CETAP

GEL SELLADOR DEL CANAL DEL PEZÓN

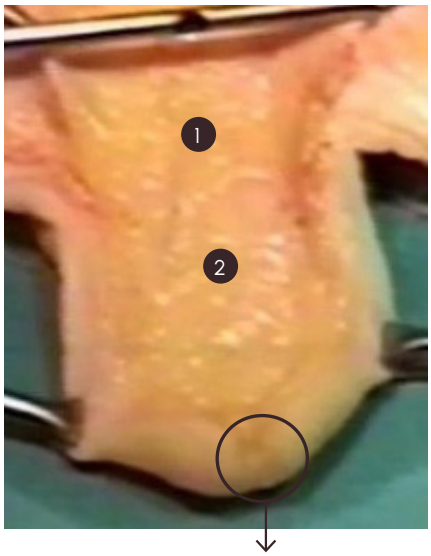
Laboratorio FUNDACION

EL CONCEPTO **CETAP®**

- Barrera física formada por una matriz de refuerzo polimérica.
- Facilitador fisiológico de la formación del tapón de queratina.
- Ayuda a una rápida recuperación del epitelio.

El ciclo productivo de una vaca lechera, inicia con la preñez cuando es vaquillona de primer servicio. Al llegar al parto, inicia el ciclo de producción lechera por un lado, y la rápida búsqueda de una nueva preñez que preparará el ciclo siguiente y así sucesivamente durante la vida útil del animal.

El ciclo de producción de leche comprende dos etapas:
Inicia con la lactancia, etapa donde se produce la leche, y dos meses antes de la fecha probable de parto, ingresa a la etapa de secado.
Este período es fundamental ya que es la etapa de descanso de la glándula en donde se recupera adecuadamente para la lactancia siguiente. Esta etapa tiene dos momentos críticos donde ocurren buena parte de las infecciones glandulares (1).
El primer período reconoce 24 a 72 hs en que se cierra el esfínter del pezón y los primeros 7 a 15 días posteriores al último día de producción.
Este tiempo es lo que demora probablemente lo más importante, "el sellado por un tapón de queratina" (2,19).



1. Cisterna de la glándula
2. Cisterna del pezón

LA UBRE QUE FORMA EL TAPÓN NATURAL DE QUERATINA SERÁ UNA UBRE PROTEGIDA

Esto no solo forma una barrera física contra la entrada de patógenos. Los ácidos grasos esterificados y no esterificados, entre otros componentes, presentes en la queratina inhiben el crecimiento bacteriano **(Ver recuadro 1)** (15, 16)
El segundo período es la semana previa al parto. Al llegar a esta etapa, con una buena recuperación y un óptimo tapón formado en el canal del pezón, las defensas del huésped protegen de nuevas infecciones incluso en situaciones ambientales adversas (3, 4, 6).
El aumento a la susceptibilidad de la glándula a una nueva infección en los períodos secos tempranos y tardíos puede deberse, en parte, a las concentraciones cambiantes de estos factores protectores durante los períodos de transición funcional, como fue planteado hace tiempo (32).

Se sabe que el riesgo de adquirir una nueva infección durante el período seco aumenta rápidamente con el nivel de producción de leche de las vacas (14, 20).
Está probado que hay una relación directa entre la producción de leche al momento del secado y el cierre intramamario de los pezones.
A medida que la producción de leche es mayor, los cuartos permanecen por más tiempo abiertos, sin queratina.
En cuartos cerrados, es decir aquellos en los cuales se ha formado el tapón natural de queratina, las infecciones aparecen hasta 3 veces menos que en aquellos cuartos no completamente cerrados (5).

