar después de una estimulación *in vitro* de células del bazo activas con los mismos mitógenos anteriormente nombrados y provenientes de ratones tratados con saponinas del ginseng. Un aumento de la proliferación de los linfocitos humanos fué también observada por Wu et al., (1991) cuando los linfocitos fueron incubados *in vitro* con PHA más saponinas del ginseng. Liu et al., (1995) usando una saponina purificada del ginseng, Rg1 más PHA en coculturas de células de humanos jóvenes y viejos consiguieron significativas mejores respuestas en los linfocitos de los pacientes más viejos. Finalmente, en nuestros propios resultados saponinas del ginseng + PWM fueron analizados en linfocitos de la sangre periférica y de la leche *in vitro* 17 semanas después del parto con un claro aumento de la respuesta proliferativa a una concentración de 40 ug/ml de saponinas del ginseng + 5 ug/ml de PWM, en suspensiones de células de sangre y leche. En estos resultados tenemos que considerar además:

1) en la leche en este trabajo había también macrófagos de plena lactación que tienen efecto supresor, como fué analizado anteriormente 2) los linfocitos de la leche durante plena lactación pueden ser viejos es decir células menos viables, lo que ha sido demostrado anteriormente usando tinciones vitales. El efecto sinérgico de las saponinas del ginseng junto a mitógenos en la estimulación de células mononucleares no es único de las saponinas del ginseng. Saponinas de otras fuentes, por ejemplo de *Quillaja saponaria Molina* (Quillay en Chile) han sido usadas en los bovinos como "adjuvants", por ejemplo en las vacunas para la Fiebre Aftosa. Estas saponinas estimulan los linfocitos T y B, y el procesamiento de los antígenos por las células mononucleares (Tizard, 1996). En conclusión, nuestros



resultados demuestran que las saponinas del ginseng pueden modular *in vitro* los linfocitos de la sangre periférica y de la glándula mamaria en vacas sanas.

En investigaciones anteriores fué demostrado que las saponinas del ginseng estimularon significativamente a los LPMN y linfocitos *in vitro* (Hu et al., 1995; Concha et al., 1996). No obstante esos resultados, considerando que los efectos *in vivo* para estas saponinas en la vaca no han sido estudiados, se diseñó el siguiente trabajo para determinar los efectos inmunoestimuladores de inyecciones subcutáneas de saponinas del ginseng en vacas infectadas a lo menos en un cuarto con *Staphylococcus aureus*, produciendo una mastitis subclínica.

**ROL DE LAS SAPONINAS DEL GINSENG EN
 VACAS INFECTADAS CRÓNICAMENTE EN UN
 CUARTO MAMARIO**

Hu, Concha et al. (2001) experimentan en vacas con uno o más cuartos con mastitis subclínicas por *S. aureus* que fueron tratadas con saponinas del ginseng inyectadas via subcutánea durante 6 días. La misma cantidad de vacas con mastitis subclínica por *S. aureus* fueron inyectadas via subcutánea, con solución salina como controles. Después del tratamiento con saponinas del ginseng, dos de los cuartos infectados se mostraron negativos bacteriológicamente a todos los muestreos, mientras que uno de los cuartos infectados por *S. aureus* solamente se demostró la infección en un muestreo dos semanas después del término de los tratamientos. Así una recuperación del 50% fué obtenida. Por razones económicas solo un pequeño número de animales fué disponible, lo que impidió una significación estadística. Pero en contraste, en los animales controles el número de *S. aureus* por cuartos infectados aumentó de tres a cuatro. Además, los recuentos de células somáticas (SCC) tendieron a decrecer todo el tiempo en los cuartos de las vacas tratadas con saponinas del ginseng. Los leucocitos de la sangre en general no cambiaron muy significativamente, pero los monocitos fueron significativamente mayores una semana post-tratamiento. También fueron significativos a las 2 y 3 semanas post-tratamiento. El número de neutrófilos, eosinófilos y basófilos fueron también mayor después del tratamiento con saponinas del ginseng (basófilos e eosinófilos influyen sobre los linfocitos Th2, mientras que neutrófilos y macrófagos son activados por Th1). El número de linfocitos fué significativamente mayor 2 y 3 semanas post-tratamiento. El porcentaje de neutrófilos capaces de ingerir partículas fluorescentes o dihidro rodamina (DHR) oxidativa aumentó significativamente desde el pretratamiento al muestreo 1 semana después del último tratamiento. Las proporciones de neutrófilos capaces de ingerir partículas fluorescentes o DHR oxidante en vacas tratadas con saponinas del ginseng fué aproximadamente 20% mayor a 1 semana después del último tratamiento comparada con el pre-tratamiento.

