

Biomarcadores moleculares en mastitis bovina

Molecular biomarkers in bovine mastitis

CAGGIANO, N¹; DE SIMONE, E¹.

¹Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Cátedra de Fisiología Animal

RESUMEN

La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria, generalmente derivada de una infección microbiana. Es la patología con mayor morbilidad y mortalidad dentro de los rodeos lecheros, afectando la producción láctea y la rentabilidad de los tambos. Además, si el proceso es muy grave o perdura en el tiempo genera daños muchas veces irreversibles en la glándula mamaria. Es por eso que, además del recuento de células somáticas, y el análisis del perfil proteico, la evaluación de marcadores moleculares relacionados con la inflamación resulta de interés para el diagnóstico temprano, control y pronóstico de la enfermedad. Marcadores moleculares como las metaloproteasas (MMPs), lactato deshidrogenasa (LDH), N-Acetil-β-D-Glucosaminidasa (NAGasa), Beta glucuronidasa y los glicosaminoglicanos (GAGs) también se encuentran relacionados con la enfermedad mamaria. Algunos biomarcadores involucran proteasas que degradan la matriz extracelular como pueden ser las metaloproteasas 2 y 9 entre otras. Estas proteasas fisiológicamente están encargadas del normal remodelado de la matriz extracelular. Sin embargo, las proteasas 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. Las enzimas LDH, NAGasa y beta glucuronidasa son indicadores de inflamación dado que el incremento de su actividad se asocia con gránulos de lisosomales de leucocitos. Los GAGs son constituyentes de la matriz extracelular y podrían utilizarse como indicadores de sanidad mamaria, porque se mantienen constantes en leche a lo largo del proceso productivo de los animales sanos y se elevan ante procesos patológicos leves. El análisis y seguimiento de marcadores en vacas lecheras podrían ser un complemento importante de las pruebas convencionales para el diagnóstico y seguimiento de la sanidad de la glándula mamaria.

Palabras clave: (mastitis), (biomarcadores), (diagnóstico), (MMPs), (GAGs)

ABSTRACT

Mastitis is an inflammation of the mammary gland generally caused by a bacterial infection. It is the disease that has the highest morbidity and mortality within dairy herds, affecting milk production and the profitability of the dairy farms. Besides, if the process is severe or prolonged, it often causes irreversible damage to the mammary gland. In addition to the somatic cell count and profile protein analysis, the evaluation of molecular markers related to inflammation is of interest for the early diagnosis, control and prognosis of the disease. Molecular markers such as metalloproteinases (MMPs), lactate dehydrogenase (LDH), N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase (NAGase), Beta glucuronidase, and glycosaminoglycans (GAGs) are also related to udder disease. Some biomarkers involve proteases that degrade the extracellular matrix, such as metalloproteinases 2 and 9, among others. These proteases are physiologically responsible for the normal remodeling of the extracellular matrix. However, proteases play a preponderant role in the pathophysiology of mastitic processes, especially in their recurrent presentation, with the inhibition of MMPs being an interesting therapeutic proposal. The enzymes LDH, NAGase and beta glucuronidase are indicators of inflammation, since the increase in their activity is associated with leukocyte lysosomal granules. GAGs are constituents of the extracellular matrix and could be used as indicators of mammary health, because they remain constant in milk throughout the productive process of healthy animals and rise in light of mild pathological processes. The analysis and monitoring of markers in dairy cattle could be an important complement to conventional tests for the diagnosis and monitoring of the health of the mammary gland.

Key words: (mastitis), (biomarkers), (diagnosis), (MMPs), (GAGs)

INTRODUCCIÓN

La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria, generalmente derivada inicialmente de una infección microbiana. Es la enfermedad con mayor morbilidad y mortalidad dentro de los rodeos lecheros, afectando seriamente a la producción láctea²⁴.

Las mastitis pueden ser clasificadas de diversas maneras y su clasificación nos facilita el diagnóstico y tratamiento. Según el punto de vista clínico las mismas pueden clasificarse en: a. clínicas, que son fácilmente diagnosticables a través de la revisión de la glándula mamaria y de las modificaciones macroscópicas de la secreción láctea y b. subclínicas que sólo pueden ser determinadas a través del Conteo de Células Somáticas (CCS). En el primer caso, las mastitis clínicas se pueden clasificar en distintos grados según la intensidad en que se presenta la enfermedad: grado 1 cuando se ve afectada solo la secreción láctea, grado 2 si se ve afectada la secreción láctea y la glándula mamaria y grado 3 cuando se ve afectada la secreción láctea, la glándula mamaria y además hay signos sistémicos⁵⁴.