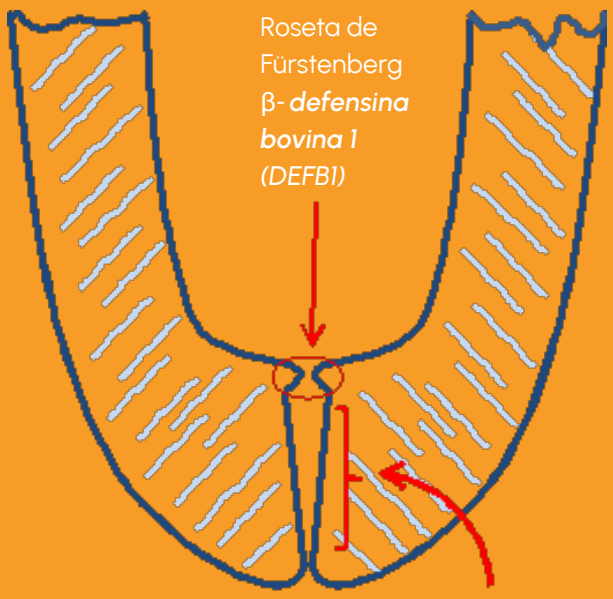
Dentro de este período los selladores juegan un rol muy especial y en particular, aquellos que se aplican en el interior, llamados selladores internos o selladores del canal del pezón.
Éstos tienen como finalidad cerrar el pezón mamario artificialmente. Los selladores más comunes, en uso desde hace unos 25 años, están formulados a base de un ungüento pastoso que contiene bismuto solo o combinado con sales de zinc.

Estas formulaciones constituyen una suerte de amalgama que introducida en el canal intramamario, actúan como tapón inerte frente a la mucosa de la cisterna del pezón, donde se ubica tras su aplicación. Constituye una barrera persistente, no tiene efecto curativo ni antibiótico (7, 8).

Recuadro 1: defensa glandular inducida por ácido hialurónico (AH)

La glándula mamaria bovina produce varias proteinas de defensa. Dos de ellas: **β-defensina bovina 1** *(DEFB1)* se expresa principalmente en el epitelio cisternal y la Roseta de Fürstenberg mientras que la **psoriasina** (proteína de unión a calcio **S100A7**) *se detecta en el canal estriado* y se ha informado que esta última es muy activa contra E Coli (25).

Ambas estarían inducidas por la presencia de ácido hialurónico (27,28).
Como pequeños péptidos catiónicos, las β-defensinas son atraídas preferentemente por las membranas externas cargadas negativamente de las bacterias, con eficacia reportada contra bacterias Gram positivas y Gram negativas por varios mecanismos, que incluyen la agregación, la formación de poros, la interferencia con la síntesis de la pared celular y la despolarización de la membrana procariótica (30,31)



CETAP®

BASE FARMACOLÓGICA

Un sellador interno IDEAL, debería cumplir con las siguientes premisas:

- Ser biocompatible, lo que implica:
  - Ausencia de citotoxicidad (lesión celular)
  - Fomentar, estimular o inducir la biosíntesis de queratina.
  - Ser amigable con las defensas del huésped (roseta de Fürstenberg)
  - Inocuo para el ternero.
  - Inocuo para el ser humano.
  - No absorbible.
- Que no se pierda calostro.
- Que no favorezca el desarrollo bacteriano.
- Ser biodegradable (no afecta el medio ambiente).
- No tiene descarte de carne o leche.

Aclarado estos conceptos básicos, veamos la función que cumplen los componentes constitutivos del **CETAP®**

POLISACÁRIDO 1

La hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), es un coloide hidrofílico derivado de la celulosa (el polisacárido más abundante de la naturaleza) (9). Las proporciones de los grupos metoxilo (16,5-30,0%) e hidroxipropoxilo (4,0-32,0%), determinan las características propias de los diferentes tipos de HPMC (9, 10). Se emplea en preparaciones oftálmicas como sustancia viscoelástica para cirugía tanto del segmento anterior como el segmento posterior del ojo (11), como componente humectante de formulaciones para xeroftalmia y queratoconjuntivitis sicca (12,13).

Su inclusión en una formulación selladora de pezón tiene un doble objeto: el primero, el de aportar un vehículo viscosante, con característica reológicas diferenciales conforme la temperatura corporal y el segundo el de actuar de matriz no reactiva.
Se trata de un biomaterial, lubricante, semi sintético, el cual formará la base de la matriz de refuerzo polimérico, a la que nos referiremos más adelante.