Como la inmunorespuesta está considerada deprimida en la glándula mamaria (Sordillo et al., 1997; Smits et

al., 1999) muchas investigaciones han sido dirigidas hacia la modulación de las inmunorespuestas de manera tal de mejorar la capacidad de controlar la infección bacteriana en la ubre. Algunas citokinas, como IL-2 "recombinant" de bovinos (Daley et al., 1990), "granulocyte colony stimulating factor" (Nickerson et al., 1989a; Kehrl et al., 1991a) y otras substancias tales como beta 1, 3-glucan (Inchaisri et al., 2000) han sido usadas para estimular la respuesta inmune mamaria. Nosotros con estos resultados hemos demostrado similares efectos, con una mayor actividad de la inmunidad no específica (LPMN y macrófagos) y resistencia a la infección por *S. aureus* en la ubre después de inyectar saponinas del ginseng. Estos últimos resultados concuerdan con los trabajos de Song et al. (1997) en los cuales una mayor capacidad para controlar la infección de *Pseudomonas aureoginosa* en pulmones de ratas sin timo, sufriendo una infección crónica fue conseguido por inyección subcutánea de saponinas del ginseng. Este estudio demostró que la fagocitosis y "oxidative burst" aumentó en los neutrófilos de la sangre. Nosotros hemos observado también el aumento de linfocitos y monocitos en vacas tratadas con saponinas del ginseng, lo que puede ser atribuido al efecto de las saponinas en las células hematopoyéticas (Gao et al., 1992).

Efectos inmunomoduladores de las saponinas del ginseng también han sido determinados en otras especies, por ejemplo aumento de la fagocitosis y proliferación linfocitaria en ratones y ratas (Liu et al., 1982; Liu y Zhang., 1995). En humanos Scaglione et al. (1990) determinó aumento de la "chemotaxis", habilidad fagocitaria y proliferación linfocitaria con mitógenos por administración oral de las saponinas del ginseng; el mismo autor (Scaglione et al., 1994) determinó aumento de la fagocitosis y capacidad intracelular de los macrófagos para matar microorganismos. Finalmente, se puede mencionar a Song et al. (1998) que determinaron aumento de la CL de neutrófilos en ratas con neumonía crónica por *P.aeruginosa* después de la inyección subcutánea de saponinas del ginseng.

CONCLUSIONES

- Una reducida capacidad de los neutrófilos para fagocitar fue determinada durante el periodo inmediatamente después del parto. Esta baja fagocitosis fue fundamentalmente debida a una predominancia de neutrófilos inmaduros.
- Desde el día 10 antes hasta el día 4 después del parto el número total de linfocitos de la sangre decreció significativamente. La actividad de los linfocitos fue también claramente suprimida en su capacidad proliferativa ante los mitógenos.
- Nuestros resultados muestran que la respuesta proliferativa de los linfocitos de las secreciones mamarias del periodo seco constante y calostrum fue considerablemente más baja que la correspondiente en los linfocitos de la sangre periférica.



