

**Niveles de Glicosaminoglicanos en leche como indicador de salubridad mamaria en vacas Holstein**

Caggiano, Nicolás; De Simone, Emilio

[ncaggiano@fvvet.uba.ar](mailto:ncaggiano@fvvet.uba.ar); [edesimone@fvvet.uba.ar](mailto:edesimone@fvvet.uba.ar)

Faculta de Ciencias Veterinarias

Universidad de Buenos Aires

**RESUMEN**

La mastitis bovina es la patología con mayor morbilidad y mortalidad dentro de los rodeos lecheros, afectando seriamente a la rentabilidad de los mismos. Tradicionalmente el diagnóstico de las mastitis es el cultivo bacteriológico. Éste insume demasiado tiempo hasta el diagnóstico, por lo cual realizarlo periódicamente para el diagnóstico temprano de los animales afectados sería engorroso. En este trabajo, nos propusimos evaluar los niveles de glicosaminoglicanos totales (GAGs) en animales sanos y con mastitis clínica y subclínica generadas por distintos agentes etiológicos. Se muestrearon 280 vacas de tambos de la Pcia. de Bs. As. Se realizó el TMC, recuento de células somáticas, medición de GAGs por la técnica de DMBB y cultivos bacteriológicos. Los animales sanos (S) son los que menos niveles de GAGs presentan, los animales afectados subclínicamente (MS) tienen un nivel intermedio y los animales con signología clínica (MC) poseen los mayores niveles. Se observó diferencias significativas entre los grupos S vs MS ( $p < 0,001$ ) y MC vs S y MS ( $p < 0,0001$ ). En el grupo MC se observó que SCN y Streptococcus spp. tuvieron los mayores niveles de GAGs, siendo que el grupo S vs S. aureus y Streptococcus spp presentaron diferencias significativas de  $p < 0,0001$ , S vs E. coli ( $p < 0,001$ ) y S vs SCN y cultivos negativos ( $p < 0,01$ ). En el grupo MS los mayores niveles de GAGs se encontraron en los animales infectados por S. aureus. S vs S. aureus ( $p < 0,0001$ ), S vs SCN ( $p < 0,001$ ) y S vs Streptococcus spp. ( $p < 0,5$ ). Los GAGs podrían utilizarse como indicadores de sanidad mamaria, porque se mantienen constantes a lo largo del proceso productivo de los animales sanos y ante procesos patológicos leves, como pueden ser las mastitis subclínicas, sus niveles ya se observan alterados.

**PALABRAS CLAVES:** MASTITIS, GLICOSAMINOGLICANOS, BOVINOS.

## INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina es la patología con mayor morbilidad y mortalidad dentro de los rodeos lecheros, afectando seriamente a la rentabilidad de los mismos, USDA (2008). 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 (Bar et al., 2008). Podemos encontrar dos tipos de mastitis: clínica y subclínica, ésta última tiene mayor incidencia en los rodeos lecheros lo cual genera grandes pérdidas económicas (Raglam 2016). Un estudio realizado por Dieser et al. (2013) en la provincia de Córdoba arrojó que el 53,9% de los animales de los establecimientos involucrados en el estudio tenían mastitis subclínica. Como fue citado previamente, esto conlleva a grandes pérdidas económicas ya que el costo de tener un animal con mastitis subclínica se estima que 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 incluso después del tratamiento, llevando al descarte temprano del animal, (Oliver y Calvino, 1995).

La mastitis principalmente es de etiología bacteriana. En nuestro país, los agentes etiológicos más frecuentemente aislados en las mastitis clínicas como en las subclínicas son *Staphylococcus aureus* (S. aureus), *Streptococcus spp.* y *Escherichia coli* (E. coli), (Calvino y Tirante, 2005). Últimamente a este grupo de patógenos, principalmente en relación a las mastitis subclínicas, deberíamos agregarle a los Estafilococos Coagulasa Negativos (ECN) (Raspanti et al., 2016).