POLISACÁRIDO 2

La Poli-(D) glucosamina es un polisacárido lineal compuesto de cadenas distribuidas aleatoriamente de β-(1-4) D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina. Se obtiene de la quitina (21), el polisacárido natural más abundante en términos de ocurrencia estática luego de la celulosa y primero por su tasa de regeneración en la biósfera, que se estima el doble de la celulosa (2,3 x 109 toneladas/año sólo para crustáceos) (22). Hace poco más de una década que se lo emplea como conservante de alimentos por la ausencia de toxicidad (23).

Su inclusión en la fórmula selladora tiene la finalidad de actuar como conservante, ofrecer una matriz viscosante del refuerzo polimérico y proteger el hialuronato de sodio del ataque de las hialuronidazas.

POLISACÁRIDO 3

El hialuronato de sodio (AH) es un polisacárido del tipo de glucosaminoglucanos compuesto por repetitivos disacáridos poliméricos de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina unidos por enlaces β (1→3). Es una molécula presente en la dermis, el líquido sinovial, el humor acuoso y los tegumentos blandos de todos los mamíferos (28, 29).

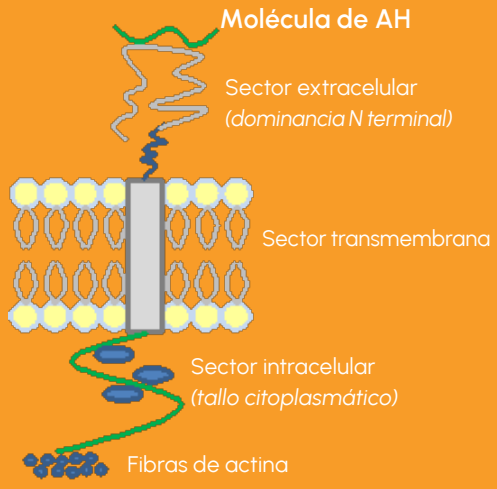
Aunque el mecanismo de acción requiere de mayor estudio, el hialuronato de sodio, a través de la glicoproteína CD44, intervendría, al igual que en otros epitelios, en la formación del tapón de queratina del canal estriado del pezón **(ver recuadro 2)**. Como se mencionó anteriormente, el AH- CD44, mejora la localización y extravasación de linfocitos (39, 40) y promueve la liberación de las defencinas **(ver recuadro 1)** al igual que se ha demostrado que el AH, presente en la leche (34), induce una elevada expresión de "defensina" que pueden contribuir a mejorar la defensa epitelial en el intestino del lactante (33), por igestion.
Su inclusión en la fórmula selladora tiene la finalidad de potenciar el AH endógeno (producido por el mismo tejido) para complementar la:

- Formación del tapón de queratina
- Robustez de las defensas del huésped

"desde principio a fin del periodo de secado".

Recuadro 1: inducción de los queratinocitos por el AH

AH- CD44 están localizados durante todas las etapas de reparación de los tejidos en la misma región del epitelio, especialmente alrededor de los queratinocitos (35, 36, 37).
CD 44 es una glicoproteína trans membrana que no solo aporta un pasaje de señal desde el exterior al interior celular (puntos azules), sino que efectúa cascadas de señalización a través del cito esqueleto de actina. Tiene varias funciones fisiológicas importantes en las interacciones célula - célula y célula-matríz, que incluyen proliferación, adhesión, migración y activación, y en linfocitos localización y extravasación (40, 41, 42).