X Congreso Latinoamericano de Buiatría XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría

- Durante todas las etapas de la lactación consideradas en este estudio la proliferación de los linfocitos en respuesta a los mitógenos fue considerablemente menor que las respuestas de los linfocitos correspondientes de la sangre periférica.
 - Los macrófagos del periodo seco constante activados mediante incubación con mitógeno (PWM) aumentan la proliferación de los linfocitos autólogos de la sangre así como también de la propia secreción del periodo seco constante. En contraste, macrófagos de la leche obtenidos durante plena lactación aparecen induciendo un efecto supresivo sobre las células de la sangre periférica y de la glándula mamaria. El efecto estimulador mencionado en primer lugar debe ser considerado en los tratamientos de la mastitis al periodo seco.
 - Las saponinas del ginseng aumentan la respuesta oxidante y la fagocitosis de las células de la sangre y de la leche en co-culturas con mitógenos. Los linfocitos de la leche son más difíciles de modular que los de la sangre periférica.
 - La inyección subcutánea de saponinas del ginseng en vacas determinó un claro aumento de la fagocitosis y capacidad oxidativa de los neutrófilos de la sangre. También, después del tratamiento se observó un importante aumento en el número de monocitos y linfocitos de la sangre. De esta manera se puede concluir que las inyecciones de saponinas del ginseng activan la inmunidad inespecífica de las vacas. Las saponinas del ginseng pueden tener un interesante rol en el mejoramiento de los tratamientos de la mastitis de la vaca.
8. Collins RA and Oldham G, 1986. Proliferative responses and IL-2 production by mononuclear cells from bovine mammary secretions, and the effect of mammary secretions on peripheral blood lymphocytes. *Immunology*, 58: 647-51.
 9. Concha C, Holmberg O and Morein B, 1980. Characterization and response to mitogens of mammary lymphocytes from the bovine dry-period secretion. *J Dairy Res*, 47: 305-11.
 10. Concha C, Saad A and Holmberg O, 1995. Comparison of mammary gland T-cell proliferative responses and proportions of three T-lymphocyte population (CD2, CD4 and CD8) between late lactation and mid-involution. In: Saran A and Soback S (Eds). *The 3rd International Mastitis Seminar*, May 28 - June 1, 1995. Tel Aviv, Israel, Proceedings I, 45-9.
 11. Concha C, Holmberg O, 1990. Ability of mammary macrophages to enhance proliferation of autologous blood and mammary secretion lymphocytes. *J Dairy Res*, 57, 7-16.
 12. Concha C, Hu S., Holmberg O. 1996. The proliferative response of cow stripping milk and blood lymphocytes to pokeweed mitogen nad ginseng *in vitro*. *Vet. Res*, 27, 107-115.
 13. Cooray R, 1996. Casein effects on the myeloperoxidase-mediated oxygen-dependent bactericidal activity of bovine neutrophils. *Vet Immunol and Immunopathol*, 51: 55-65.
 14. Dalsgaard, 1978. A study of the isolation and characterization of the saponin Quil A. Evaluation of its adjuvant activity, with a special reference to the application in the vaccination of cattle against foot-and-mouth disease. *Acta Vet Scand Suppl*, 7-40.
 15. Detilleux JC, Kehrli ME Jr, Stabel JR, Freeman AE and Kelley DH, 1995. Study of immunological dysfunction in periparturient Holstein cattle selected for high and average milk production. *Vet Immunol Immunopathol*, 44: 251-67.
 16. Dosogne H, Burvenich C, van Werven T, Roets E, Noordhuizen-Stassen EN and Goddeeris B, 1997. Increased surface expression of CD11b receptors on polymorphonuclear leukocytes is not sufficient to sustain phagocytosis during *Escherichia coli* mastitis in early postpartum dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol*, 60: 47-59.
 17. Erskine RJ, 2001. Enhancing immunity during the dry period: Pitfalls and opportunities. *National Mastitis Council, Annual Meeting Proceedings*, 95-101.
 18. Fitzpatrick JL, Cripps PJ, Hill AW, Bland PW and Stokes CR, 1992. MHC class II expression in the bovine mammary gland. *Vet Immunol Immunopathol*, 32: 13-23.
 19. Gao RL, Xu CL and Jiu JM, 1992. Effect of total saponins of *Panax ginseng* on hematopoietic progenitor cells in normal human and aplastic anemia patients. *Chun Kou Chung His I Chieh Ho Tsachih*. 15: 285-87 (in Chinese).
 20. Gershwin LJ, Krakowka S and Olsen RG, 1995. Immunology and immunopathology of domestic animals. In: A Miller (Ed). *Mosby-Year Book, Inc, St Louis, MO*.
 21. Gilbert RO, Gröhn YT, Guard CL, Surman V, Neilsen N and Slauson, DO, 1993. Impaired post partum neutrophil function in cows which retain fetal membranes. *Res Vet Sci*, 55: 15-19.
 22. Goff JP, Kehrli ME Jr and Horst RL, 1989. Periparturient hypocalcemia in cows: prevention using intramuscular parathyroid hormone. *J Dairy Sci*, 72 (5): 1182-7.
 23. Guidry AJ, Paape MJ and Pearson RE, 1976. Effects of parturition and lactation on blood and milk cell concentrations, corticosteroids, and neutrophil phagocytosis in the cow. *Am J Vet Res*, 37: 1195-200.
 24. Gunnink JW, 1984. Retained placenta and leucocytic activity. *Vet Q*, 6: 49-51.
 25. Gupta S, Agarwall SS, Epstein LB, Fernandes G and Good R, 1980. Panax - a new mitogen and interferon inducer. *Clin Res*, 28: 504.