Debido a lo anteriormente dicho es de vital importancia el rápido aislamiento de los animales afectados, tanto por mastitis clínica como subclínica, para poder de este modo instaurar lo antes posible una terapia antibiótica y separar los animales enfermos de los sanos, (Lunberg, 2015). El método convencional para el diagnóstico de las mastitis es el cultivo bacteriológico. Este método insume demasiado tiempo hasta el diagnóstico y realizarlo periódicamente para el aislamiento temprano de los animales afectados sería engorroso. Otro método para determinar procesos inflamatorios a nivel mamario es el Test Mastitis California (TMC), dicho test evalúa el grado de ADN contenido en una muestra de leche y lo correlaciona con la concentración de células somáticas. El TMC tiene una aceptable sensibilidad para

la mayoría de los patógenos que generan mastitis. Para patógenos mayores como *S. aureus* tiene una sensibilidad del 66,7%, mientras que para patógenos menores tiene 49,5%. La mayor sensibilidad se observa para los estreptococos ambientales (84%) (Pyrölä, 2003). Métodos modernos de detección de animales con mastitis evalúan la actividad de enzimas, como la lactato deshidrogenasa (LDH), directamente durante el proceso de ordeño de los animales. La determinación de indicadores de manera rápida y en los establecimientos productivos va a acelerar el diagnóstico de la enfermedad y disminuir el impacto negativo en lo económico de la misma (Hildebrandt Jorgensen, 2016). Es por eso que los Glicosaminoglicanos (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 ramificadas (Gandhi y Mancera, 2008). 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 tejidos (Insua-Rodríguez y Oskarsson, 2016). La mayoría de los GAGs se encuentran covalentemente unidos a proteínas formando proteoglicanos

(Häcker et al., 2005). Dentro de los GAGs, el más importante en la glándula mamaria encontramos al ácido hialurónico, este GAG cumple funciones en la embriogénesis, morfogénesis, reparación tisular e inflamación de este órgano (Karousou et al., 2014). Otro GAG de importancia 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 madres en el tejido mamario (McIntosh et al., 2010). La decorina y el lumican, proteoglicanos pequeños ricos en leucina, por ejemplo regulan el crecimiento celular (Nastase et al., 2014). Es decir que los GAGs no solo se limitan a funciones estructurales dentro de la matriz extracelular, sino que además cumplen distintas funciones que regulan la compleja actividad celular de los tejidos en los cuales se encuentran (Frantz et al., 2010). Más allá de estar presentes en los tejidos previamente citados, se pueden encontrar GAGs en la leche donde principalmente cumplen funciones en relación a la inmunidad de la glándula mamaria (Newburg, 2013). Hay pocos estudios sobre GAGs en leche bovina, uno de ellos fue desarrollado por Coppa et al. en 2010 y utilizó leche comercializada para consumo humano. Por lo tanto el estudio de los mismos, en leche proveniente de animales en producción,

sería una de las primeras aproximaciones al conocimiento del comportamiento de estas moléculas en la fisiología y fisiopatología de enfermedades mamarias en los bovinos.

## **OBJETIVO**

Evaluar los niveles de GAGs totales en animales sanos y con mastitis clínica y subclínica generadas por distintos agentes etiológicos y su posible instauración como un método diagnóstico de afecciones mamarias en vacas Holstein.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Animales y modelo experimental**

Se tomaron 280 muestras de leche de vacas y vaquillonas provenientes de 8 tambos de la Provincia de Buenos Aires, los animales fueron divididos en 3 grupos: sanas (S) (n=50), mastitis clínicas (MC) (n=80) y mastitis subclínicas (MS) (n=150). En el grupo S se incluyeron animales sin mastitis clínica ni subclínica y con cultivo bacteriológico negativo. En el grupo MC se incluyeron los animales que al momento del muestreo presentaban algún grado de dicha afección y en el grupo MS se incluían los animales que tenían algún grado de mastitis subclínica mediante la determinación del Test Mastitis California (TMC) y su confirmación mediante el recuento de células somáticas en cámara de Neubauer. A su vez los animales del

