

EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES DE INFLAMACIÓN EN OVEJAS SANAS DE RAZA FRISONA

Inflammatory biomarkers evaluation in healthy Fresian ewes

Giampaoli CL*, Ochoa AS, Caggiano N, Coppola MI, De Simone EA

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Argentina

*Email de contacto: cgiampaoli@fvet.uba.ar

RESUMEN

Los biomarcadores de la inflamación han sido estudiados en los últimos años en rumiantes destinados a la producción lechera. Específicamente, se ha estudiado la actividad de enzimas como la lactato deshidrogenasa (LDH) y las metaloproteasas de matriz tipo 2 y 9 (MMP-2 y 9). Esto ha dejado en evidencia un aumento de la actividad de estos biomarcadores en leche proveniente de animales con mastitis, tanto subclínicas como clínicas, en comparación con animales sanos. Sin embargo, estas enzimas también se encuentran presentes en procesos de remodelación normales de los tejidos, por lo que se planteó su estudio a lo largo de la lactancia en ovinos lecheros sanos, así como también en ovejas de primera parición y multíparas. De esta manera, se buscó establecer valores basales para la actividad enzimática de los biomarcadores seleccionados en animales sanos. En el caso de la MMP-2 y LDH se observaron valores mayores de actividad en lactancias avanzadas respecto al inicio de la lactancia (MMP-2= $143,5 \pm 102,5\%$; $P=0,0185$ y LDH= $107,7 \pm 56,95$ UI/L; $P<0,0001$). Por otro lado, la MMP-9 mostró valores muy bajos o nulos en animales sanos y no se observaron diferencias a lo largo de la lactancia. No se observaron diferencias significativas entre ovejas primíparas y multíparas. El estudio de estos valores permitirá establecer valores de corte para la actividad de los biomarcadores de la inflamación, colaborando con un diagnóstico más certero de los procesos de mastitis.

Palabras clave. MMP-2, MMP-9, lactato deshidrogenasa, ovinos lecheros.

ABSTRACT

Inflammatory biomarkers have been studied in recent years in the field of dairy production in ruminants. In previous studies, the activity of some enzymes such as lactate dehydrogenase (LDH) and matrix metalloproteases type 2 and 9 (MMP-2 and 9) was analyzed. These studies revealed an increase in the activity of these biomarkers in milk from animals with subclinical and clinical mastitis, compared to healthy animals. However, these enzymes are also present in normal tissue remodeling processes. Therefore, it was proposed to carry out this study throughout lactation in healthy dairy sheep, as well as in first-calving and multiparous sheep. The purpose was to establish basal values for the enzymatic activity of the selected biomarkers in healthy animals. In the case of MMP-2 and LDH, higher activity values were observed in advanced lactation compared to the beginning of lactation (MMP-2= $143,5 \pm 102,5\%$; $p=0,0185$ and LDH= $107,7 \pm 56,95$ UI/L; $p<0,0001$). On the other hand, MMP-9 showed very low or null values in healthy animals and no differences were observed throughout lactation. No significant differences were observed between primiparous and multiparous sheep in the activity of these biomarkers. The study of this data will allow us to subsequently establish cut-off values for the activity of the inflammatory biomarkers, collaborating with a more accurate diagnosis of mastitis processes.

Key words. MMP-2, MMP-9, lactate dehydrogenase, dairy sheep.

Recibido: marzo 2024

Aceptado: junio 2024

Introducción

En la última década, se ha investigado el uso de diversas moléculas como biomarcadores de procesos inflamatorios de la glándula mamaria en producción lechera vacuna, ovina y caprina. El análisis de su actividad en muestras de leche permitiría diagnosticar precozmente mastitis subclínicas, una de las patologías que más pérdidas provocan en la lechería, ya que impactan negativamente en el precio del producto y generan refugos tempranos de animales en edad productiva (Grant *et al.* 2016). Específicamente, se ha estudiado el rol de las metaloproteasas de matriz (MMP) y de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) como indicadores de inflamación, tanto en vacunos (Caggiano y De Simone 2021) como en ovinos (Sani *et al.* 2018). Las MMPs son una familia de enzimas proteolíticas, endopeptidasas dependientes de Zinc, cuya función principal es la de remodelar la matriz extracelular de diversos tejidos tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Coronato *et al.* 2012). Particularmente, la MMP-2 y la MMP-9, son gelatinasas y han sido ampliamente estudiadas en medicina por su rol primordial en procesos inflamatorios, enfermedades degenerativas y metástasis tumoral (Page-McCaw *et al.* 2007). La MMP-2 es expresada en condiciones normales por las células del estroma de la mayoría de los tejidos. La MMP-9, en cambio, está casi ausente en tejidos normales y la producen principalmente en condiciones de inflamación las células del endotelio capilar, monocitos, neutrófilos y macrófagos (Li *et al.* 2016). Por otro lado, la enzima LDH se encuentra ampliamente distribuida en el organismo intracelularmente, por lo que un aumento de sus dosajes puede denotar daño celular (Wellnitz *et al.* 2011).