BIBLIOGRAFIA

1. Asai K, Kai K, Rikiishi H, Sugawara S, Maruyama Y, Yamaguchi T, Ohta M and Kumagai K, 1998. Variation in CD4⁺ T and CD8⁺ T lymphocyte subpopulations in bovine mammary gland secretions during lactating and non-lactating periods. *Vet Immunol Immunopathol*, 65: 51-61.
2. Asai K, Komine Y, Kozutsumi T, Yamaguchi T, Komine K and Kumagai K, 2000. Predominant subpopulations of T lymphocytes in the mammary gland secretions during lactation and intraepithelial T lymphocytes in the intestine of dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol*, 73: 233-40.
3. Ayanwale LF, Kaneene JB, Johnson DW, Muscopolat CC and Anderson RK, 1981. *In vitro* stimulation of bovine milk lymphocytes. Standardization of the assay for bovine brucellosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 4: 343-52.
4. Ayoub IA and Yang TJ, 1997. The regulatory role of transforming growth factor-bb in activation of milk mononuclear cells. *Am J Reprod Immunol*, 38: 121-8.
5. Ayoub IA, Bendel RB and Yang TJ, 1996. Increase in the proportion of CD4⁺ T lymphocytes and the levels of transforming growth factor-bb in the milk of mastitic cows. *Immunol Inf Diseases*, 6: 145-50.
6. Barta O, Barta VD, Crisman MV and Akers RM, 1991. Inhibition of lymphocyte blastogenesis by whey. *Am J Vet Res*, 52: 247-53.
7. Cai T, Weston PG, Lund LA, Brodie B, McKenna DJ and Wagner WC, 1994. Association between neutrophil functions and periparturient disorders in cows. *Am J Vet Res*, 55: 934-43.