grupo MS se subdividieron en tres grados: grado 1, grado 2 y grado 3, (Philpot y Nickerson, 2000). Posterior a la determinación del TMC, las muestras fueron colectadas en recipientes estériles y de manera aséptica, mediante la utilización de gasas previamente sumergidas en alcohol 70%. Se separaron alícuotas para el conteo de leucocitos que fueron refrigeradas a 6-7°C hasta su realización dentro de las 12 horas, el resto de las muestras se congelaron a -20°C. Previo a la toma de la muestra, se descartó el primer chorro de leche y esto a su vez sirve para visualizar la presencia de flóculos en leche, lo cual nos indicaba la presencia de mastitis clínica. De los distintos establecimientos se recolectaron datos productivos de los animales, principalmente para ser utilizados en el grupo S y evaluar variaciones a lo largo de la lactancia.

### **Test Mastitis California**

A los animales sin mastitis clínica se les realizó el Test Mastitis California (TMC) para determinar si estaban sanos o tenían un recuento de células somáticas mayor a 200.000 cél/ml para incluirlos en el grupo de mastitis subclínica, (Shalm y Noorlander, 1957). Se realizó la técnica de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, para lo cual se tomaron 5 ml de leche de cada cuarto mamario y se lo homogenizó con 5 ml del reactivo para

TMC en una paleta diseñada para tal fin. Según el grado de gelificación las muestras fueron clasificadas en negativas o en 1°, 2° o 3°, siendo el 3° la mastitis subclínica más grave (Roy et al., 2009).

### **Recuento de células somáticas**

El recuento se realizó dentro de las 12 horas de colectada la muestra. Las muestras se diluyeron 1:200 en diluyente para el conteo de leucocitos (Biopur S.R.L., Rosario). Una vez mezclados los componentes se colocaron en una cámara de Neubauer para su posterior recuento en microscopio a 40X.

### **Bacteriología**

Se sembraron 50 µl de muestra en agar sangre con 0,1% de esculina y se dejaron en estufa a 37°C durante 24-48 hs. El aislamiento y reconocimiento de los distintos patógenos se realizó según lo indicado por el National Mastitis Council, Inc. (Hogan et al., 1999).

### **Cuantificación de GAGs**

La determinación de los GAGs se hizo mediante el método desarrollado por Farndale et al. (1982) modificado. En dicho método combinamos una solución que contiene 16 µg/ml de 1,9-Dimetilmetilene blue con 50 µl de muestra y 450 µl de agua destilada. Se evaluó la absorbancia de las muestras en espectrofotómetro (Metrolab 1000,

Argentina) a una longitud de onda de 525 nm. Se confeccionó una curva estándar la cual contenía concentraciones conocidas de condroitín sulfato (Sigma).

### **Análisis estadístico**

Para el estudio estadístico se calculó 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  $p \leq 0.05$ . 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. Para gráficos y análisis se utilizó el software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., USA).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Al comparar los niveles de GAGs entre los animales de los grupos S, MS y MC se puede 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 niveles. Se pudieron observar diferencias significativas entre los grupos S vs MS

( $p < 0,001$ ) y MC vs S y MS ( $p < 0,0001$ ) (GRÁFICO 1).

lactancia se encontraban, para evaluar algún tipo de efecto de los días en ordeño,

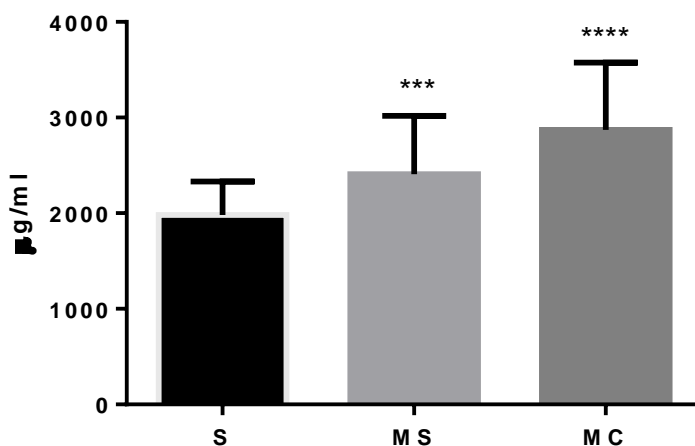


GRÁFICO 1. Concentración de GAGs en animales sanos y con mastitis subclínica y clínica. \*\*\* S vs MS ( $p < 0,001$ ), \*\*\*\* MC vs S y MS ( $p < 0,0001$ ).