En Estados Unidos, país con altos estándares productivos, 99.7 % de los establecimientos, reportaron al menos un caso de mastitis. Asimismo 24,8 % de las vacas presentaron mastitis clínica⁶⁸. En Países Bajos el porcentaje de vacas que padecen mastitis clínicas es similar siendo del 28,1 %³⁹. En Argentina, distintos trabajos indicaron una prevalencia mucho menor de mastitis clínicas en tambos de la provincia de Córdoba de 2.5 %⁶¹ y 6,7 %⁶⁹. Mientras que la incidencia de mastitis subclínica informada en tambos de nuestro país fue de 53.9%¹⁷. Autores de distintos lugares del mundo reportaron incidencias de mastitis subclínicas entre un 20 a 50 % en rodeos lecheros de explotaciones intensivas y extensivas^{1,58,6}.

Los principales agentes etiológicos responsables, tanto de las mastitis clínicas como de las subclínicas, son los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus*, tomando mayor relevancia a nivel mundial *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)⁶². La prevalencia de organismos patógenos descripta por Neder y colaboradores en tambos de Argentina fue: *S. aureus* (42.60 %), *Streptococcus uberis*

(*Str. uberis*) (27.10 %), *Streptococcus dysgalactiae* (*Str. dysgalactiae*) (10.90 %) y *Streptococcus agalactiae* (*Str. agalactiae*) (4,70 %) ⁵⁰.

Las consecuencias económicas sobre el manejo del rodeo de esta enfermedad son muy importantes ya que la misma disminuye la producción láctea de los animales afectados, reduce la ingesta alimentaria, aumenta la cantidad de leche que se descarta por mala calidad, incrementa los costos veterinarios y genera el rechazo prematuro de animales del tambo ⁶⁷. Otra serie de estudios también asocian la mastitis con una disminución en la pérdida de eficiencia reproductiva en general ⁶⁵. Por otra parte, la mastitis provoca la merma de la calidad de los productos derivados de la leche siendo su prevención, diagnóstico y tratamiento un gran desafío para el profesional veterinario, especialmente en aquellos casos en que la enfermedad recidiva en forma insistente. Además, el uso repetitivo de antibióticos en la producción de bovinos debido a esta enfermedad contribuye al desarrollo de resistencia en especies microbianas causantes de mastitis ⁴².

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 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 ⁵³. Anualmente a nivel mundial se pierden más de 500.000 millones de dólares a causa de las mastitis subclínicas ^{55,18}. El diagnóstico de las mastitis subclínicas es variado e incluye métodos al pie de la vaca como el Test Mastitis California (TMC) y de conductividad eléctrica o métodos como el conteo de células somáticas (CCS) a través de contadores de células automáticos ^{64,33,3}.

A continuación, describiremos el método más utilizado a campo que es TMC que se fundamenta en la detección del incremento de las células somáticas y posteriormente desarrollaremos biomarcadores utilizados y en desarrollo para el diagnóstico de mastitis.

Test de Mastitis California y Conteo de Células Somáticas

Como se mencionó anteriormente las células somáticas en la leche disminuyen la calidad de esta. El conteo de células somáticas es un méto-

do indirecto de diagnóstico para las mastitis subclínicas, dado que el aumento de células somáticas se correlaciona directamente con la inflamación de la glándula mamaria.

Una forma práctica y rápida de estimar de forma semicuantitativa las células somáticas es mediante el Test de Mastitis California. Esta prueba consiste en disrumpir las membranas celulares permitiendo que el ADN de las células interactúe con el reactivo produciendo una gelificación que puede ser visualizada macroscópicamente.

EL CCS ya sea analizado de forma indirecta mediante el TMC o directa mediante citometría es una importante herramienta para el monitoreo de la sanidad de la glándula mamaria ¹⁰. Se considera que las vacas presentan mastitis subclínica cuando el recuento de las células somáticas en leche es mayor de $1 \text{ o } 2 \times 10^5$ células/ml ³⁸. Fisiológicamente, los leucocitos polimorfonucleares aumentan tras el destete y en la involución temprana, sin embargo, más tardíamente las células que aumentan son los macrófagos.

Una correcta rutina de ordeño, junto con pautas de control y monitoreo de los niveles de células somáticas, son cruciales para mantener la salubridad mamaria. Existen algunos estudios que plantean la administración de melatonina exógena por vía subcutánea para reducir el recuento de células somáticas en la leche, mejorando la actividad inmune de las vacas e incrementando sus niveles de IgG e IgM. ⁷¹.

