

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA



Facultad de Ciencias Veterinarias

Trabajo de tesis realizado como requisito para optar al título de Doctor en Ciencias Veterinarias

Depilado enzimático conservador del pelo: Injuria química y mecánica de la epidermis para incrementar los procesos difusivos

Garro María Laura

Director: Profesor Doctor Barbeito Claudio

Realizado en la Cátedra de Histología y Embriología. FCV, UNLP. Y en el Centro de Investigación y Tecnología del Cuero CITEC, M. Gonnet.

Miembros del Jurado:

Doctor Reinoso Hugo

Doctor Sofía Alberto

Doctor Drago Hugo

2012

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado sobre una idea original del Ingeniero Carlos Cantera director del Centro de Investigación y Tecnología del Cuero, CITEC.

Llegados al punto de escribir lo realizado en este período de investigación quiero guardar un espacio para dar las gracias a todas las personas que han hecho posible este trabajo

En primer lugar, gracias al Profesor Doctor Claudio Barbeito por su generosidad intelectual, darme la oportunidad de trabajar en su equipo, dirigir mi investigación, resolver todas mis dudas durante el trabajo en el laboratorio y durante la redacción, así como por la corrección de la misma, que parecía no tener fin.

Gracias a la Doctora Renata Bitar quien se hizo un lugar en la etapa del cuidado de su pequeña hija para acompañarme en este trabajo a pesar de la distancia.

Al Doctor Néstor Massa por darme la oportunidad de trabajar en Brasil y contactar a Renata.

A la Doctora Betina Galarza dispuesta siempre a resolver mis dudas y compartir sus conocimientos.

Al Histotecnólogo Rubén Mario por su colaboración en el desarrollo de las técnicas histológicas que fueron una parte indispensable para que esta investigación se pudiera llevar a cabo.

Y por supuesto, a mi padre por despertar en mí la curiosidad frente a la vida.

INDICE DE CONTENIDOS**AGRADECIMIENTOS.....II****INDICE.....III****A. RESUMEN.....1****B. SUMMARY.....3****C. INTRODUCCIÓN.....4****C.1. La Piel.....4****C.1.1. Epidermis..... 4****C.1.1.a. Queratinocitos..... 5****C.1.1.b. Cornificación.....8****C.1.1.c. Medios de unión.....9****C.1.2.Lámina Basal.....13****C.1.3. Dermis.....14****C.1.4. Anexos cutáneos.....15****C.1.4.a. Pelo.....15****C.1.4.b. Folículo piloso.....17****C.1.4.c. Glándulas sebáceas.....19****C.1.4.d. Glándulas sudoríparas.19.....**

C. 2. Cuero	20
C.2.1. Terminología	20
C.2.1.a. Etapas del curtido	24
C.2.1.b. Ribera	24
C.2.1.c. Curtido	27
C.2.1.d. Recurtido-Teñido y Engrase	27
C.2.1.e. Acabado	28
C.2.1.f. Depilado tradicional y No contaminante	29
C.2.1.g. Depilado enzimático	29
C.3. Accesibilidad dermis epidermis	30
C.4. Reactivos empleados en el experimento	31
C.4.1. Urea	31
C.4.1.a. Terpenos	32
C.4.1.b. Tensioactivos	33
C.4.1.c. Sulfito de sodio	34
C.4.1.d. Tripsina	35
C.5. Tripsina y depilado enzimático	37

D. HIPÓTESIS	38
E. OBJETIVOS	39
F. MATERIALES Y MÉTODOS	40
F.1. Diseño Experimental: Condiciones de ensayo .aplicadas durante el desarrollo de los experimentos	40
F.1.a. Materiales utilizados para soporte de las pieles	42
F.2. Esquema de pretratamientos empleados por duplicado	47
F.2.1.a. Soluciones, Sulfito de sodio y combinaciones	48
F.2.1.b. Emulsión de terpenos	48
F.2.1.c. Tensioactivo	49
F.2.1.d. Urea	50
F.3. Tratamiento	50
F.4. Técnicas	51
F.4.1. Histológicas	51
F.4.1.a. Inclusión en parafina	51
F.4.1.b. Tinciones	52
F.4 1.c. Coloración de hematoxilina eosina	53
F.4.1.d. Coloración Tricrómica de Masson	53
F.4.1.e. Coloración del reactivo de Schiff(Periodic Acid Shiff PAS)	54
F.5. Microscopia Electrónica de Transmisión	55

F.6. Difusión de colorantes. Adaptación a la piel de bovino de la técnica de Rosado y Monteiro.....	56
F.7.Espectroscopia Infrarroja Transformada de Fourier (FTIR).....	57
G. RESULTADOS.....	61
G.1. Microscopía Óptica.....	61
G.2. Microscopía Electrónica de Transmisión.....	65
G.3. Difusión de Colorantes.....	70
G.4.Espectroscopía.....	74
H. DISCUSION.....	81
I. CONCLUSIONES.....	91
J. BIBLIOGRAFIA.....	92

A. RESUMEN

Palabras clave: unidad pilosebácea- epidermis- tripsina

En la epidermis del bovino se encuentran lípidos intercelulares a nivel del estrato corneo que desempeñan un papel importante como barrera hidrofóbica. Esta barrera deberá transformarse para permitir el paso de enzimas depilatorias hacia la unidad pilosebácea y lámina basal. A su vez las enzimas no deben alterar el colágeno determinante de la calidad del cuero.

