

# **Determinación de biomarcadores moleculares en leche y su posible aplicación en el diagnóstico y tratamiento de la mastitis bovina \***

## **Molecular biomarkers in determination of milk and its potential application in the diagnosis and treatment of bovine mastitis**

**CAGGIANO N<sup>1</sup>; BOTTINI J.M<sup>1</sup>; LORENZO SMIRNOFF A<sup>1</sup>; DE SIMONE E.A<sup>1</sup>; CHIAPPE BARBARÁ M.A<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup> Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Cátedra de Fisiología Animal

\*Premio Estímulo a la Investigación Científica 2015 (Resolución CD N° 3055/17). Categoría: Graduados de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires.

### **RESUMEN**

La mastitis es la patología con mayor morbilidad y mortalidad dentro de los rodeos lecheros, afectando seriamente a la producción láctea y la calidad de la leche. Es por eso que en este trabajo se evaluó la actividad de las Metaloproteasas 2 y 9, involucradas en la degradación de la matriz extracelular, en leche de vacas y vaquillonas con mastitis clínica y subclínica y en animales sanos. Se evaluaron también distintas fracciones proteicas y la actividad caseinolítica total. Las fracciones proteicas se evaluaron mediante SDS-PAGE y a actividad de las Metaloproteasas 2 y 9 fue evaluada mediante zimografía al igual que la actividad caseinolítica total. Los resultados arrojaron en la actividad caseinolítica total diferencias significativas entre el grupo *Streptococcus* spp. y los grupos subclínicas y sanas ( $p < 0.05$ ), y también se observaron diferencias significativas en cuanto a la caseína total entre los mismos grupos ( $p < 0.01$ ). Si bien las Metaloproteasas 2 y 9 en las mastitis clínicas se encontraron aumentadas las mismas no presentaron diferencias significativas.

**Palabras clave:** (mastitis), (metaloproteasas), (caseína).

Correspondencia e-mail: Nicolás Caggiano [ncaggiano@fvet.uba.ar](mailto:ncaggiano@fvet.uba.ar)

Fecha de recepción: 30-09-2016

Fecha de aceptación: 05-09-2017

## SUMMARY

Mastitis is a disease with increased morbidity and mortality within dairy herds, seriously affecting milk production and milk quality. That's why in this work the activity of Metalloproteinase 2 and 9, from milk of cows and heifers with subclinical and clinical mastitis and in healthy animals was evaluated. Total protein fractions and different caseinolytic activity were also evaluated. The activity of Metalloproteinase 2 and 9 was assessed by zymography as caseinolytic activity and total protein fractions by SDS-PAGE. The results showed a large increase in the activity of Metalloproteinase 2 and 9 in clinical mastitis compared with subclinical and healthy animals, these results were not significant due to the large standard deviation due to the large variability among pathogens within the groups. Significant differences were found between the group *Streptococcus* spp. and sub-clinical and healthy groups in terms of total caseinolytic activity ( $p < 0.05$ ), and significant differences were observed in terms of total casein in the same groups ( $p < 0.01$ ).

**Key words:** (mastitis), (metalloproteinases), (caseine).

## INTRODUCCIÓN

La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria, generalmente derivada una infección microbiana primaria. Es la patología con mayor morbilidad y mortalidad dentro de los rodeos lecheros, afectando seriamente a la producción láctea<sup>7</sup>. En Estados Unidos, país con altos estándares productivos, la morbilidad por mastitis es del 14,86%, la mortalidad es 16,3% y los rechazos generales a causa de mastitis y patologías mamarias son del 24,56%<sup>24</sup>. En Francia, en un reporte bianual realizado en 205 rodeos lecheros la incidencia de mastitis clínica y subclínica resultó, respectivamente, del 44.1% y el 26.6%<sup>6</sup>. Y por otra parte la Swedish Dairy Association en 2011 informó una incidencia de mastitis clínica del 17.3 % y que 2/3 de los animales en lactancia presentaron mastitis subclínicas<sup>22</sup>. Aparentemente estos porcentajes se mantienen constantes a través de los años<sup>14</sup>. Es así que las pérdidas económicas a consecuencia de la mastitis en los rodeos lecheros son muy importantes en todo el mundo y las consecuencias en el manejo del rodeo lechero afectado presenta características recidivantes y con presentaciones diversas de la enfermedad que muchas veces enmascaran el cuadro clínico. La mastitis no solo disminuye la producción láctea de los animales afectados, sino que también aumenta la cantidad de leche que se descarta por mala calidad, incrementa los costos