CETAP®

LA MATRÍZ DE REFUERZO POLIMÉRICO

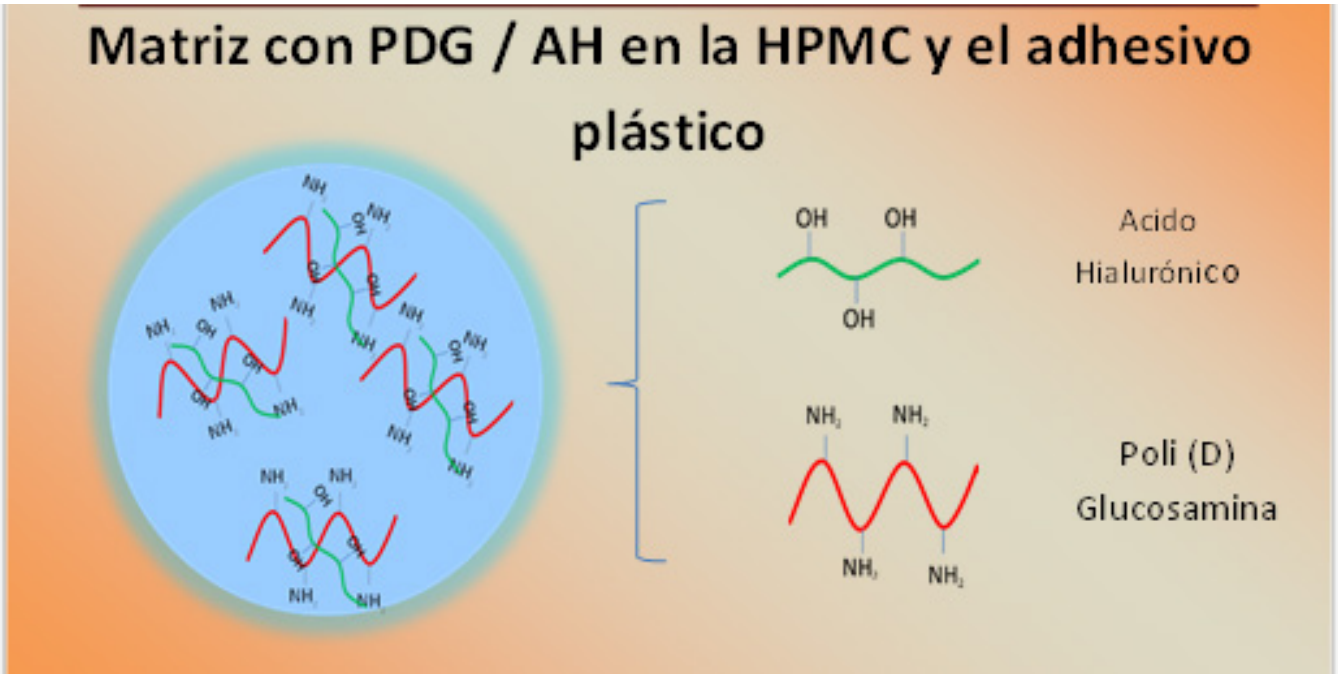
Al introducirnos en el concepto **CETAP®**, nos adentramos en el concepto de "biomateriales", donde se ha trabajado desde la farmacología molecular aplicando bioingeniería de polímeros, con la finalidad de obtener un producto capaz de entregar una respuesta mecánica tisular específica para la restauración de la función normal.

La matriz de refuerzo polimérico es un concepto que cumple con estas premisas, y provee 2 elementos funcionales que lo transforman en un producto adecuado para el sellado del canal:

- Constituye una matríz inerte que ofrece un sellado visco-elástico estable y no citotóxico.
- Aporta una molécula que induce la formación de queratina entrecruzada para el sellado fisiolófico del canal.

¿CÓMO FUNCIONA LA MATRÍZ?

La HPMC aporta grupos oxhidrilo, metoxilo e hidroxipropilo libres, constituyendo una masa transportadora de agua en micelas libres. Frente a los otros 2 polímeros y a pesar de estar en mayor proporción, actuará como un "elemento disperso" con afinidad hidrofóbica. El agua, que no tiene compromiso covalente, facilita la integración de los demás componentes. La Poli-D-glucosamina, por su parte, se comportará como polielectrolito con grupos potencialmente ionizables, con un valor de pKa = 6,3. Su conducta en medio acuoso se encuentra en gran medida dominada por esta capacidad, pero facilitada por la inducción.
Una desventaja de esta molécula es su falta de resistencia a la tensión, hecho que se ve resuelto cuando se liga con el hialuronato, el cual a pH fisiológico, presenta cargas negativas que facilitan la unión de las macromoléculas (44, 45).



De esta manera, una vez introducida la matriz en el interior del pezón, el hialuronato de sodio queda protegido de la acción inmediata de la hialuronidasa y la HPMC, aumenta su volumen por acción de la temperatura (~37oC).