En vacas lecheras se observó que los valores de MMP de tipo 2 y 9 y de LDH aumentan significativamente en procesos mastíticos (Caggiano y De Simone 2021). Sin embargo, las MMPs también actúan en procesos fisiológicos de remodelación de tejidos, como podrían ser los que involucran a la glándula mamaria durante el transcurso de la lactancia y a lo largo de la vida productiva (Page-McCaw *et al.* 2007). Estos mismos procesos podrían también repercutir en la actividad de la enzima LDH detectada en la leche. Por este motivo, la hipótesis que se planteó fue que los biomarcadores de inflamación presentan variaciones en ovejas sanas a lo largo de la lactancia y de la vida productiva. Nuestros objetivos fueron establecer valores basales de MMP-2, MMP-9 y LDH en ovejas sanas, comparando entre animales pre-destete y post-destete. Asimismo, se analizó si existen diferencias entre ovejas sanas primíparas y múltiparas.

Materiales y Métodos

Animales y diseño experimental

Se utilizaron ovejas Frisona del tambo de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires. En el tambo se realiza un manejo de media leche, que implica un destete parcial de las crías en una primera etapa para luego realizar el destete completo a los 75 días de edad en promedio. Durante los primeros quince días posparto los corderos están al pie de la madre y no se ordeña. Luego de transcurrido este tiempo, comienza el ordeño mecánico y las crías son separadas de la madre a la tarde, durante 16 h. Las ovejas se ordeñan al día siguiente por la mañana y luego del

ordeño se reúnen con sus corderos, permaneciendo con ellos durante 8 h. La duración total de la lactancia es de 200 días en promedio.

Se recolectaron muestras de leche cada 15 días a lo largo de dos ciclos productivos en 25 ovejas, en ambos ciclos. Durante este periodo de muestreos se pudieron obtener un total de 226 muestras de leche de ovejas sanas. Estas muestras se dividieron para su análisis, según el momento de la toma, en un grupo pre-destete ($n=136$) y un grupo post-destete ($n=90$) y de acuerdo al número de lactancias de la oveja muestreada, en grupo de primíparas ($n=21$) y grupo de múltiparas ($n=205$). A la totalidad de las muestras se le analizó la actividad de MMP-2 y MMP-9. Por otro lado, se analizó la actividad de LDH a un número menor de muestras, 68 pertenecientes al grupo pre-destete, 71 al post-destete, 11 del grupo primíparas y 128 múltiparas.

Toma de muestras

La toma de muestras se realizó previa al ordeño de cada oveja. En primera instancia, como parte de la rutina del tambo, se higienizó cada pezón. Luego se hizo la maniobra de despunte para corroborar la ausencia de mastitis clínicas (leche con grumos, sangre, coágulos, etcétera) utilizando una paleta de fondo oscuro. Posteriormente, se realizó el Test de Mastitis California (TMC) para determinar la presencia de mastitis subclínicas. Se consideraron sanas aquellas ovejas con un resultado negativo al TMC. Se muestrearon 10 ml de leche, del medio derecho por convención, en tubos plásticos que se mantuvieron refrigerados hasta su procesamiento.

Análisis de la actividad de MMP-2, MMP-9 y LDH

La actividad de MMP-2 y MMP-9 se midió mediante zimografía, mientras que la actividad de la LDH se midió mediante un kit comercial, según las instrucciones del fabricante (Wiener Lab, Argentina). La absorbancia se leyó mediante un espectrofotómetro a 340 nm de longitud de onda (Metrolab 1000, Argentina). La zimografía consiste en una electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE) con el agregado de gelatina 0,2% (Gruber *et al.* 1996). Al finalizar se obtiene un gel con fondo oscuro y se observan en él bandas claras que permiten visualizar la actividad gelatinolítica de las MMPs. El análisis de las bandas se realizó con el software *Image J* (National Institutes of Health - NIH, EEUU). La actividad se expresó como porcentaje respecto de un control que satura un 50% la densitometría.

Análisis estadístico

El análisis estadístico comparativo de los grupos pre-destete vs. post-destete fue realizado con el test T de Student. La misma prueba fue aplicada para el análisis entre primíparas vs. múltiparas. Se consideró un nivel de significación de $P<0,05$. Se utilizó el software GraphPad Prism 8.