veterinarios y genera el rechazo prematuro de animales del tambo<sup>1, 5, 15</sup>.

Las mastitis pueden ser caracterizadas de diversas maneras y su clasificación facilita el diagnóstico y el tratamiento. Según el punto de vista clínico las mismas pueden clasificarse en clínicas y subclínicas. Las mastitis clínicas pueden ser diagnosticadas mediante la observación directa de la glándula mamaria y por las modificaciones macroscópicas de la secreción láctea. Las mastitis subclínicas en cambio no presentan signos clínicos pero mediante el Conteo de Células Somáticas (CCS) se define su diagnóstico. En la Argentina, los agentes etiológicos más frecuentemente aislados en las mastitis clínicas como en las subclínicas son *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. y *Escherichia coli*<sup>3</sup>. Respecto a la incidencia de las mastitis subclínicas debe destacarse que son ellas las de mayor presentación en los rodeos lecheros y aproximadamente un 20 a 50% de las vacas en ordeño están afectadas en las explotaciones intensivas<sup>18</sup>. Esta situación conlleva a grandes pérdidas económicas ya que el costo de tener un animal con mastitis subclínica se eleva en un 70%, no solo debido a su menor producción láctea y pérdida de componentes lácteos, sino también por el daño asociado del tejido glandular, que en algunos casos es irreversible aún después del tratamiento y lleva al descarte

temprano del animal<sup>16</sup>. Anualmente a nivel mundial se pierden más de 500.000 millones de dólares a causa de las mastitis subclínicas<sup>4,17</sup>.

El proceso inflamatorio generado durante las mastitis produce la liberación de proteasas, como por ejemplo metaloproteasas (MMPs). Las MMPs son una familia de endopeptidasas dependientes de zinc encargadas del normal remodelado de la matriz extracelular de los distintos tejidos del organismo<sup>20</sup>. Esta familia de proteasas a su vez se dividen en cinco subfamilias según la sustancia que degraden: colagenasa, gelatinasa, estromalisina, metaloproteasa de membrana y la quinta subfamilia es un grupo diverso de enzimas que no han podido ser incluidas en los grupos anteriores<sup>2</sup>. Las MMP más estudiadas son las gelatinasas como la MMP-2 y la MMP-9, que en su rol fisiológico, principalmente, favorecen la migración de los polimorfonucleares hacia el sitio del foco infeccioso. Normalmente, el daño en la matriz extracelular provocado por el agente etiológico primario suele ser reparado post tratamiento, reconstituyéndose las funciones previas del tejido así como su estructura. Pero en el caso que el daño sea de gran magnitud o que la inflamación se presente de manera reiterativa y continua las MMPs juegan un rol preponderante en la fisiopatología de los procesos mastíticos, especialmente en su presentación recidivante, siendo la inhibición de las MMPs una propuesta terapéutica interesante para frenar el inflamatorio reiterado de la mastitis<sup>12</sup>.