Los resultados previamente expuestos concuerdan con lo sucedido en otras patologías como la disfunción hepática y lupus eritematoso sistémico (Mizuguchi et al., 2004; Bicer et al., 2003), ambas patologías estudiadas en humanos. Cuando nos desplazamos al ámbito veterinario vemos que estas moléculas fueron estudiadas principalmente en patologías articulares, tanto en equinos como en caninos (Vilar et al., 2016; Baccarin et al., 2012). Los resultados encontrados por los investigadores en dichas especies concuerdan con los resultados obtenidos en este trabajo siendo que los procesos inflamatorios y el daño tisular eleva los niveles de GAGs. Dentro del grupo S al dividir a los animales según en qué tercio de la

los niveles de GAGs se mantuvieron constantes ( $p > 0,05$ ) (GRÁFICO 2A). En relación a parámetros productivos también dividimos a los animales en tres grupos según sus niveles de producción y vimos que los niveles de GAGs también se mantenían constantes ( $p > 0,05$ ) (GRÁFICO 2B).

Al evaluar la concentración de GAGs dentro del grupo MC, se pudieron observar diferencias según los distintos agentes etiológicos. Los individuos de los cuales se aislaron SCN ( $n=10$ ) y *Streptococcus* spp. ( $n=11$ ) tuvieron los mayores niveles de GAGs. Los niveles de GAGs fueron similares para los animales de los cuales se aislaron *S. aureus*, ( $n=30$ ) *E. coli* ( $n=15$ ) y animales con cultivo

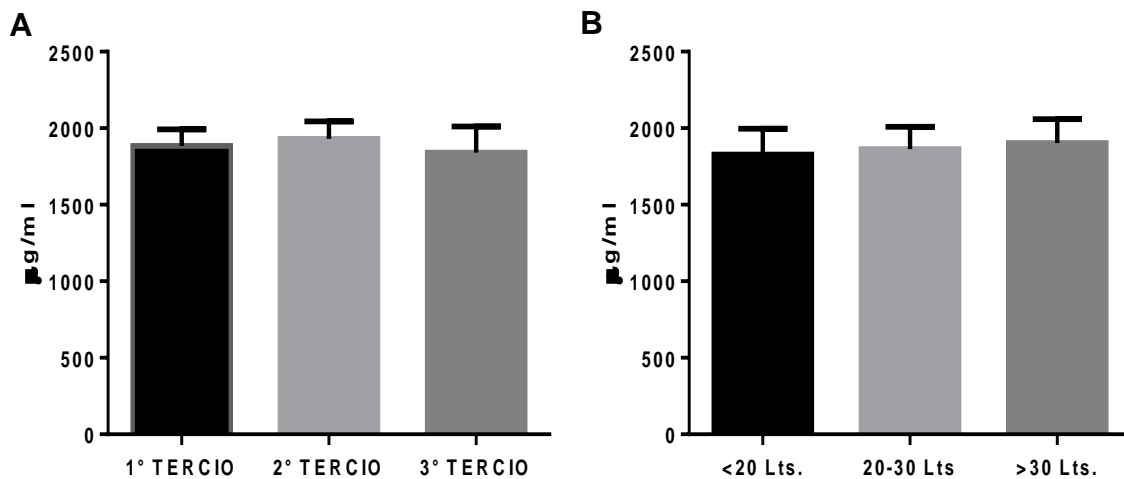


GRÁFICO 2A. Evaluación de la concentración de GAGs en los distintos tercios de la lactancia ( $p>0,05$ ). 2B. Evaluación de los niveles de GAGs según producción individual diaria de leche ( $p>0,05$ ).

negativo ( $n=14$ ). Entre los distintos patógenos no se encontraron diferencias significativas pero si con respecto a los individuos sanos, S vs *S. aureus* y *Streptococcus* spp ( $p<0,0001$ ), S vs *E. coli* ( $p<0,001$ ) y S vs SCN y cultivos negativos ( $p<0,01$ ) (GRÁFICO 3).