Perfil de proteínas

El perfil de proteínas en leche puede ser analizado mediante SDS-PAGE (Figura 1). Durante el transcurso de los procesos de mastitis la integridad de la barrera hemato-láctea se ve afectada permitiendo el pasaje de proteínas séricas hacia la leche. Estas proteínas en los análisis electroforéticos se las refiere como proteínas de alto peso molecular para diferenciar de las proteínas lácteas como la caseína (fracciones alfa, beta y kappa), lactoalbúmina y lactoglobulina que poseen menos de 30kDa. La presencia de componentes séricos en la secreción láctea, así como la disminución de la caseína, está asociada a una menor calidad de la leche. En trabajos previos hemos observado que la proteína total en los procesos mastíticos no se ve significativamente afectada, sin embargo mediante el análisis densitométrico por SDS-PAGE hemos ob-

servado un aumento considerable de las proteínas de alto peso molecular y una caída importante de caseína principalmente la fracción kappa caseína, una de las más valoradas en la industria quesera⁹. Las proteínas que se encuentran clasificadas como de alto peso molecular incluyen a la lactoferrina, lactoperoxidasa, inmunoglobulina y albúmina sérica. Estas proteínas se encontrarían incrementadas en la leche debido al aumento de la permeabilidad vascular como consecuencia de los procesos inflamatorios^{49,63}. En animales con mastitis la kappa caseína se encuentra disminuida principalmente debido a la acción de proteasas que se encuentran incrementada en estos tipos de procesos²⁵.

S. aureus es un patógeno que secreta proteasas capaces de degradar las caseínas. Además, en bovinos, los cuartos afectados por *S. aureus* tienen un área alveolar más pequeña y un área estromal más grande en comparación con los cuartos sanos. Siendo que la sección infectada tiene una capacidad de síntesis reducida. Esta observación podría aplicarse a otras especies de rumiantes productores de leche⁴⁵.

Asimismo, durante los procesos inflamatorios, las enzimas implicadas en el proceso de síntesis de proteínas de la leche tienen una actividad menor⁵⁹.

Por otro lado, se ha visto que la cantidad de kappa caseína puede variar de un animal a otro. Esto responde a variaciones genéticas como han descrito Medrano y Aguilar-Córdova en vacas Holstein donde el alelo B de la kappa caseína está relacionado a un mayor rendimiento y calidad de esta proteína⁴⁷.

Metaloproteasas (MMPs)

Las metaloproteasas de matriz 2 y 9 (MMP-2 y MMP-9 respectivamente) son endopeptidasas dependientes de zinc que desempeñan un papel crucial en la degradación de la matriz extracelular, la inflamación y la remodelación tisular. Participando en procesos fisiológicos y patológicos. En los últimos años se ha visto que estas proteasas juegan un rol muy importante en la progresión de procesos tumorales y su actividad puede ser inhibida por quelantes de zinc^{57,70}. Todos los genes de las MMPs presentan una estructura modular altamente conservada⁵. Entre algunos procesos fisiológicos en los que participan las MMPs están el desarrollo embrionario, los procesos de remodelación y envejecimiento¹⁹. La principal fuente de MMPs son los leucocitos circulantes. Es por ello que las MMPs cumplen un rol central en el proceso de daño tisular como consecuencia de las mastitis.

Trabajos previos indican que las células somáticas en la leche secretada por vacas que sufren de mastitis presentan una alta actividad de MMPs^{7,9,2}. Li y colaboradores mostraron una correlación positiva entre el recuento de células somáticas en leche y la MMP-9, siendo además que la infección por *S. aureus* incrementaba de manera notoria la expresión de MMP-9 por las células epiteliales de los ductos mamarios⁴³. También, el incremento de la expresión de MMP-9 es un importante marcador de la infección mamaria por *E. coli*⁴⁴. A su vez, se ha demostrado que las MMPs 2 y 9 degradan la membrana basal y las proteínas

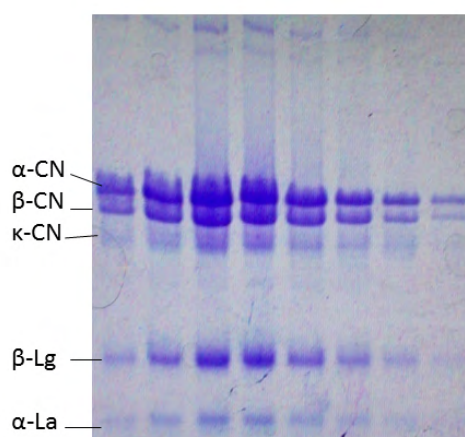


Figura 1. Perfil de proteínas de la leche analizado mediante SDS-PAGE 15%. En la calle 1 se observa la muestra control de leche bovina donde se indican las proteínas presentes: α -caseína (α -CN), β -caseína (β -CN), κ -caseína (κ -CN), β -lactoglobulina (β -Lg) y α -lactoalbúmina (α -La). Calles 2-8 diferentes muestras de leche bovina.

intersticiales, y se encuentran incrementadas hasta 300 veces en la leche de vaca con mastitis colibacilar en comparación con la leche de animales sanos⁴⁵. Igualmente, se observó incrementos de la actividad de la MMP-2 y MMP-9 en tejido mamario y secreciones en cuartos mamarios de vacas infectadas crónicamente con *S. aureus*, en comparación con sus cuartos sanos⁴. Además, se observó que los fibroblastos tratados con *S. aureus* inactivado mostraron un incremento en la actividad de la MMP-2⁴⁸.