Más allá del daño tisular que puede provocar el desbalance en la actividad fisiológica de estas enzimas encargadas del remodelado de la matriz, hay que considerar que la afección de la glándula mamaria, redundará en una menor secreción láctea con alteración de la calidad proteica de dicha secreción. Esto conlleva a que se vea perjudicada la industria lechera ya que no solo disminuyen los litros de leche sino también su calidad es menor con el impacto que esto genera en el producto final de la cadena láctea. Es por eso que resulta interesante la determinación de la actividad proteolítica total de la leche para evaluar los procesos enzimáticos que se producen

dentro de la glándula mamaria de un animal infectado tanto clínica como subclínicamente y las consecuencias que esto trae aparejado en la calidad de componentes proteicos de la secreción láctea.

Actualmente no se cuenta con amplia información sobre el rol de las distintas proteasas en la fisiopatología de los procesos mastíticos clínicos, subclínicos y recidivantes y tampoco sobre el impacto que el aumento de las MMPs tiene tanto sobre la salud de la glándula mamaria como de la calidad de la composición de la leche. Este trabajo plantea el estudio del rol de las MMPs en la fisiopatología de las mastitis y sus posibles variaciones según el cuadro y agente etiológico presente así como establecer su valor predictivo en el estudio de la alteración de las distintas fracciones proteicas de la leche de interés para la industria. Y se plantea a futuro el uso de inhibidores de MMPs en el tratamiento de las mastitis recidivantes y negativas a microorganismos patógenos, a fin de evitar en los protocolos el uso indiscriminado de antibióticos. Como objetivos nos propusimos evaluar la actividad de las MMPs 2 y 9 así como la actividad caseinolítica total de leches provenientes de animales con mastitis clínicas y subclínicas. Identificar diferencias en la actividad de proteasas entre los principales agentes etiológicos de las mastitis clínicas. Evaluar la correlación entre los niveles de proteasas y las distintas fracciones de caseína y la concentración de proteínas de alto peso molecular.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron 120 muestras de leche de vacas y vaquillonas provenientes de distintos tambos de la Provincia de Buenos Aires, los animales fueron divididos en 5 grupos: sanas (1), mastitis clínicas infectadas por *Escherichia coli* (2), *Staphylococcus aureus* (3), *Streptococcus spp.* (4) y mastitis subclínicas (5). Se realizó en las muestras de leche, el correspondiente cultivo bacteriológico, recuento de células somáticas mediante la tinción de Newman-Lampert y su posterior recuento en cámara de Neubauer. La determinación de las MMP-2 y 9 se efectuó

mediante el método zimográfico descripto por Gruber *et al.*, utilizando un SDS-PAGE con 10% de acrilamida y 0,2% de gelatina porcina<sup>8</sup>. Luego de la electroforesis, los geles se lavaron con 50mM Tris-HCL pH7.5 con Triton X-100 por 45 minutos y luego con una solución de 5mM CaCl<sub>2</sub>, 1uM ZnCl<sub>2</sub>, 50mM Tris-HCL pH7.5 con 2,5% de Triton X-100 por otros 45 minutos. Posteriormente los geles se incubaron en una solución 50mM Tris-HCL, 10 mM CaCl<sub>2</sub> y 200mM NaCl pH7.5 a 37°C por 24hs. Luego los geles se colorearon con azul brillante de Coomassie R-250 0,2% por 2 hs y se decoloraron con solución decolorante (25% isopropanol con 10% ácido acético). Los controles de inhibición se realizaron con 5mmol/l de EDTA. El estudio de las bandas generadas por la actividad gelatinolítica se realizó por densitometría utilizando el software Image J (National Institutes of Health, Maryland, USA).

En la determinación de la actividad caseinolítica total también se realizó un SDS-PAGE con 10% de acrilamida y 0,2% de caseína bovina, luego de la electroforesis se realizaron los geles y se lavaron con las mismas soluciones que para la determinación de las MMP-2 y 9, la única diferencia fue que el período de incubación de la última solución fue de 48 horas<sup>21</sup>. Luego se les realizó el mismo estudio densitométrico utilizado en la determinación de la actividad de la MMP-2 y 9. Para la evaluación de las proteínas en leche se realizó un SDS-PAGE en un gel con 12% de acrilamida, las muestras se combinaron con buffer y se le agregó 2- Mercaptoetanol. Luego de la electroforesis los geles se colorearon y se decoloraron de la misma manera que en la zimografía<sup>23</sup>. Para calcular la concentración de cada fracción proteica primero se determinó la concentración de proteínas totales de la leche mediante la utilización del kit Proti 2 (Wiener lab., Argentina).