26. Harp JA and Nonnecke BJ, 1986. Regulation of mitogen responses by bovine milk leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol*, 11: 215-24.
27. Heyneman R, Burvenich C and Vercauteren R, 1990. Interaction between the respiratory burst activity of neutrophil leukocytes and experimentally induced *Escherichia coli* mastitis in cows. *J Dairy Sci*, 73 (4): 985-94.
28. Holmberg O and Concha C, 1985. The function of leukocytes in mammary secretion. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 37: 458-61.
29. Hu S, Concha C, Cooray, R. Holmberg O. 1995. Gingseng Enhanced oxidateive and phagocytic activities of the polymorphonuclear leukocytes from bovine peripheral blood and stripping milk. *Vet Res* 26, 155-161.
30. Hu S, Concha C, Johannisson, Meglia G, and Persson Waller, K. 2001. Effect of subcutaneous injection of gingseng on cows with subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Vet Med* 48, 519-528.
31. Höglund S, Dalsgaard K, Lövgren K, Sundquist B, Osterhaus A and Morein B, 1989. ISCOMs and immunostimulation with viral antigens. *Subcell Biochem*, 15: 39-68.
32. Inchaisri C, Persson Waller K and Johannisson A, 2000. Studies on the modulation of leucocyte subpopulations and immunoglobulins following intramammary infusion of bb1,3-glucan into the bovine udder during the dry period. *J Vet Med B*, 47: 373-86.
33. Ishikawa H, 1987. Observation of lymphocyte function in perinatal cows and neonatal calves. *Nippon Juigaku Zasshi*, 49: 469-75. In Japanese.
34. Ishikawa H, Shirahata T and Hasegawa K, 1994. Interferon-gg production of mitogen stimulated peripheral lymphocytes in perinatal cows. *J Vet Med Sci*, 56: 735-8.
35. Jain NC, Paape MJ, Berning L, Salgar SK and Millie W, 1991. Functional competence and monoclonal antibody reactivity of neutrophils from cows injected with *Escherichia coli* endotoxin. *Com Haematol Intern*, 1: 10-20.
36. mammary gland. *Am J Vet Res*, 42: 743-7.
37. Jie YH, Cammisuli S, Bagliolini M, 1984. Immunomodulatory effects of Panax ginseng CA Meyer in the mouse. *Agents and Actions* 15: 386-91.
38. Kashiwazaki Y, Maede Y and Namioka S, 1985. Transformation of bovine peripheral blood lymphocytes in the perinatal period. *Jpn J Vet Sci*, 47: 337-9.
39. Kehrli ME Jr and Shuster DE, 1994. Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. *J Dairy Sci*, 77: 619-27.
40. Kehrli ME Jr, Nonnecke BJ and Roth JA, (1989a). Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period. *Am J Vet Res*, 50: 207-14.
41. Kehrli ME Jr, Nonnecke BJ and Roth JA, (1989b). Alterations in bovine lymphocyte function during the periparturient period. *Am J Vet Res*, 50: 215-20.
42. Kehrli ME Jr, Cullor JS and Nickerson SC, (1991b). Immunobiology of hematopoietic colony-stimulating factors: potential application to disease prevention in the bovine. *J Dairy Sci*, 74: 4399-412.
43. Kehrli ME Jr, Goff JP, Stevens MG and Boone TC, (1991a). Effects of granulocyte colony-stimulating factor administration to periparturient cows on neutrophils and bacterial shedding. *J Dairy Sci*, 74: 2448-58.
44. Kehrli ME, Kimura K, Goff JP, Stabel JR and Nonnecke BJ, 1998. Periparturient immunosuppression in dairy cows: nutrition and lactation effects. *Production Diseases in Farm Animals*. 10th International Conference. (Ed) TH Wensing, The Netherlands.
45. Kehrli ME, Burton JL, Nonnecke BJ and Lee EK, 1999. Effects of stress on leukocyte trafficking and immune responses: implications for vaccination. *Adv Vet Med*, 41: 61-81.