La activación de MMPs perdura incluso después de resuelto el proceso infeccioso-inflamatorio. Estas metaloproteasas y el daño tisular que producen podrían ser la causa incluso de mastitis en las cuales el TMC da positivo, aunque los cultivos den negativos. La posibilidad de generar y probar sustancias inhibidoras de las MMPs en coincidencia con las mastitis no solo podrían favorecer la resolución de mastitis, sino que también podrían reducir el uso de antibióticos favoreciendo un uso más prudente de los mismos lo

que disminuiría la resistencia a los mismos. Sin embargo, Gifre-Renom y colaboradores indicaron que la infusión en la glándula mamaria de cuerpos de inclusión de MMP-9 como nanopartículas al momento del secado favorecería la involución y la función inmune de la glándula mamaria como consecuencia de la acción fisiológica de esta proteasa durante el secado²³.

Las MMPs 2 y 9 presentan en su forma activa un peso molecular de 72 y 92 kDa respectivamente. Una forma de analizar la actividad de las MMPs es mediante Zimografía en SDS-PAGE con el agregado de gelatina (Figura 2).

La activación de MMPs se puede dar por múltiples mecanismos entre los que están involucrados el potencial redox intracelular y la presencia de diversas citoquinas²⁰. Además, la actividad de las MMPs está regulada por los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs) presentes en los tejidos¹¹. Los TIMPs regularían amortiguando la actividad de las MMPs



Figura 2. Análisis de la actividad de las MMPs mediante Zimografía en SDS-PAGE 10% con el agregado de 0.2% de gelatina. De izquierda a derecha calle 1 control MMP-9, calle 2 control MMP-2 y calles 2-8 corresponde a diferentes muestras de leche bovina.

N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase (NAGasa)

Esta enzima se encuentra presente en los gránulos lisosomales de los leucocitos polimorfonucleares pudiendo también ser liberada además cuando hay daño de las células epiteliales de la glándula mamaria, por lo que su incremento acompaña los procesos inflamatorios de la glándula mamaria⁵⁹. La NGAasa está asociada con lisis celular y daño tisular²⁹. Además, presenta un efecto bactericida favoreciendo la reducción bacteriana³⁰.

La NAGasa es un importante biomarcador de mastitis bovina y se correlaciona muy bien con el recuento de células somáticas⁶⁰. La técnica de determinación de la actividad de esta enzima fue descrita por primera vez por Kitchen y colaboradores en 1984³⁷.

Lactato Deshidrogenasa (LDH)

La LDH es una enzima ubicua que está presente en el citoplasma de todas las células y

tejidos del organismo. Esta enzima puede considerarse un indicador confiable de la intensidad del proceso inflamatorio en la glándula mamaria, especialmente en el caso de mastitis subclínica. Este biomarcador puede resultar muy útil para los sistemas automatizados de control de mastitis. Por este motivo la cuantificación de LDH puede monitorear la sanidad de glándula mamaria ya que sus valores se incrementan durante procesos infecciosos²⁸. Asimismo, la presencia de LDH en leche también estaría indicando una disrupción de la barrera hemato-lechera producida por la mastitis⁴¹. Se notificó que las infecciones por ciertas bacterias produjeron mayores incrementos, siendo que *E. coli* y *Str. uberis* mostraron los mayores incrementos²⁷. Otro autor describió mayores incrementos en infecciones por bacterias Gram negativas³⁶. Además, la LDH muestra una mayor sensibilidad que la NAGasa para identificar mastitis subclínicas¹².

Beta glucuronidasa (β -glucuronidasa)

La β -glucuronidasa es otra enzima lisosomal que también es un marcador relevante que se incrementa en procesos inflamatorios de la glándula mamaria⁵². Sin embargo, la poca actividad de la misma le quitaría importancia respecto a otros biomarcadores⁴⁰.

Glicosaminoglicanos (GAGs)

Los GAGs son moléculas que se encuentran principalmente en el tejido conectivo de diversos tejidos, entre ellos la glándula mamaria. Es por ello que los GAGs pueden llegar a ser una alternativa interesante para evaluar *in situ* la sanidad de los animales en producción.