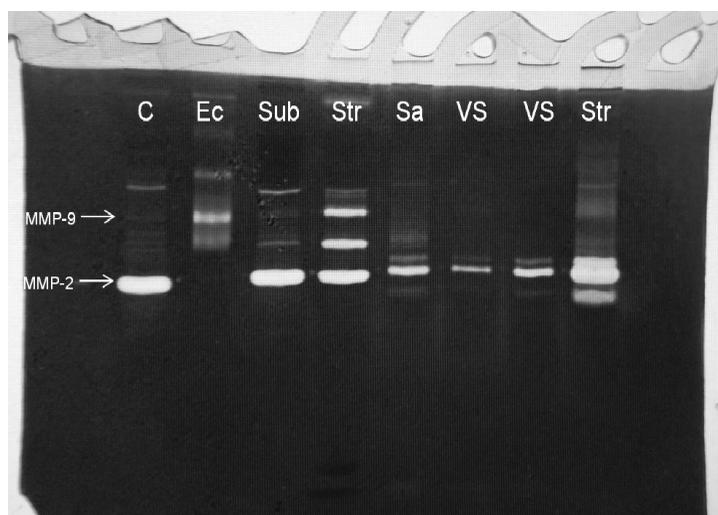
Para el estudio estadístico se calculo los valores medios y desvío standard (DS) de las variables en estudio. Se usó ANOVA para comparar las variables en estudio de los distintos

grupos en los casos en los que la distribución no fue gaussiana se utilizo análisis Kruskal-Wallis Test (ANOVA no paramétrico). Se consideró significativo un efecto si el nivel de significación resulto  $p \leq 0.05$ . A aquellos parámetros que presentaron diferencias significativas entre los grupos mediante el ANOVA se estableció la diferencia intergrupos con el test de Tukey de comparaciones múltiples.

## RESULTADOS

En relación a la actividad de MMP-2, ésta aumentó levemente en la leche de animales con mastitis por *S. aureus* y manifiestamente en los animales infectados por *E. coli* y *Streptococcus spp* respecto a los valores observados en las vacas sanas ( $41.09 \pm 16.59$ ) (expresado en % del control estándar interno); sin embargo, la diferencia en los valores medios de estos grupos resultó no significativa ( $P > 0,05$ ) a consecuencia del gran desvío estándar en los grupos con *E. coli* ( $489.43 \pm 1747.29$ ), *Streptococcus* ( $2112.77 \pm 4651.35$ ) y *S. aureus* ( $169.31 \pm 380.29$ ). Cabe destacar que en el grupo subclínicos los valores hallados fueron similares a los del grupo de sanas ( $29.64 \pm 14.30$ ) y en el grupo de cultivos negativos con síntomas clínicos su valor medio y desvío estándar fue similar al del grupo *S. aureus* ( $290.66 \pm 612.53$ ).

Respecto a la actividad de la MMP-9 en la leche de los animales sin antecedentes de mastitis, grupo *sanas*, esta proteasa no presentó actividad observándose valores cercanos a cero. En los casos de mastitis por *S. aureus* la MMP-9 se elevó mínimamente ( $4.24 \pm 5.93$ ) (% del control estándar de actividad), y en cambio en aquellos casos por *E. coli* ( $1292.85 \pm 2839.33$ ) y *Streptococcus spp* ( $5251.59 \pm 6091.32$ ), al igual que para MMP-2, el aumento fue manifiesto. En el grupo cultivo negativo con síntomas clínicos la MMP-9 se encontró muy elevada ( $4812.47 \pm 8411.1$ ) en cambio en el grupo subclínicas en el 50 % de las muestras no pudo detectarse y en el resto los valores individuales fueron bajos (FOTO 1).