46. Kimura K, Goff JP, Nonnecke BJ, Horst RL and Kehrli ME, 1998. Effect on mastectomy on steroid hormones, energy status and lymphocyte function in periparturient dairy cows. *J Anim Sci*, 76: suppl 1) *J Dairy Sci*, 81: Suppl 1, 43.
47. Kimura K, Goff JP, Kehrli ME Jr and Harp JA, 1999. Phenotype analysis of peripheral blood mononuclear cells in periparturient dairy cows. *J Dairy Sci*, 82: 315-9.
48. Kraehenbuhl JP and Neutra MR, 1992. Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiol Rev*, 72: 853-79.
49. Lee EK and Kehrli ME Jr, 1998. Expression of adhesion molecules on neutrophils of periparturient cows and neonatal calves. *Am J Vet Res*, 59: 37-43.
50. Lingaas E, 1998. The use of antimicrobials in animal production – a threat to humans? *NK Vet symposium*, Helsinki, Finland, 1998: 26-7.
51. Liu CX and Xiao PG, 1992. Recent advances on ginseng research in China. *J Ethnopharmacol*, 36: 27-38.
52. Liu CX and Zhang JT, 1995. Immunoregulatory effects of ginsenoside Rg1 in aged rats. *Yao Hsueh Hsue Pao*, 30: 818-23. (In Chinese).
53. Liu AJ, Cui JZ and Wang BX, 1982. Effects of ginseng root saponin on the immunity. *Ji Lin Medical Science*, 3: 56-7. In Chinese.
54. Machugh ND, Mburu JK, Carol MJ, Wyatt CR, Orden JA and Davis WC, 1997. Identification of two distinct subsets of bovine ggdd T cells with unique cell surface phenotype and tissue distribution. *Immunology*, 92: 340-5.
55. Mallard BA, Dekkers JC, Ireland MJ, Leslie KE, Sharif S, Vankampen CL, Wager L and Wilkie BN, 1998. Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. *J Dairy Sci*, 81: 585-95.
56. Meglia GE, Johannisson A, Petersson L and Persson Waller K, 2001. Changes in some blood micronutrients, leukocytes and neutrophil expression of adhesion molecules in periparturient dairy cows. *Acta Vet Scand*, 42: 139-50.
57. Morein B, Lövgren Bengtsson K, Rönnberg B, Sjölander A and Villacres-Eriksson M, 1995. Immunostimulating complexes. *Clin Immunother*, 3: 461-75.
58. Nagahata H, Ogawa A, Sanada Y, Noda H and Yamamoto S, 1992. Peripartum changes in antibody producing capability of lymphocytes from dairy cows. *Vet Q*, 14: 39-40.
59. Nickerson SC, Baker PA and Trinidad P, 1989a. Local immunostimulation of the bovine mammary gland with interleukin-2. *J Dairy Sci*, 72: 1764-73.
60. Nonnecke BJ and Harp JA, 1989. Function and regulation of lymphocyte-mediated immune responses: relevance to bovine mastitis. *J Dairy Sci*, 72: 1313-27.
61. Nonnecke BJ and Kehrli ME Jr, 1985. Isolation of mononuclear cells from bovine milk by continuous-flow and density gradient centrifugation: response of cells to mitogens. *Am J Vet Res*, 46: 1259-62.
62. Outteridge PM and Lee CS, 1988. The defence mechanisms of the mammary gland of domestic ruminants. *Prog Vet Microbiol Immun*, 4: 165-96.
63. Paape MJ, Wergin WP, Guidry AJ and Pearson RE, 1979. Leukocytes - second line of defence against invading mastitis pathogens. *J Dairy Sci*, 62: 135-53.
64. Paape MJ, Shafer-Weaver K, Capuco AV, Van Oostveldt K and Burvenich C, 2000. Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells. *Adv Exp Med Biol*, 480: 259-77.
65. Park YH, Fox LK, Hamilton MJ and Davis WC, 1992. Bovine mononuclear leukocyte subpopulation in peripheral blood and mammary gland secretion during lactation. *J Dairy Sci*, 75: 998-1006.
66. Park YH, Fox LK, Hamilton MJ and Davis WC, 1993. Suppression of proliferative response of BoCD4⁺ T lymphocytes in the mammary gland of cows with *Staphylococcus aureus* mastitis. *Vet Immunol Immunopathol*, 36: 137-51.
67. Politis I, Zhao X, McBride BW and Burton JH, 1992.