Los GAGs son cadenas de polisacáridos largas no ramificadas²². La presencia de grupos carboxilos y sulfatos le dan a los GAGs la propiedad de ser muy hidrofílicos. Esta propiedad hace que puedan estar en forma de gel y ocupar grandes espacios de la matriz extracelular dando sostén a distintos tejidos³². La mayoría de los GAGs se encuentran covalentemente unidos a proteínas formando proteoglicanos²⁶. Dentro de los GAGs, el más importante en la glándula mamaria es el ácido hialurónico, este GAG cumple funciones en la embriogénesis, morfogénesis, reparación tisular e inflamación de este órgano³⁵. Otro GAG de impor-

tancia en la glándula mamaria es el versican, éste es un modulador del comportamiento celular, el cual en relación a distintos factores de crecimiento puede controlar la acción de células madre en el tejido mamario⁴⁶. Más allá de estar presentes en los tejidos previamente citados, se pueden encontrar GAGs en la leche donde principalmente cumplen funciones en relación con la inmunidad de la glándula mamaria⁵¹.

Cuando comparamos los niveles de GAGs en leche de animales sanos, con mastitis subclínica y con mastitis clínica pudimos observar que los animales sanos son los que menos niveles de GAGs contienen, mientras que los animales afectados subclínicamente tienen un nivel intermedio y los animales con signología clínica tienen los mayores niveles⁸. Si bien entre los distintos grados de mastitis no se encontraron diferencias significativas, si hubo diferencias con respecto a los individuos sanos. Esto puede ser explicado en parte debido a que proteasas como las metaloproteasas 2 y 9 se ven aumentadas durante las mastitis⁹. Por lo tanto la degradación de la matriz extracelular permitiría la liberación hacia la secreción láctea de los GAGs presentes en la misma.

El aumento de los GAGs ante procesos infecciosos fue descripto en varias enfermedades. Por ejemplo, se ven aumentados los niveles de ciertos GAGs, como el ácido hialurónico o el versican, ante afecciones respiratorias inducidas por *E. coli* en ratones¹³. Por otro lado, bacterias como *S. aureus* y *Streptococcus pneumoniae* pueden degradar GAGs de sus cores proteicos, tanto por proteasas propias como del hospedador, dejándolos libres aumentando su concentración en los fluidos corporales^{14,56}. Además, algunas bacterias de los géneros *Streptococcus*, *Escherichia* y *Pasteurella* pueden sintetizar GAGs similares a los encontrados en mamíferos como parte constitutiva de su cápsula^{16,15}. Esto hace razonable que ante procesos infecciosos en la glándula mamaria los GAGs se vean aumentados. Pero más allá de verse aumentados en este tipo de proceso, también se ven aumentadas estas moléculas en tejidos que están bajo un proceso inflamatorio³¹. Con lo cual el aumento de los GAGs en animales con cultivos bacteriológicos negativos podría ser explicado por lo previamente dicho o porque el agente etiológico infeccioso no fue diagnosticado.

Con respecto a los resultados observados en relación al TMC y los GAGs, resulta interesante

que éstos últimos se vean aumentados en los animales con mastitis subclínica de grado I, ya que es el grado donde se observa menor especificidad del TMC, siendo que ya de por sí la sensibilidad de la técnica es deficiente^{34,21}.

Esto hace que la determinación de los GAGs podría sumarse como una herramienta para la toma de decisiones en los establecimientos ya que podríamos tener una prognosis sobre la performance productiva de un animal, similar al uso que se le da en medicina humana en relación a distintas neoplasias⁶⁶. Por lo tanto, este tipo de moléculas, evaluadas en su totalidad, serían indicadores del estado de sanidad, ya que ante leves variaciones nos indican la presencia de procesos mastitícos⁸.