**Foto 1.** Zimografía de gelatina donde se aprecia la actividad gelatinolítica de las MMP-2 (70 kDa) y 9 (92 kDa). Control (C), E. coli (Ec), Subclínica (Sub), Streptococcus spp (Str), S. aureus (Sa) y vacas sanas (VS).

En cuanto a la actividad caseinolítica total (expresada en % respecto del control estándar) de las muestras analizadas se observó gran actividad en las muestras correspondientes a animales infectados por *Streptococcus spp*, ( $155.89 \pm 190.14$ ) y en el grupo negativo con signos clínicos ( $177.93 \pm 182.70$ ) que presentaron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) respecto del grupo subclínico ( $66.72 \pm 100.94$ ) y al grupo de sanas ( $58.82 \pm 107$ ) (Fig. 1A).

Respecto a la caseína total y sus distintas fracciones se observó una disminución en la concentración de caseína total entre el grupo de animales infectados por *Streptococcus spp* respecto del grupo sanas y subclínicas ( $p < 0.01$ ) (Fig. 1B). En los niveles de alfa y beta caseína

se observó el mismo patrón de disminución observado para la caseína total en las mastitis clínicas, sin diferencias significativas (Fig. 2A y 2B). Pero respecto a la kappa caseína, de gran interés en la industria quesera, vemos que está presente en todos los animales sanos, pero cuando observamos los grupos de mastitis clínicas entre el 40 y el 60% de los animales afectados no contienen esta fracción de la caseína, según el agente etiológico que la genere (Fig. 3A). En lo que respecta a proteínas de alto peso molecular (mayores a 150 kDa) se vio que también los animales infectados por *Streptococcus spp* tenían elevados los niveles de estas proteínas en comparación con el resto de los grupos ( $P < 0.05$ ) (Fig. 3B).