El aumento de los GAGs ante procesos infecciosos fue descrito 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 ratones (Chang et al., 2014). 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 (Chen et al., 2007; Park et al., 2004). Sumado a esto algunas bacterias de los géneros *Streptococcus*, *Escherichia* y *Pasteurella* pueden sintetizar GAGs similares a los encontrados en mamíferos como parte constitutiva de su cápsula (DeAngelis, 2002; Chung et al., 2001). Esto hace razonable que ante procesos infecciosos en la glándula mamaria los GAGs se vean aumentados. Pero mas allá de verse aumentados en este tipo de proceso, también se ven aumentadas estas moléculas en tejidos que están bajo un proceso inflamatorio (Ibberson et al., 2016). 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.

Se realizaron las mismas determinaciones para el grupo MS para ver si se mantenía el mismo comportamiento según agente etiológico. En este grupo también se aislaron *S. aureus* (n=70), *Streptococcus* spp. (n=20), SCN (n=40), Gram negativos (n=10) y cultivos negativos (n=10). Se observó que los mayores niveles de GAGs se encontraron en los animales infectados por *S. aureus*. El resto de los agentes etiológicos tuvieron niveles similares de GAGs. Hubo diferencias significativas entre los grupos S vs *S. aureus* ( $p < 0,0001$ ), S vs SCN ( $p < 0,001$ ) y S vs *Streptococcus* spp. ( $p < 0,5$ ) (GRÁFICO 4).

elevados dentro de este grupo, se mantuvieron iguales que los encontrados en el grupo MC. El resto de los agentes etiológicos si tuvieron menores niveles de GAGs que los obtenidos en el grupo MS. Esto puede deberse al tipo de respuesta inmunológica que *S. aureus* genera en el hospedador (Zheng et al., 2016). Todo esto hace pensar que ante la presencia de un agente infeccioso o un proceso inflamatorio los niveles de GAGs en leche aumentan. Lo que no nos permiten dilucidar los GAGs totales es ante qué tipo de agente etiológico nos estamos enfrentando, con lo cual sería

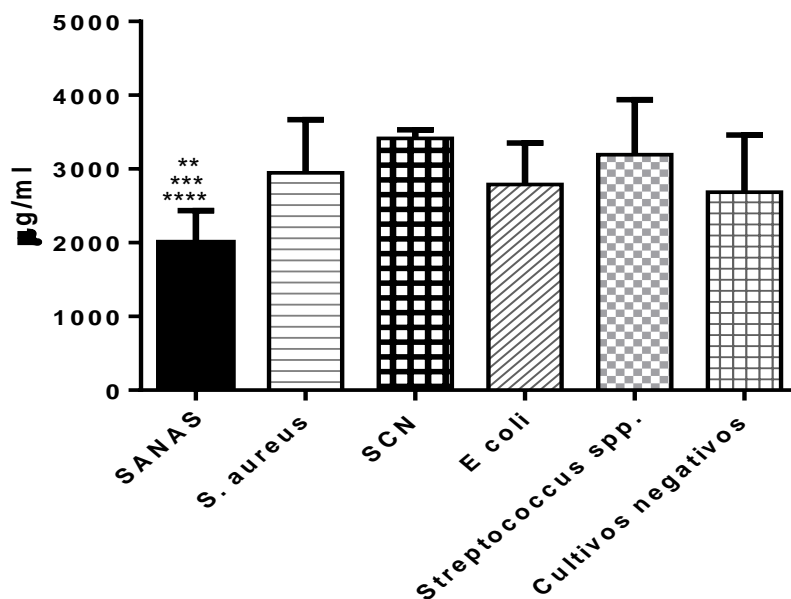


GRÁFICO 3. Niveles de GAGs en mastitis clínicas causadas por distintos agentes etiológicos. \*\*\*\* Sanas vs *S. aureus* y *Streptococcus* spp. ( $p < 0,0001$ ) \*\*\* Sanas vs *E. coli* ( $p < 0,001$ ). \*\* Sanas vs SCN y Cultivos negativos ( $p < 0,01$ ).