Resultados y Discusión

La actividad de MMP-2 y LDH fueron significativamente mayores en el grupo de ovejas sanas post-destete en relación al grupo de ovejas pre-destete ($P=0,0185$ y $P<0,0001$, respectivamente). En contraste, la actividad de MMP-9 no

mostró diferencias significativas entre ambos grupos ($P=0,2194$). Por otro lado, no se registraron diferencias significativas entre ovejas primíparas y multíparas para ninguno de los biomarcadores analizados ($P>0,05$) (Tabla 1; Figura 1).

El incremento de la actividad de las MMP-2 y LDH en las lactancias avanzadas de ovejas sanas puede explicarse por el incremento de los procesos de remodelación de la glándula mamaria en esta etapa (Page-McCaw *et al.* 2007). Cuando se acerca el periodo de seca de la oveja, la glándula mamaria comienza a sufrir un proceso de involución en el que se reduce el número de acinos que producen la secreción láctea.

La involución gradual de la glándula mamaria está bajo el control endocrino, relacionado al descenso de los niveles de prolactina, hormona de crecimiento y factor de crecimiento similar insulina-1. Los niveles bajos de prolactina se consideran la señal principal para la apoptosis de las células epiteliales (García Sacristán 2018). Es así como pueden verse incrementados los niveles de la enzima LDH en leche, tras ser liberada de las células. Por otro lado, la MMP-2 estaría involucrada en la remoción del tejido, debido a su actividad de proteasa y su secreción estaría dada por las células del estroma. La ausencia de diferencias entre grupos en la actividad de MMP-9 se debe a la particularidad de esta

Tabla 1. Actividad de las enzimas metaloproteasas de matriz tipo 2 (MMP-2) y tipo 9 (MMP-9) y lactato deshidrogenasa (LDH) para los grupos de ovejas sanas pre-destete, post-destete, primíparas y multíparas. Los valores son medias $\pm$ 1DS. Los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos al comparar los grupos pre y post-destete ($P<0,05$). No se registraron diferencias significativas entre ovejas primíparas y multíparas ($P>0,05$).

Table 1. Activity of enzymes matrix metalloproteases type 2 (MMP-2) and type 9 (MMP-9) and lactate dehydrogenase (LDH) for the groups of healthy pre-weaning, post-weaning, primiparous and multiparous ewes. Values are means $\pm$ 1SD. Asterisks indicate significant differences between treatments when comparing the pre- and post-weaning groups ($P<0.05$). No significant differences were observed between primiparous and multiparous ewes ($P>0.05$).

Ovejas sanas	Pre-destete	Post-destete	Primíparas	Multíparas
MMP-2 (%)	115,7 $\pm$ 73,68	143,5 $\pm$ 102,5*	132,5 $\pm$ 95,17	126,2 $\pm$ 86,56
MMP-9 (%)	8,14 $\pm$ 20,06	5,32 $\pm$ 10,29	8,29 $\pm$ 14,24	7,08 $\pm$ 17,33
LDH (UI/L)	57,85 $\pm$ 25,65	107,7 $\pm$ 56,95*	73 $\pm$ 47,39	84,14 $\pm$ 51,26

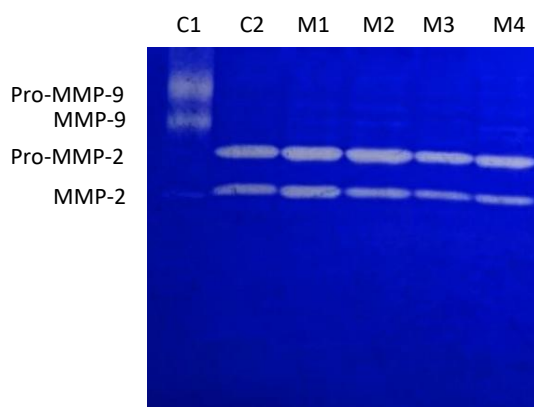


Figura 1. Zimografía SDS-PAGE en gel de poliacrilamida 10% con gelatina 0,2%. Se observan las bandas claras generadas por la actividad enzimática. C1: control MMP-9. C2: control MMP-2. M1: muestra post-destete. M2: muestra pre-destete. M3: muestra primípara. M4: muestra multípara.