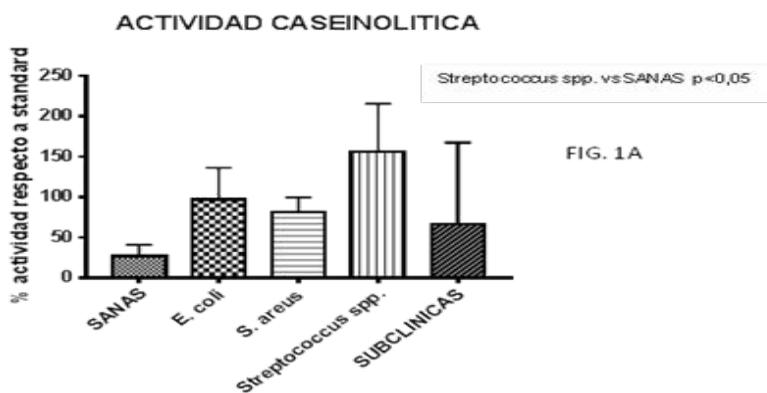
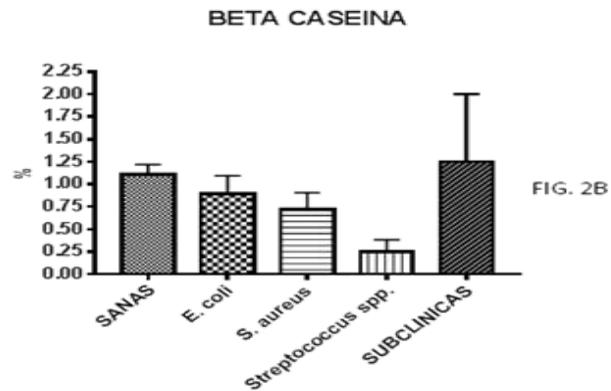
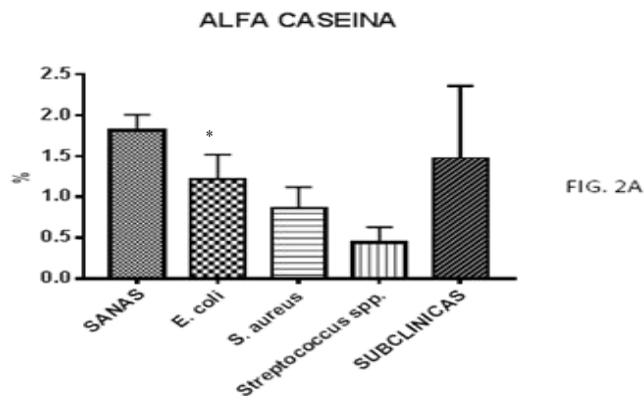
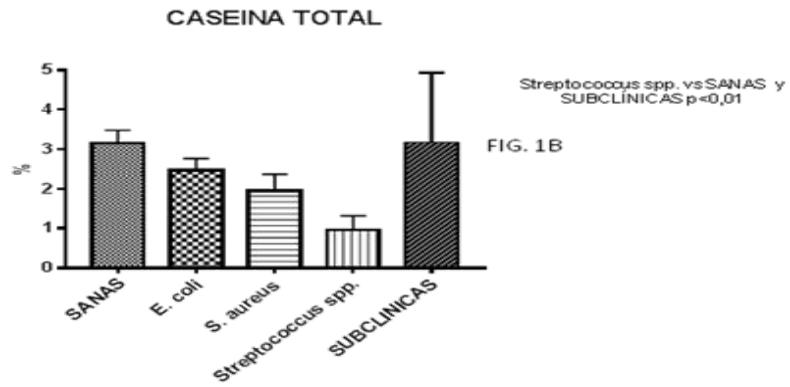
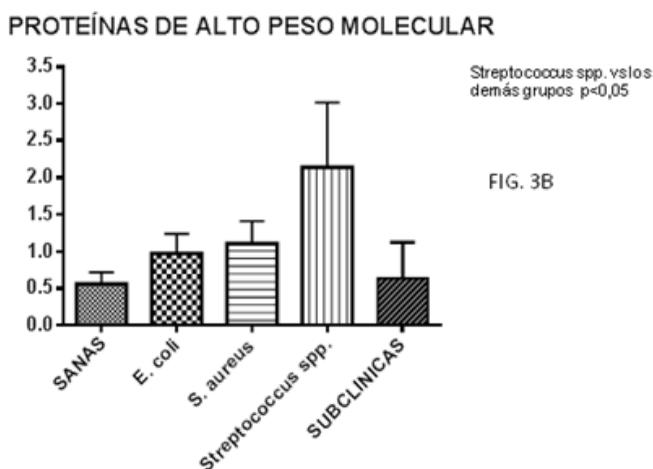
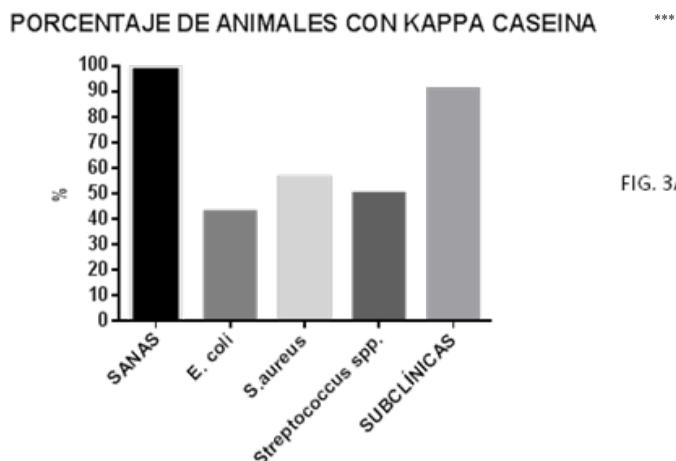