CONCLUSIONES

A lo largo de este trabajo hablamos del impacto económico de la mastitis bovina en los rodeos lecheros y la importancia de su rápido diagnóstico para disminuir dicho impacto. Para ello necesitamos de técnicas que sean fiables y fáciles de implementar en condiciones a campo. Es por ello que requerimos la optimización de las pruebas con las que ya contamos, como el TMC o el CCS, tanto como la adaptación de pruebas que se desarrollan a nivel laboratorio como la determinación de MMPs, perfiles proteicos o GAGs. Un ejemplo de ello es lo que sucede con la LDH que está siendo incorporada en sistemas robotizados y que se combina con otras determinaciones como el CCS en línea. Esto nos da la pauta de que los sistemas de diagnósticos del futuro tendrán un abanico de técnicas que permitirán una rápida y segura detección de animales con procesos inflamatorios incipientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alfonso, D.; Zanette, J.; Ruiz, K. *et al.* Situación de la mastitis subclínica y evaluación de los procesos lecheros en vaquerías de la provincia Villa Clara, Cuba. *Revista de Salud Animal*. 2017; 39 (3), 00.
2. Barkema H.; Schukken Y.; Lam T. *et al.* Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. *J Dairy Sci*. 1998; 81(2):411-9. 10.
3. Barkema H.W.; Deluykerb H.A.; Schukken Y.H. *et al.* Quarter-milk somatic cell count at calving and at the first six milkings after calving. *Prev Vet Med*. 1999; 38: 1-9.
4. Beccaria, C.; Velazquez, N.S.; Chervaz, V. *et al.* Involvement of matrix metalloproteinases and their inhibitors in *Staphylococcus aureus* chronically infected bovine mammary glands during active involution. *Res Vet Sci* 137 (2021) 30-39.
5. Birkedal-Hansen, H.; Moore, W. G. I.; Boddén, M. K. *et al.* Matrix Metalloproteinases: A Review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993; 4(2): 197-250.
6. Busanello, M.; Rossi, R; Cassoli, L; *et al.* Estimation of prevalence and incidence of subclinical mastitis in a large population of Brazilian dairy herds. *J Dairy Sci*. 2017; 100: 6545-6553.
7. Caggiano N.; Bottini J.M.; Lorenzo Smirnoff A. *et al.* Determinación de biomarcadores moleculares en leche y su posible aplicación en el diagnóstico y tratamiento de la mastitis bovina. *InVet*. 2016; 18 2.
8. Caggiano, N; De Simone, E. Niveles de glicosaminoglicanos en leche como indicador de salubridad mamaria en vacas Holstein. Jornadas de Jóvenes Investigadores AUGM (26° : 2018 : Mendoza, Argentina). Ponencia de trabajo premiado.
9. Caggiano, N.; Lorenzo Smirnoff, A.; Bottini, J.M. *et al.* Protease activity and protein profile in milk from healthy dairy cows and cows with different types of mastitis. *Int Dairy J*. 2019; 89:1-5.
10. Caraviello, D. Z.; Weigel, K. A.; Shook, G. E. *et al.* Assessment of the impact of somatic cell count on functional longevity in Holstein and Jersey cattle using survival analysis methodology. *J Dairy Sci*. 2005; 2, 804-811.
11. Cascales, M.; Álvarez-Gómez J.A. Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. *An R Acad Nac Farm*. 2010; 76 (1): 59-84.
12. Chagunda, M.; Larsen, T; Bjerring, M. *et al.* L-lactate dehydrogenase and N-acetyl-β-D-glucosaminidase activities in bovine milk as indicators of non-specific mastitis. *J Dairy Res*. 2006; 73(4), 431-440.