Si observamos con más detalle los resultados vemos que los niveles de GAGs para *S. aureus*, que fueron los más

imprescindible ver que GAGs se ven aumentados en las diferentes presentaciones de mastitis y agentes



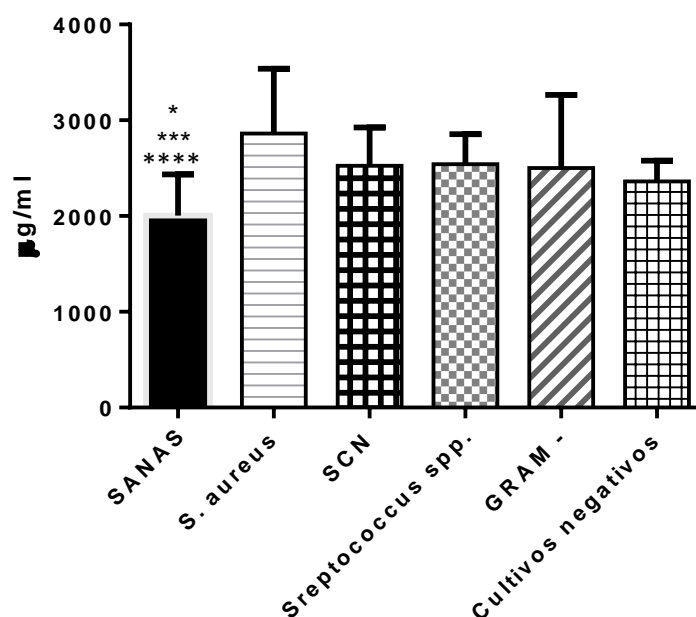


GRÁFICO 4. Niveles de GAGs en animales con mastitis subclínicas afectadas por distintos agentes etiológicos. \*\*\*\* Sanas vs S. aureus ( $p < 0,0001$ ). \*\*\* Sanas vs SCN ( $p < 0,001$ ). \* Sanas vs Streptococcus spp. ( $p < 0,05$ ).

etiológicos. Esto podría sumarse como una herramienta para la toma de decisiones a 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 neoplasias (Shawky et al., 2015). 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 patológicos.

## CONCLUSIONES

Gracias a este estudio podríamos decir que los GAGs podrían utilizarse como indicadores de sanidad mamaria, porque