FIG. 1A





## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este trabajo planteamos la importancia de la determinación de las MMP-2 y 9 en la leche en el estudio de la fisiopatología de las mastitis clínicas, hemos determinado un marcado aumento de ambas principalmente en los animales infectados *E. coli* y *Streptococcus spp*<sup>19</sup>. Nuestros resultados de la actividad de MMP 2 y 9 en las mastitis bovinas presentan concordancia con los documentados en la escasa bibliografía internacional. Sin embargo, corresponde resaltar que en nuestra experiencia se trabajó con animales insertos en esquemas productivos a campo y en cambio la mayoría

de los trabajos a nivel mundial los resultados provienen de animales destinados únicamente a la experimentación. Por otro lado el incremento de la actividad caseinolítica es coincidente con la presencia de estos mismos agentes etiológicos, *E. coli* y *Streptococcus spp*. Principalmente se observó diferencia significativa en los animales infectados por *Streptococcus spp* respecto al grupo sanas ( $p < 0,05$ )<sup>9, 10</sup>. En concordancia con lo dicho previamente los niveles de caseína total son menores en el grupo de animales infectados con *Streptococcus spp*. observándose diferencias significativas con los grupos de animales sanos y subclínicos ( $p < 0,01$ ). Es decir que hay

una asociación entre una elevada actividad caseinolítica y una menor concentración de caseína en las muestras provenientes de los animales afectados por *Streptococcus spp.*, en trabajos futuros habría que determinar qué rol tendrían las MMPs en la degradación de esta proteína tan importante para la industria quesera ya que la mayoría de los trabajos publicados hablan de la plasmina como la principal encargada de esta acción catabólica<sup>11</sup>. En cuanto a las proteínas de alto peso molecular solamente se observó diferencia significativa en los animales infectados por *Streptococcus spp.* ( $p < 0.05$ ) lo cual plantea una interesante alternativa para el diagnóstico de este agente etiológico<sup>13</sup>.

Para concluir podemos decir que los niveles de MMP-2 y 9 en la leche de vacas con mastitis permitirían valorar el daño de la matriz extracelular de la glándula mamaria, ya que los animales de los grupos de mastitis clínica infectados con *Streptococcus spp.* y *E. coli* presentan valores muy elevados de actividad aunque los resultados no son significativos debido al gran desvío estándar de estos grupos. Por otro lado determinación de las MMP-2 y 9 en asociación con la evaluación de la actividad caseinolítica total y de las distintas fracciones de la caseína puede ser útil en la valoración de la salud a futuro de la glándula mamaria y de la calidad de la secreción láctea así como en la toma de decisión para el descarte o no de un animal afectado. Por lo tanto la inhibición de las proteasas en los procesos mastíticos se presenta como una terapia coadyuvante a la antibioticoterapia que podría disminuir el daño tisular y mejorar la calidad de la leche.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bar, D.; Tauer, LW.; Bennett, G.; *et al.* The Cost of Generic Clinical Mastitis in Dairy Cows as Estimated by Using Dynamic Programming. *Journal of Dairy Science* 2008 Vol. 91 No. 6.
- Burrage, PS.; Mix, KS.; Brinckerhoff, CE. Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci.* 2006 11:529-43.
- Calvinho, LF. y Tirante, L. Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años. *FAVE Sección Ciencias Veterinarias* 2005 Vol 4, No 1/2.
- Edmondson, PW.; and Bramley, AJ. Mastitis. 2004 Chapter 23: 326-337. *Bovine Medicine Diseases and Husbandry of Cattle. Second edition.* by Blackwell Science Ltd.
- Fetrow, J. Mastitis: an economic consideration. In *Proceedings: 39th Annual Conference National Mastitis Council*, pp. 3–47. Atlanta, GA, 2000 February 13–16.
- Fourichon, C.; Beaudeau, F.; Bareille, N.; Seegers, H. Incidence of health disorders in dairy farming systems in western France. *Livestock Production Science* 68 (2001) 157–170.
- Gröhn, YT.; Eicker, SW.; Ducrocq, V. and Hertel, JA. Effect of Diseases on the Culling of Holstein Dairy Cows in New York State. *Journal of Dairy Science* 1998 81:966–978.
- Gruber, BL.; Sorbi, D.; French, DL.; Marchese, MJ.; Nuovo, GJ.; Kew, RR. Markedly elevated serum MMP-9 (gelatinase B) levels in rheumatoid arthritis: a potentially useful laboratory marker. *Clin Immunol Immunopathol*; 1996 78: 161–71.
- Haddadi, K.; Moussaoui, F.; Hebia, I.; Laurent, F.; Le Roux, Y. E. coli proteolytic activity in milk and casein breakdown. *Reprod. Nutr. Dev.* 45 2005 485–496.
- Haddadi, K.; Prin-Mathieu, C.; Moussaoui, F.; *et al.* Polymorphonuclear neutrophils and Escherichia coli proteases involved in proteolysis of casein during experimental E. coli mastitis. *International Dairy Journal* 2006 16:639–647.
- Ismail, B. and Nielsen, SS. Plasmin protease in milk: Current knowledge and relevance to dairy industry. *Journal of Dairy Science* 2010 Vol. 93 No. 11 4999-5009.
- Mehrzad, J.; Desrosiers, C.; Lauzon, K.; Robitaille, G.; Zhao, X. and Lacasse, P. Proteases Involved in Mammary Tissue Damage During Endotoxin-Induced Mastitis in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 2005 Vol. 88, No. 1.
- Mudaliar, M.; Tassi, R.; Thomas, FC.; *et al.* Mastitomics, the integrated omics of bovine milk in an experimental