Figure 1. SDS-PAGE zymography on 10% polyacrylamide gel with 0.2% gelatin. The clear bands generated by the enzymatic activity are observed. C1: MMP-9 control. C2: MMP-2 control. M1: post-weaning sample. M2: pre-weaning sample. M3: primiparous sample. M4: multiparous sample.

proteasa, de ser representativa de procesos patológicos como las mastitis, por lo que sus valores basales o nulos en ovejas sanas no permiten establecer diferencias notables a lo largo de la lactancia, ni entre ovejas de diferente edad. En estudios previos en vacas, se observó que la MMP-9 puede tener una actividad superior al 160% (respecto de una muestra control que satura un 50% la densitometría) en animales con mastitis provocadas por *Staphylococcus aureus*, siendo nula la actividad de esta proteasa en leche de vacas sanas (Caggiano et al. 2016). De aquí se desprende su importancia como molécula marcadora en procesos de mastitis, dada su potencialidad para evaluar el progreso de la patología y buscar con ello también el desarrollo de posibles tratamientos que disminuyan el efecto deletéreo de esta proteasa sobre el parénquima de la glándula mamaria en casos de enfermedad recidivante o de curso crónico.

Con respecto a la ausencia de diferencias entre ovejas primíparas y multíparas, si bien existen trabajos donde se reporta un aumento de la actividad de la enzima LDH en vacas y cabras con mayor número de lactancias (Stuhr et al. 2013), no se han informado resultados al respecto en ovejas. Considerando los resultados de este trabajo, se podría considerar que en la especie ovina el número de lactancias no es un factor de importancia en la actividad de estas enzimas.

Conclusiones

La actividad de las enzimas LDH y MMP-2 en ovejas lecheras sanas se incrementa a medida que avanza el periodo de lactancia. Esto nos indica que debemos ser cuidadosos con la interpretación de los resultados según el momento en que se tomen las muestras para diagnóstico de posibles mastitis subclínicas. Es por esto, que establecer valores basales teniendo en cuenta los cambios producidos en la glándula mamaria de las ovejas sanas, nos permitirá un estudio más fidedigno del estado sanitario de la glándula mamaria en ovinos de tambo.

Contribuciones de los autores

Giampaoli CL: escritura protagonista del artículo, ejecución de experimentos, obtención y procesamiento de muestras y análisis e interpretación de resultados. **Ochoa AS:** ejecución de experimentos y procesamiento de muestras. **Caggiano N:** diseño de los experimentos y escritura del proyecto. **Coppola MI:** implementación de la investigación y coordinación de la unidad productiva. **De Simone EA:** diseño de los experimentos, interpretación de los resultados, escritura del proyecto y responsabilidad por la integridad y coherencia del artículo.

Consideraciones de ética y bienestar animal

El estudio recibió el aval del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la

Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires, Argentina. Número de protocolo 2020/16.

Agradecimientos

Este trabajo contó con el financiamiento de la Universidad de Buenos Aires (Argentina) como parte del Proyecto UBACyT 20020190100092BA.

Bibliografía

- Caggiano N, Bottini JM, Lorenzo Smirnoff A, De Simone EA, Chiappe Barbará MA (2016) Determinación de biomarcadores moleculares en leche y su posible aplicación en el diagnóstico y tratamiento de la mastitis bovina. *InVet* **18**, 323-331.
- Caggiano N, De Simone EA (2021) Biomarcadores moleculares en mastitis bovina. *InVet* **23**, 1-10.
- Coronato S, Laguens G, Di Girolamo V (2012) Rol de las metaloproteinasas y sus inhibidores en patología tumoral. *Medicina* **72**, 495-502.
- García Sacristán A (2018) Fisiología Animal. (Tébar Flores: Madrid, España).
- Grant C, Smith EM, Green LE (2016) A longitudinal study of factors associated with acute and chronic mastitis and their impact on lamb growth rate in 10 suckler sheep flocks in Great Britain. *Preventive Veterinary Medicine* **127**, 27-36.
- Gruber BL, Sorbi D, French DL, Marchese MJ, Nuovo GJ, Kew RR (1996) Markedly elevated serum MMP-9 (gelatinase B) levels in rheumatoid arthritis: a potentially useful laboratory marker. *Clinical Immunology and Immunopathology* **78**, 161-71.
- Li H, Zheng H, Li L, Shen X, Zang W, Sun Y (2016) The effects of matrix metalloproteinase-9 on dairy goat mastitis and cell survival of goat mammary epithelial cells. *PLoS ONE* **11**, e0160989.
- Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z (2007) Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**, 221-233.
- Sani RN, Hajigolikhani B, Ahmadi-Hamedani M, Kafshdouzan K (2018) Diagnostic evaluation of milk lactate dehydrogenase and alkaline phosphatase activities by receiver operating characteristic analysis curve in early lactation of ewes with subclinical mastitis. *Veterinary Research Forum* **9**, 343-348.
- Stuhr T, Aulrich K, Barth K, Knappstein K, Larsen T (2013) Influence of udder infection status on milk enzyme activities and somatic cell count throughout early lactation in goats. *Small Ruminant Research* **111**, 139-146.
- Wellnitz O, Arnold ET, Bruckmaier RM (2011) Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different immune responses in the bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science* **94**, 5405-5412.