se mantienen constantes a lo largo del proceso productivo de los animales sanos y ante procesos patológicos leves, como pueden ser las mastitis subclínicas, sus niveles ya se observan alterados. La simpleza y rapidez de su determinación hace que puedan a llegar a ser considerados a futuro como una alternativa para determinaciones en línea de sistemas de ordeño robotizado.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Baccarin, R.Y.A.; Machado, T.S.L.; Lopes-Moraes, A.P.; Vieira, F.A.C.; Michelacci, Y.M. Urinary glycosaminoglycans in horse osteoarthritis. Effects of chondroitin sulfate and glucosamine. *Research in Veterinary Science* 2012 93 88–96.
2. Bar, D., Tauer, L.W., Bennett, G., González, R.N., Hertl, J.A., Schukken, Y.H., Schulte, H. F., Welcome, F.L., Gröhn, Y.T. The Cost of Generic Clinical Mastitis in Dairy Cows as Estimated by Using Dynamic Programming. *J. Dairy Sci.* 2008 Vol. 91 No. 6.
3. Bicer, I.; Aksu, K.; Parildar Z.; Tanyalc, T.; Doganavs, E.; Kutay F.Z. Increased excretions of glycosaminoglycans and heparan sulfate in lupus nephritis and rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2003 23: 221–225.
4. Calvino, L.F., 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 Cs Veterinarias* 2005 Vol 4, No 1/2.
5. Chang, M.Y.; Tanino, Y.; Vidova, V.; Kinsella, M.G.; Chan, C.K.; Johnson, P.Y.; Wight, T.N.; Frevert, C.W. A rapid increase in macrophage-derived versican and hyaluronan in infectious lung disease. *Matrix Biology* 2014 34 1–12.
6. Chen, Y.; Bennett, A.; Hayashida, A.; Hollingshead, S.; Park, P.W. *Streptococcus pneumoniae* sheds syndecan-1 ectodomains via ZmpC, a metalloproteinase virulence factor. *J Biol Chem* 2007;282:159–67.
7. Chung, J.Y.; Wilkie I, Boyce, J.D.; Townsend, K.M.; Frost, A.J.; Ghodduji, M.; Adler, B. Role of capsule in the pathogenesis of fowl cholera caused by *Pasteurella multocida* serogroup A. *Infect Immun* 2001;69:2487–92.
8. Coppa, G. V.; Gabrielli, O.; Buzzega, D.; Zampini, L.; Galeazzi, T.; Maccari, F.; Bertino, E. and Volpi, N. Composition and structure elucidation of human milk Glycosaminoglycans. *Glycobiology* 2011 vol. 21 no. 3 pp. 295–303.
9. DeAngelis, P.L. Microbial glycosaminoglycan glycosyltransferases. *Glycobiology* 2002 12:9R–16R.

10. Dieser, S.A., Vissio, C., Lasagno, M.C., Bogni, C.I., Larriestra, A.J., Odierno L.M. Prevalence of Pathogens Causing Subclinical Mastitis in Argentinean Dairy Herds. *Pak. Vet. J.* 2014 34(1): 124-126.
11. Farndale, R.W.; Sayers, C.A.; Barrett, A.J. A direct spectrophotometric microassay for sulfated glycosaminoglycans in cartilage cultures. *Connective Tissue Res.* 1982 Vol. 9, pp. 247-248.
12. Frantz, C.; Stewart, K.M.; Weaver, V.M. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* 2010 123: 4195-4200.
13. Gandhi N.S.; Mancera R.L. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem Biol Drug Des.* 2008 72(6):455-82.
14. Häcker, U; Nybakken, K.; Perrimon, N. Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005 6 530–541.
15. Hildebrandt Jørgensen, C.; Kristensen, A. R.; Østergaard, S.; Bennedsgaard, T. W. Use of online measures of l-lactate dehydrogenase for classification of posttreatment mammary *Staphylococcus aureus* infection status in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2016 99:1–9.
16. Hogan, J.S.; González, R.N.; Harmon, R.J.; Nickerson, S.C.; Oliver, S.P.; Pankey, J.W.; Smith, K.L. *Laboratory Handbook on Bovine Mastitis.* National Mastitis Council Inc. Madison, WI. 1999 Pp. 222.
17. Ibberson, C.B.; Parlet, C.P.; Kwiecinski, J.; Crosby, H.A.; Meyerholz, D.K.; Horswill, A.R. Hyaluronan Modulation Impacts *Staphylococcus aureus* Biofilm Infection. *Infect Immun* 2016 84:1917–1929.
18. Insua-Rodríguez, J. y Oskarsson, T. The extracellular matrix in breast cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2016 97 41–55.
19. Karousou, E.; D'Angelo, M.L.; Kouvidi, K.; Vigetti, D.; Viola, M.; Nikitovic, D.; De Luca, G.; Passi, A. Collagen VI and hyaluronan: the common role in breast cancer, *BioMed. Res. Int.* 2014 606458.
20. Lundberg, A. Mastitis in dairy cows. PhD Thesis. Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala, Sweden, 2015.
21. McIntosh, J.; Dennison, G.; Holly, J.M.; Jarrett, C.; Frankow, A.;