Mientras esto ocurre, el adhesivo plástico facilita la adhesión de la matriz a la pared. In vitro se ha demostrado el posterior entrecruzamiento de la matriz de refuerzo polimérico con la mucina, y la posterior liberación del ácido hialurónico (32).

La unión de la mucina con la matriz polimérica facilita la liberación del ácido hialurónico (49), e induce la formación de queratina (50), al menos 2 veces más rápido que en su ausencia.

Aún se estudia el mecanismo de acción por el cual el hialuronato de sodio produce una quimiotaxis positiva (51) en la neogénesis de queratina, pero está claramente demostrado que son los queratinocitos los responsables de la formación endógena del hialuronato de sodio, que es liberado al espacio extracelular donde ejerce su efecto (52).

Un último punto a considerar es la ausencia de citotoxicidad de la matriz polimérica. Mediante un estudio efectuado en ANLIS-JJ Malbrán en conjunto con GLIF Science S.A., se pudo determinar que la matriz de refuerzo polimérico carece de efectos citotóxicos (Grado 0 conforme la norma ISO 10993-1 y 5).

EN RESUMEN

La matriz de refuerzo polimérico cumple la función de tapón (respuesta mecánica tisular específica), manteniendo la elasticidad natural del tejido y proveyendo una molécula naturalmente presente en la matriz extracelular, que facilita la biosíntesis y liberación de queratina (restauración de la función normal), garantizando la ausencia de sustancias por un lado dañinas para la salud de quien las consumiera y por otro por obstrucciones en la máquina de ordeño o la pérdida de calostro al descartar el primer ordeño.