- model of *Streptococcus uberis* mastitis: 2. Label-free relative quantitative proteomics. *Mol. BioSyst.*, 2016, 12, 2748.
- Nielsen, C. and Emanuelson, U. Mastitis control in Swedish dairy herds. *Journal of Dairy Science* 2013 Vol. 96 No. 11.
- Olde Riekerink, RGM.; Barkema, HW.; Kelton, DF. and Scholl, DT. Incidence Rate of Clinical Mastitis on Canadian Dairy Farms. *Journal of Dairy Science* 2008 Vol. 91 No. 4.
- Oliver, SP. and Calvinho, LF. Influence of inflammation on mammary gland metabolism and milk composition. *J. Anim.Sci.* 1995 73(Suppl. 2):18–33.
- Ott, S. Costs of herd - level production losses associated with subclinical mastitis in US Dairy Cows. In Proceedings: 38th Annual meeting of National Mastitis Council, pp. 152 – 156. Arlington VA, 1999.
- Pitkala, AM.; Haveri, S.; Pyorala, V. and Honkanen-Buzalski, T. Bovine mastitis in Finland 2001—Prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *Journal of Dairy Science* 2004 87:2433–2441.
- Raulo, SM.; Sorsa, T.; Tervahartiala, T.; *et al.* Increase in milk metalloproteinase activity and vascularpermeability in bovine endotoxin-induced and naturally occurring *Escherichia coli* mastitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2002 85 137-145.
- Reynolds JJ. Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation. *Oral Dis.* 1996 Mar;2(1):70-6.
- Snoek-van Beurden, PAM. and Von den Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *BioTechniques* 2005 38:73-83.
- Swedish Dairy Association. Husdjursstatistik 2011. *Swedish Dairy Association, Stockholm, Sweden* 2011.
- Urech, E.; Puhari, Z. and Schallibaum, M. Changes in Milk Protein Fraction as Affected by Subclinical Mastitis. *Journal of Dairy Science* 1999 82:2402–2411.
- USDA. Dairy 2007, Part II: Changes in the U.S. dairy cattle industry, 1991 – 2007. USDA - APHIS - VS, CEAH Fort Collins, CO.