13. Chang, M.Y.; Tanino, Y.; Vidova, V. *et al.* A rapid increase in macrophage-derived versican and hyaluronan in infectious lung disease. *Matrix Biology*. 2014; 34 1–12.
14. Chen, Y.; Bennett, A.; Hayashida, A. *et al.* Streptococcus pneumoniae sheds syndecan-1 ectodomains via ZmpC, a metalloproteinase virulence factor. *J Biol Chem*. 2007; 282:159–67.
15. Chung, J.Y.; Wilkie I, Boyce, J.D. *et al.* Role of capsule in the pathogenesis of fowl cholera caused by Pasteurella multocida serogroup A. *Infect Immun*. 2001; 69:2487–92.
16. DeAngelis, P.L. Microbial glycosaminoglycan glycosyltransferases. *Glycobiology*. 2002; 12:9R–16R.
17. Dieser S. A.; Vissio C.; Lasagno M. C. *et al.* Prevalence of Pathogens Causing Subclinical Mastitis in Argentinean Dairy Herds *Pak Vet J*. 2014; 34(1): 124-126
18. Edmondson P.W. and Bramley A.J. (2004) Mastitis. Chapter 23, 326-337. *Bovine Medicine Diseases and Husbandry of Cattle*. Second edition. by Blackwell Science Ltd.
19. Freitas-Rodríguez, S.; Folgueras, A.R.; López-Otín, C. The role of matrix metalloproteinases in aging: Tissue remodeling and beyond. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2017; 1864 11 Part A.
20. Fontani F; Domazetovic V; Marcucci T. *et al.* MMPs, ADAMs and Their Natural Inhibitors in Inflammatory Bowel Disease: Involvement of Oxidative Stress. *J Clin Gastroenterol Treat*. 2017; 3:039.
21. Fosgate, G.T.; Petzer, I.M.; Karzis, J. Sensitivity and specificity of a hand-held milk electrical conductivity meter compared to the California mastitis test for mastitis in dairy cattle. *The Veterinary Journal*. 2013; 196 98–102.
22. Gandhi N.S.; Mancera R.L. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem Biol Drug Des*. 2008; 72(6):455-82.
23. Gifre-Renom, L.; Carratalá, J.V.; Parés, S. *et al.* Potential of MMP-9 based nanoparticles at optimizing the cow dry period: pulling apart the effects of MMP-9 and nanoparticles. *Sci Rep*. 2020; 10, 11299.
24. Gröhn Y. T.; Eicker S. W.; Ducrocq V.; Hertl J. A. Effect of Diseases on the Culling of Holstein Dairy Cows in New York State. *J Dairy Sci*. 1998; 81:966–978.
25. 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. *Int Dairy J*. 2006; 16, 639–647.
26. Häcker, U; Nybakken, K; Perrimon, N. Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2005; 6 530–541.
27. Hernández-Castellano, L; Wall, S K; Roger, S. *et al.* Milk somatic cell count, lactate dehydrogenase activity, and immunoglobulin G concentration associated with mastitis caused by different pathogens: a field study. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*. 2017; 159(5):283-290.
28. Hiss S.; Mueller U.; Neu-Zahren A. *et al.* Haptoglobin and lactate dehydrogenase measurements in milk for the identification of subclinically diseased udder quarters. *Vet. Med-Czech*. 2007; 52: 245–252.
29. Hovinen, M.; Simojoki, H.; Suolaniemi, J. *et al.* N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity in cow milk as an indicator of mastitis. *J Dairy Sci*. 2016; 83, 219–227.
30. Hussain, A.M.; Daniel, R.C.W.; Frost, A.J. The bactericidal effect of N-acetyl- β -D-glucosaminidase on bacteria. *Vet. Microbiol*. 1992; 32, 75–80.
31. Ibberson, C.B.; Parlet, C.P.; Kwiecinski, J. *et al.* Hyaluronan Modulation Impacts Staphylococcus aureus Biofilm Infection. *Infect Immun*. 2016; 84:1917–1929.
32. Insua-Rodríguez, J.; Oskarsson, T. The extracellular matrix in breast cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016; 97 41–55.
33. Janzekovic M.; Brus M.; Mursec B. *et al.* Mastitis detection based on electric conductivity of milk. *Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering*. 2009; 34:1.
34. Kandeel, S.A.; Morin, D.E.; Calloway, C.D. *et al.* Association of California Mastitis Test Scores with Intramammary Infection Status in Lactating Dairy Cows Admitted to a Veterinary Teaching Hospital. *J Vet Intern Med*. 2018; 32:497–505.
35. Karousou, E.; D'Angelo, M.L.; Kouvidi, K. *et al.* Collagen VI and hyaluronan: the common role in breast cancer, *BioMed. Res. Int*. 2014; 606458.
36. Khatun, M.; Bruckmaier, R.M.; Thomson, P.C. *et al.* Suitability of somatic cell count, electrical conductivity, and lactate dehydrogenase activity in foremilk before versus after alveolar milk ejection for mastitis detection. *J Dairy Sci*. 2019; 102 10:9200-9212.
37. Kitchen, B. J.; Kwee, W.S.; Middleton, G. *et al.* Relationship between the level of N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAGase) in bovine milk and the presence of mastitis pathogens. *J Dairy Res*. 1984; 51, 11–16.
38. Kivaria, F.M.; Noordhuizen, J.P.T.M.; Nielen, M. Interpretation of California mastitis test scores using Staphylococcus aureus culture results for screening of subclinical mastitis in low yielding smallholder dairy cows in the Dar es Salaam region of Tanzania. *Prev Vet Med*. 2007; 3, 274–285.