BIBLIOGRAFÍA

1. Neave FK , Dodd FH, Henriques E; Udder infections in the 'dry period' I; J Dairy Res; 17:37; (1950).
2. Comalli MP, Eberhart RJ, Griel LC Jr, Rothenbacher H; Changes in the microscopic anatomy of the bovine teat canal during mammary involution; Am J Vet Res; 45(11):2236; (1984).
3. Bradley AJ, Green MJ, The importance of the nonlactating period in the epidemiology of intramammary infection and strategies for prevention Vet Clin North America: Food Animal Pract; 20:547; (2004).
4. Cousins CL , Higgs TM, Jackson ER, Neave FK, Dodd FH; Susceptibility of the bovine udder to bacterial infection in the dry period; J. Dairy Res.; 47:11; (1980).
5. Dingwell RT, Timms LL, Sargeant JM, Kelton DF, Schukken YH, Leslie KE; The association of teat canal closure an other risk factors for new dry period intramammary infections; Proceedings of the 42nd Annual Meeting of the National Mastitis Council; Forth Work, TX; January 2003; pp 298.
6. Ward GW, Schultz LH; Incidence and control of mastitis during the dry period; J. Dairy Sci.; 57-1341; (1974).
7. Woolford MW, Williamson JH, Day AM, Copeman PJA; The prophylactic effect of a teat sealer on bovine mastitis during the dry period; New Zealand Veterinary J; 46:12; (1998).
8. Zwick, Y.: Innovativer Trockensteller OrbeSeal. Neues vom World Buiatric Congress in Hannover. Nutztierpraxis Aktuell, Ausgabe 3, (2002)
9. Kumar V, Banker, G.: Chemically-Modified Celldlosic Polymers. Drug Dev. Ind. Pharm; 19:1; (1993).
10. Von Schantz L, Schagerlöf H, Karlsson EN, Ohlin M; Characterization of the substitution pattern of cellulose derivatives using carbohydrate-binding modules; BMC Biotechnology ;14:113; (2014).
11. Versura P, Maltarelo MC, Stecher F, Camarazza R, Laschi R; Dry Eye before and after Therapy with Hydroxypropyl Methylcellulose; Ophthalmologica; 198:152; (1989).
12. Toda I, Shinozaki N, Tsubota K; Hydroxypropyl methylcellulose for the treatment of severe dry eye associated with Sjögren's syndrome. Cornea; 15(2):120; (1996).
13. Cooper B, Bordeianu C, Nazarian A, Snyder BD, Grinstaff WM; Active agents, biomaterials, and technologies to improve biolubrication and strengthen soft tissues; Biomaterials; 181:210; (2018).
14. Rajala-Schultz PJ, Hogan JS, Smith KL; Short communication: Association between milk yield at dry-off and probability of intramammary infections at calving; J Dairy Sci; 88:577; (2005).
15. Hogan JS, Pankey JW, Duthie AH; Growth inhibition of mastitis pathogens by long-chain fatty acids; J Dairy Sci; 70:927; (1987).
16. Hogan JS, Smith KL, Todhunter DA, Schoenberger PS; Growth responses of environmental mastitis pathogens to long-chain fatty acids; J Dairy Sci; 71:245; (1988).
17. Oldham ER, Eberhart RJ, Lange AL, Bruso SL. Changes in the bovine teat canal during the nonlactating period and early lactation, as measured by teat canal impressions; Am J Vet Res; 52:2075; (1991)
18. Kurita K, Kaji Y, Mori T, Nishiyama Y; Enzymatic degradation of Chitin: susceptibility and the influence of deacetylation; Carbohydrate Pol; 42:19; (2000).
19. Dingwell RT, Leslie KE, Schukken YH, Sargeant JM, Timms LL, Duffield TF, Keefe G.P., Kelton D.F., Lissemore K.D., Conklin J.: Association of cow and quarter-level factors at drying-off with new intramammary infections during the dry period. Preventive Veterinary Medicine, 63 (2004), pp. 75-89.
20. Odensten M.O., Berglund B., Waller K.P., Holtenius K.: Metabolism and udder health at dry-off in cows of different breeds and production levels. Journal of Dairy Science, 90 (2007), pp. 1417-1428.
21. Dutta KP, Ravi-Kumar MNV, Dutta J; Chitin and Chitosan for versatile applications; J Macromol Sc; 42:307; (2002).
22. Goya RC, Morais STB, Assis OGB; Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on E. coli and S. aureus growth; Rev Br Farmacognosia; 26:122; (2016).
23. Lithander FE, Mcgill AT; The effect of the dietary supplement, Chitosan, on body weight: A randomised controlled trial in 250 overweight and obese adults. Int J Obesity; 28:1149; (2004).
24. Papakonstantinou E, Roth M, Karakiulakis G; Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging; Dermatoendocrinol; 4:253; (2012).
25. Tetens J, Friedrich JJ, Hartmann A, Schwerin M, Kalm E, Thaller G; The spatial expression pattern of antimicrobial peptides across the healthy bovine udder; J. Dairy Sci. 93 :775; (2010).