X Congreso Latinoamericano de Buiatría
XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría

- Function of bovine mammary macrophages as antigen-presenting cells. *Vet Immunol Immunopathol*, 30: 399-410.
68. Saad AM and Åström G, 1988. Effects of exogenous estrogen administration to ovariectomized cows on the blood and milk-leukocyte counts and -neutrophil phagocytosis measured by flow cytometry. *Zentralbl Veterinarmed [B]*, 35: 654-63.
69. Saad AM and Östensson K, 1990. Flow cytofluorometric studies on the alteration of leukocyte populations in blood and milk during endotoxin-induced mastitis in cows. *Am J Vet Res*, 51: 1603-7.
70. Saad AM, Concha C., Åström G. 1989. Alteration in neutrophil phagocytosis and lymphocyte blastogenesis in dairy cows around parturition. *J. Vet Medicine*, 36, 337-345
71. Sandholm M and Korhonen H, 1995. Antibacterial defence mechanisms. In: The bovine udder and mastitis. M Sandholm, M Honkonen-Buzalski, L Kartinen, S Pyörälä (Eds). University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine, Helsinki, Finland, 1995, pp 37-48.
72. Scaglione F, Cogo Rebecka, Cocuzza C, Arcidiacono M and Beretta A, 1994. Immunomodulatory effects of *Panax ginseng* CA Meyer (G115) on alveolar macrophages from patients suffering with chronic bronchitis. *Int J Immunotherapy*, X, 21-4.
73. Scaglione F, Cattaneo G, Alessandria M and Cogo R, 1996. Efficacy and safety of the standardised *Ginseng* extract G115 for potentiating vaccination against the influenza syndrome and protection against the common cold [corrected] *Drugs Exp Clin Res*, 22: 65-72.
74. Scaglione F, Ferrara F, Dugnani S, Falchi M, Santoro G and Fraschini F, 1990. Immunomodulatory effects of two extracts of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Drugs Exp Clin Res*, 16: 537-42.
75. Schore CE, Osburn BI, Jasper DE and Tyler DE, 1981. B- and T-lymphocytes in bovine mammary gland: Rosette formation and mitogen response. *Vet Immunol Immunopathol*, 2: 561-69.
76. Shafer-Weaver KA, Pighetti GM and Sordillo LM, 1996. Diminished mammary gland lymphocyte functions parallel shifts in trafficking patterns during the postpartum period. *Proc Soc Exp Biol Med*, 212: 271-80.
77. Shafer-Weaver KA, Corl CM and Sordillo LM, 1999. Shifts in bovine CD4⁺ subpopulations increase T-helper-2 compared with T-helper-1 effector cells during the postpartum period. *J Dairy Sci*, 82: 1696-706.
78. Smits E, Burvenich C, Guidry AJ, Heyneman, R and Massart-Leën A, 1999. Diapedesis across mammary epithelium reduces phagocytic and oxidative burst of bovine neutrophils. *Vet Immunol immunopathol*, 68: 169-76.
79. Solo'veva TF, Besednova NN, Uvarova NT, 1989. Phagocytosis stimulating effect of polysaccharides isolated from ginseng tissue culture. *Antibiot Khimioter* 34, 755-60.
80. Song ZJ, Johansen HK, Faber V, Hoiby N, 1997. Ginseng treatment enhances bacterial clearance and decreases lung pathology in athymic rats with chronic *Pseudomonas aeruginosa*. *APMIS* 105: 438-44.
81. Song ZJ, Kharazmi A, Wu H, Faber V, Moser C, Johansen HK, Rygaard J, Hoiby N, 1998. Effects of ginseng treatment on neutrophil chemiluminescence and immunoglobulin G subclasses in a rat model of chronic *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Clin Diagn Lab Immunol* 11: 882-87.
82. Sordillo LM and Nickerson SC, 1988. Morphologic changes in the bovine mammary gland during involution and lactogenesis. *Am J Vet Res*, 49: 1112-20.