- Foulstone, E.J.; Winters, Z.E.; Perks, C.M. 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.
22. Mizuguchi, T.; Katsuramaki, T.; Nobuoka, T.; Kawamoto, M.; Oshima, H.; Kawasaki, H.; Kikuchi, H.; Shibata, C.; Hirata, K. Serum Hyaluronate Level for Predicting Subclinical Liver Dysfunction after Hepatectomy. *World J. Surg.* 2004 28, 971–976.
23. Nastase, M.V.; Iozzo, R.V.; Schaefer, L. Key roles for the small leucine-rich proteoglycans in renal and pulmonary pathophysiology, *Biochim. Biophys. Acta* 2014 1840 2460–2470.
24. Newburg, D.S. Glycobiology of Human Milk. *Biochemistry (Moscow)* 2013, vol. 78, No. 7, pp. 771-785.
25. Oliver S P and Calvinho L F. Influence of inflammation on mammary gland metabolism and milk composition. *J. Anim.Sci.* 1995 73(Suppl. 2):18–33.
26. Park, P.W.; Foster, T.J.; Nishi, E.; Duncan, S.J.; Klagsbrun, M.; Chen, Y. Activation of syndecan-1 ectodomain shedding by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin and beta-toxin. *J Biol Chem* 2004;279:251–8.
27. Philpot, W. y Nickerson, S. Ganando la lucha contra la mastitis. Naperville, IL, USA: Wesfalia Surge. 2000 192 p.
28. Pyorala, S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet. Res.* 2003 34 565–578.
29. Raspanti, C.G.; Bonetto, C.C.; Vissio, C.; Pellegrino, M.S.; Reinosoa, E.B.; Diesera, S.A.; Bognia, C.I.; Larriestrac, A.J.; Odierno, L.M. Prevalence and antibiotic susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species from bovine subclinical mastitis in dairy herds in the central region of Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2016 48(1):50---56.
30. Roy, J.P.; Du Tremblay, D.; Descoteaux, L.; Messier, S.; Scholl, D.; Bouchard E. Evaluation of the California Mastitis Test as precalving treatment selection tool for Holstein heifers. *Vet. Microbiol.* 2009 134 136–142.
31. Sağlam, A.G; Şahin, M.; Çelik, E.; Çelebi, O.; Akça, D. and Otlu S. The role of staphylococci in subclinical mastitis of cows and lytic phage isolation against to *Staphylococcus aureus*. *Veterinary World,* 2016 10(12): 1481-1485.
32. Schalm, O.W.; Noorlander, D.O. Experiments and observations leading

to development of the California Mastitis Test. J. Am. Vet. Med. Assoc., 1957 130 pp. 199–204.

33. Shawky, M.S.; Ricciardelli, C.; Lord, M.; Whitelock, J.; Ferro, V.; Britt, K.; Thompson, E.W. Proteoglycans: Potential Agents in Mammographic Density and the Associated Breast Cancer Risk. J Mammary Gland Biol Neoplasia (2015) 20:121–131.

34. USDA. 2008. Dairy 2007, Part II: Changes in the U.S dairy cattle industry, 1991-2007, USDA-APHIS-VS, CEAH Fort Collins, CO.

35. Vilar, J.M.; Rubio, M.; Spinella, G.; Cuervo, B.; Sopena, J.; Cugat, R.; Garcia-Balletbó, M.; Dominguez, J.M.; Granados, M.; Tvarijonaviciute, A.; Ceron, J.J.; Carrillo, J.M. 2016. Serum Collagen Type II Cleavage Epitope and Serum Hyaluronic Acid as Biomarkers for Treatment Monitoring of Dogs with Hip Osteoarthritis. PLoS One. Feb 17;11(2).

36. Zheng, L.; Xu, Y.; Lu, J.; Liu, M.; Dai, B.; Miao, J.; Yin, Y. Variant innate immune responses of mammary epithelial cells to challenge by Staphylococcus aureus, Escherichia coli and the regulating effect of taurine on these bioprocesses. Free Radical

Biology and Medicine 96 (2016) 166–180.

## **FINANCIAMIENTO**

Esta investigación se realizó con financiamiento del Proyecto UBACYT 2017 código 20020160100074BA