26. Gariboldi S, Palazzo M, Zanobbio L, Selleri S, Sommariva M, Sfondrini L, Cavicchini S, Balsari A, Rumio C; Low Molecular Weight Hyaluronic Acid Increases the Self-Defense of Epithelium by Induction of β-Defensin 2 via TLR2 and TLR4; J Immunology; 181;2103; (2008).
27. GF Dusio , D. Cardani , L. Zanobbio , M. Mantovani , P. Luchini , L. Battini , V. Galli , A. Diana , A. Balsari , C. Rumio; La estimulación de los TLR por LMW-HA induce mecanismos de autodefensa en el epitelio vaginal; Inmunol. Cell Biol; 89; 630; (2011).
28. Fraser JRE , Laurent TC, Laurent UBG; Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover; J Int Medicine; 242: 27; (1997).
29. Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J; Hyaluronic acid (hyaluronan): a review; Vet Medicina; 53:397; (2008).
30. Sorensen OE, Borregaard N, Cole AM; Antimicrobial peptides in innate immune responses; Contrib Microbiol; 15:61; (2008).
31. Sahl HG, Pag U, Bonness S, Wagner S, Antcheva N, Tossi A; Mammalian defensins: structures and mechanism of antibiotic activity; J Leukocyte Biol; 77:466; (2005).
32. Smith KL, Todhunter DA; The physiology of mammary glands during the dry period and the relationship to infection. Pag 87; Proc. 21st Annu. Mtg. Natl. Mastitis Counc; (1982).
33. Hill DR, Kessler SP, Rho HK, MK Cowman, de la Motte CA; Specific-sized hyaluronan fragments promote expression of human β-defensin 2 in intestinal epithelium; J Biol Chem; 287:30610; (2012).
34. Coppa GV, Gabrielli O, Buzzega D, Zampini L, Galeazzi T, Maccari F, Bertino E, Volpi N; Composition and structure elucidation of human milk glycosaminoglycans; Glycobiology; 21;295; (2011).
35. Oksala O, Salo T, Tammi R, Hakkinen L, Jalkanen M, Inki P, Larjava, H.; Expression of proteoglycans and hyaluronan during wound healing; J Histochem Cytochem; 43:125; (1995).
36. Parck UJ, Tsuchiya T; Park Increase in Gap Junctional Intercellular Communication by High Molecular Weight Hyaluronic Acid Associated with Fibroblast Growth Factor 2 and Keratinocyte Growth Factor Production in Normal Human Dermal Fibroblasts; Tissue Engineering; 8:419; (2004).
37. Pasonen-Seppanen S, Hyttinen JMT, Rilla K, Jokela T, Noble PW, Tammi M, Tammi R; Role of CD44 in the organization of keratinocyte pericellular hyaluronan; Histochem Cell Biol; 137,107; (2012).
38. Lee-Sayer SSM, Dong Y, Arif AA, Olsson M, Brown KL, Johnson P; The where, when, how, and why of hyaluronan binding by immune cells; Froint inmunol; 150:1; (2015).
39. Stamenkovic I, Aruffo A, Amiot M, Seed, B; The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate-bearing cells; EMBO J; 10:343; (1991).
40. McDonald B, Kubes P; Interactions between CD44 and hyaluronan in leukocyte trafficking; Front. Immunol; 6:68; (2015).
41. Bajorath G, Greenfield B, Munro SB, Day AJ, Aruffo A; Identification of CD44 Residues Important for Hyaluronan Binding and Delineation of the Binding Site; J Biol Chem; 273:338; (1998)
42. Skelton TP, Zeng C, Nocks A, Stamenkovic I; Glycosylation provides stimulatory and inhibitory effects on cell surface and soluble CD44 binding to hyaluronan; J. Cell Biol; 140- 431; (1998).
43. Gonen E, Nedvetzki S, Naor D, Shpigel NY; CD44 is highly expressed on milk neutrophils in bovine mastitis and plays a role in their adhesion to matrix and mammary epithelium; Vet Res; 39:29;(2008).
44. Severian D; Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility, Second Edition- 2004, CRC Press.
45. Kraisit P, Luangtana-Anan M, Sarisuta N; Effect of Various Types of Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC) Films on Surface Free Energy and Contact Angle; Adv Mats Research;1060-107; (2015).
46. Kumar Dutta P, Dutta J, Tripathi VS; Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications; J. Sci. Ind. Res; 63:20; (2004)..
47. Naveed M, Hasnat M Mirza Faran M, Baig A, Ihsan AU, Shumzaid M, Kakar MU, Khan jMK, Akabar MD, Hussain MI, Zhou G; Chitosan oligosaccharide (COS): An overview; Int. J. Biol. Macromol; 129: 827;(2019).
48. Kutlusoy T, Oktay B, Apohan NK, Süleymanoğlu M, Kuruca SE; Chitosan-co-Hyaluronic acid porous cryogels and their application in tissue engineering; Int. J. Biol. Macromol;103:366;(2017).
49. Liu HW, Mander L; Comprehensive Natural Products II, 1st Edition, Chemistry and Biology - 2010 - Elsevier Science.
50. Bourguignon LYW; Matrix Hyaluronan-activated CD44 signaling promotes keratinocyte activities and improves abnormal epidermal functions; Am J Pathology; 184:1912; (2014).
51. Almond A; Hyaluronan; Cell Mol Life Sci; 64:1591; (2017).
52. Sakai S, Yasuda R, Sayo T, Ishikawa O, Inoue S; Hyaluronan exists in the normal stratum corneum; J Invest Dermatol; 114:1184; (2014).