39. Lam, T.J.G.M.; Van Den Borne, B.H.P. J.; Jansen, K. Ho-geveen Improving bovine udder health: A national control program in the Netherlands *J. Dairy Sci.* 2013; 96, 1301-1311.
40. Larsen, T.; Aulrich, K. Optimizing the fluorometric β -glucuronidase assay in ruminant milk for a more precise determination of mastitis. *J Dairy Res.* 2012; 79(1), 7-15.
41. Lehmann M.; Wellnitz O.; Bruckmaier R. M. Concomitant lipopolysaccharide-induced transfer of blood-derived components including immunoglobulins into milk. *J. Dairy Sci.* 2013; 96: 889-896.
42. Lhermie, G.; Verteramo C. L.; Kaniyamattam, K. *et al.* Antimicrobial Policies in United States Beef Production: Choosing the Right Instruments to Reduce Antimicrobial Use and Resistance Under Structural and Market Constraints. *Front Vet Sci.* 2019; 6 245.
43. Li H.; Zheng H.; Li L. *et al.* The Effects of Matrix Metalloproteinase-9 on Dairy Goat Mastitis and Cell Survival of Goat Mammary Epithelial Cells. *PLoS ONE.* 2016; 11(8): e0160989.
44. Li L.; Chen, X.; Chen, Z. Identification of Key Candidate Genes in Dairy Cow in Response to *Escherichia coli* Mastitis by Bioinformatical Analysis. *Front Genet.* 2019; 10 1251.
45. McDougall, S.; Malcolm, D.; Prosser, C.G. Prevalence and incidence of intramammary infections in lactating dairy goats. *N. Z. Vet. J.* 2014; 62, 136-145.
46. McIntosh, J.; Dennison, G.; Holly, J.M. *et al.* IGFBP-3 can either inhibit or enhance EGF-mediated growth of breast epithelial cells dependent upon the presence of fibronectin. *J Biol Chem.* 2010; 285 38788-38800.
47. Medrano, J.F.; Aguilar-Córdova, E. Genotyping of Bovine Kappa-Casein Loci Following DNA Sequence Amplification. *Biotechnology.* 1990; 8: 144-146.
48. Miao, Z.; Ding, Y.; Bi, Y. *et al.* *Staphylococcus aureus* on the effect of expression of MMPs/TIMPs and uPA system in bovine mammary fibroblasts. *J Microbiol Immunol Infect.* 2021; 54 3: 411-419.
49. Mudaliar, M.; Tassi, R.; Thomas, F.C. *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, 2748-2761.
50. Neder, V. E.; Signorini, M. L.; Cuatrin, A. *et al.* *Revista FAVE - Ciencias Veterinarias.* 2014; 13 (1-2).
51. Newburg, D.S. Glycobiology of Human Milk. *Biochemistry (Moscow).* 2013; 78, 7: 771-785.
52. Oliszewski, R.; Núñez De Kairúz, M. S.; Gonzalez, S.N. *et al.* Assessment of β -Glucuronidase Levels in Goat's Milk as an Indicator of Mastitis: Comparison with Other Mastitis Detection Methods. *J Food Prot.* 2002; 65 (5): 864-866.
53. Oliver, S. P.; Calvino, L. F. Influence of inflammation on mammary gland metabolism and milk composition. *J. Anim.Sci.* 1995; 73(Suppl. 2):18-33.
54. Oliveira L.; Hulland C.; Ruegg P. L. Characterization of clinical mastitis occurring in cows on 50 large dairy herds in Wisconsin. *J Dairy Sci.* 2013; 96 12.
55. 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*, 1999 pp. 152 - 156. Arlington VA.
56. Park, P.W.; Foster, T.J.; Nishi, E. *et al.* Activation of syndecan-1 ectodomain shedding by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin and beta-toxin. *J Biol Chem.* 2004; 279:251-8.
57. Park, K.C.; Dharmasivam, M.; Richardson, D.R. The Role of Extracellular Proteases in Tumor Progression and the Development of Innovative Metal Ion Chelators That Inhibit Their Activity. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21, 6805.
58. Pitkala, A.; Haveri, M.; Pyörälä, S. *et al.* Bovine mastitis in Finland 2001—Prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J Dairy Sci.* 2004; 87:2433-2441.
59. Pyörälä, S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet. Res.* 2003; 34, 565-578.
60. Pyörälä, S.; Hovinen, M.; Simojoki, H. *et al.* Acute phase proteins in milk in naturally acquired bovine mastitis caused by different pathogens. *Vet. Rec.* 2011; 168:535.
61. Richardet, M.; Castro, S.; Tirante, L. *et al.* Magnitud y variación de la mastitis clínica y sus costos asociados en rodeos lecheros de Argentina. *Arch Med Vet.* 2016; 48, 153-158.
62. Ruegg P.L. Managing Mastitis and Producing Quality Milk. Chapter 18, 207-233. *Dairy production medicine.* 2011. John Wiley & Sons, Inc.
63. Ryman, V.; Packiriswamy, N.; Sordillo L.M. Role of endothelial cells in bovine mammary gland health and disease. *Anim Health Res Rev.* 2015; 16, 135-149.
64. Schalm, O.W.; Noorlander, D.O. Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. *J Am Vet Med Assoc.* 1957; 130, 199-204.
65. Sharma N.; Shuaib, B.A.; Zul H.I., *et al.* Impact of mastitis on reproductive performance in dairy animals: A review. *Theriogenology Insight.* 2017; 7 1:41-49.

66. Shawky, M.S.; Ricciardelli, C.; Lord, M. *et al.* Proteoglycans: Potential Agents in Mammographic Density and the Associated Breast Cancer Risk. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2015; 20:121–131.
67. USDA APHIS National Animal Health Monitoring System 2007. Dairy 2007: Part V: Changes in dairy cattle health and management practices in the United States, 1996–2007. USDA National Animal Health Monitoring Service. Accessed Sep. 26, 2011.
68. USDA APHIS National Animal Health Monitoring System. Dairy 2014 Milk Quality, Milking Procedures, and Mastitis on U.S. Dairies, 2014.
69. Vissio, C.; Pereyra, M.; Lamberti, M. *et al.* Mastitis en vacas Holstein y factores asociados en tambos de Córdoba, Argentina. *Revista Veterinaria*. 2021; 31(2):120.
70. Winkler, J.; Abisoye-Ogunniyan, A.; Metcalf, K.J. *et al.* Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis. *Nat Commun*. 2020; 11, 5120.
71. Yang, M.; Shi, J.; Tian, J. *et al.* Exogenous melatonin reduces somatic cell count of milk in Holstein cows. *Sci Rep*. 2017; 7, 43280.