83. Sordillo LM and Babiuk LA, 1991a. Modulation of bovine mammary neutrophil function during the periparturient period following in vitro exposure to recombinant bovine interferon-gg. *Vet Immunol Immunopathol*, 27: 393-402.
84. Sordillo LM and Babiuk LA, 1991b. Controlling acute *Escherichia coli* mastitis during the periparturient period with recombinant bovine interferon gg. *Vet Microbiol*, 28: 189-98.
85. Sordillo LM and Scott NL, 1995. Alternative approaches for the prevention and treatment of mastitis. *The Bovine Proceedings*, 27:54-60.
86. Sordillo LM, Redmond MJ, Campos M, Warren L and Babiuk LA, 1991b. Cytokine activity in bovine mammary gland secretions during the periparturient period. *Can J Vet Res*, 55: 298-301.
87. Sordillo LM, Shafer-Weaver K and DeRosa D, 1997. Immunobiology of the mammary gland. *J Dairy Sci*, 80: 1851-65.
88. Targowski SP, 1983. Role of immune factors in protection of mammary gland. *J Dairy Sci*, 66: 1781-9.
89. Targowski SP and Niemialowski M, 1986. Inhibition of lacteal leukocyte phagocytosis by colostrum, nonlactating secretion, and mastitic milk. *Am J Vet Res*, 47: 1940-5.
90. Targowski SP and Niemialowski M, 1988. Cytotoxic and blocking effect of bovine colostrum. *Zentralbl Veterinarmed [B]*, 35: 96-104.
91. Taylor BC, Dellinger JD, Cullor JS and Stott JL, 1994. Bovine milk lymphocytes display the phenotype of memory T cells and are predominantly CD8⁺. *Cell Immunol*, 156: 245-53.
92. Taylor BC, Keefe RG, Dellinger JD, Nakamura Y, Cullor JS and Stott JL, 1997. T cell populations and cytokine expression in milk derived from normal and bacteria-infected bovine mammary glands. *Cell Immunol*, 182: 68-76.
93. Tizard IR, 1996. *Veterinary Immunology* (fifth Edition). WB Saunders Company Philadelphia.
94. Unanue ER, 1984. Antigen-presenting function of the macrophage. *Annual Reviews of Immunology*, 2: 235-48.
95. Walters WR, Harp JA and Nonnecke BJ, 1995. Phenotypic analysis of peripheral blood lymphocytes and intestinal intra-epithelial lymphocytes in calves. *Vet Immunol Immunopathol*, 48: 249-56.
96. Van Kampen C, Mallard BA and Wilkie BN, 1999. Adhesion molecules and lymphocyte subsets in milk and blood of periparturient Holstein cows. *Vet Immunol Immunopathol*, 69: 23-32.
97. Wells PW, Burrells C and Martin WB, 1977. Reduced mitogenic responses in cultures of lymphocytes from newly calved cows. *Clin Exp Immunol*, 29: 159-61.
98. Wu S, Hua ZJ, Xiao YL, 1991. Effect of ginseng polypeptide on the ³H-thymidine integration of human blood lymphocytes. *Chin Med J* 104: 399-401.
99. Yamaguchi T, Hiratsuka M, Asai K, Kai K and Kumagai K, 1999. Differential distribution of T lymphocyte subpopulations in the bovine mammary gland during lactation. *J Dairy Sci*, 82: 1459-64.
100. Yang G and Yu Y, 1990. Immunopotentiating effect of traditional Chinese drug - ginseng and glycyrrhiza polysaccharides. *Proc Chin Acad Med Sci, Peking Union Med Coll*, 5: 185-93.
101. Yang TJ, Mather JF and Rabinovsky ED, 1988. Changes in subpopulations of lymphocytes in peripheral blood, and supramammary and prescapular lymph nodes of cows with mastitis and normal cows. *Vet Immunol Immunopathol*, 18: 279-85.
102. Yang TJ, Gawlak SL, Ports WC and Daniels WH, 1990. Antibody-forming cells in the contralateral and ipsilateral lymph nodes draining the locally immunized supramammary/suprainguinal region. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 13: 7-12.
103. Yang TJ, Ayoub IA and Rewinski MJ, 1997. Lactation stage-dependent changes of lymphocyte subpopulations in mammary secretions: inversion of CD4⁺/CD8⁺ T cell ratios at parturition. *Am J Reprod Immunol*, 37: 378-83.