El objetivo de este estudio fue vulnerar la epidermis de piel de bovino utilizando distintos tratamientos previos a la aplicación de la enzima. Se utilizaron tensioactivos y sulfito de sodio como pretratamiento y posteriormente tratamiento con tripsina. El control fue tratado con buffer bicarbonato de sodio.

Se realizaron técnicas histológicas, microscopía electrónica de transmisión, difusión de colorantes y espectroscopía.

Los tratamientos generaron cambios de diferente intensidad en la morfología de la piel bovina y en la permeabilidad de esta a los colorantes.

Con microscopía electrónica de transmisión se observó pérdida de desmosomas que obedecerían al efecto de la tripsina. La lámina basal permaneció luego de los tratamientos, esto podría relacionarse con el tiempo de exposición a la enzima. El pretratamiento con sulfito generó desorganización fibrilar del colágeno, separación dermis epidermis y aumento en la difusión de colorantes. El sulfito cuando se combina con otros reactivos disminuye su efecto. Las técnicas estadísticas aplicadas en el análisis espectroscópico de los lípidos ubicados en los estratos

superficiales de la epidermis demostraron que no fueron alterados por el tratamiento con terpenos.

B. SUMMARY

Hair saving enzymatic unhairing process: Mechanical and chemical epidermis injury to increase diffusion.

Key Words: Pilosebaceous unit- epidermis- trypsin-

In bovine skin the main barrier for substances is located in the upper layer, stratum corneum, where intercellular lipids play a crucial role as hydrophobic barrier. This barrier must be transformed to allow enzymes reach the pilosebaceous unit and basal lamina without collagen damage. In the present study in bovine epidermis, surfactants and sodium sulphite were employed as pretreatment before trypsin. Bicarbonate buffer was used as control. Samples were analyzed with histological techniques, transmission electron microscopy, stain diffusion and spectroscopy. Skin morphology and stain permeability changed after the treatments. Loss of desmosomes observed with TEM could be consequence of trypsin. Persistence of the basal lamina after trypsin could be associated with the period of time used to study enzyme activity. Sulphite pretreatment caused disorganization of collagen fibrils, dermis -epidermis separation and increased stain diffusion. Also when sulphite was combined with reagents its effect decreased. Statistical studies applied in vibrational spectra of stratum corneum lipids demonstrate no alteration by terpenes.

C. INTRODUCCION

C.1. La piel

La piel es el órgano más extenso del cuerpo. Representa la barrera anatómica y fisiológica entre el animal y el ambiente. Actúa en la termorregulación mediante mecanismos de disipación del calor a través de la sudoración y la vasodilatación o por aislamiento térmico gracias al panículo adiposo y el pelaje. La piel también participa en la recepción de estímulos a través de receptores, en la síntesis de vitamina D₃ y en el almacenamiento de lípidos. Por último, representa un eslabón importante en la respuesta inmunológica frente a antígenos que entran en contacto con el organismo desde el exterior (1, 2,3).

C.1.1.Epidermis

La epidermis es la capa más externa de la piel, es un epitelio escamoso estratificado cornificado. El grosor de la epidermis varía con su localización. En las regiones donde hay una densa cubierta protectora de pelos la epidermis es delgada, pero en la piel desnuda como la de las uniones mucocutáneas, es más gruesa. En las almohadillas plantares, en las que hay una acción de desgaste considerable, la capa más superficial de la epidermis, el estrato corneo, se halla engrosado (3).

Las células de la epidermis se dividen en queratinocitos y no queratinocitos.

A los queratinocitos se los reconoce formando cinco estratos en distintos estados de diferenciación. Desde basal hacia apical, observamos primero las células en división del estrato basal, seguido por el estrato espinoso, el estrato granuloso, el estrato lucido, presente sólo en las regiones donde la piel es más gruesa, y el estrato corneo con los queratinocitos diferenciados anucleados (corneocitos). Los queratinocitos se sujetan a la lámina basal por hemidesmosomas y entre ellos están unidos por desmosomas.

En los epitelios estratificados como la epidermis, únicamente las células basales se encuentran unidas a la lámina basal. A su vez, estas células son las únicas mitóticamente activas, son las que reemplazan la pérdida de células superficiales del estrato más superficial.

Los no queratinocitos incluyen melanocitos (productores de melanina), células de Langerhans (células dendríticas presentadoras de antígenos que además regulan la proliferación de queratinocitos) y células de Merkel, estas últimas están ubicadas en la región basal, cumplen funciones de receptores y responden a estímulos sensoriales del sistema nervioso periférico (4).

C.1.1.a. Queratinocitos

Como ya se mencionó estas células se diferencian durante su vida y al ir modificándose van ocupando posiciones más apicales. Las transformaciones que se producen a lo largo de la diferenciación de los queratinocitos son las siguientes:

- Disminución de la actividad mitótica.

- Aumento y disminución de volumen.
- Aplanamiento.
- Síntesis de enzimas y lípidos estructurales.
- Formación de nuevas organelas.
- Lisis de proteínas y organelas.

El estrato basal se distingue fácilmente, está formado por una única capa de células cúbicas de núcleo grande en relación al tamaño celular, que descansa sobre la lámina basal. El citoplasma es intensamente basófilo. Estas células son mitóticamente activas y reemplazan la pérdida de células superficiales. Las células del estrato basal se mantienen unidas entre sí por desmosomas y a la lámina basal por hemidesmosomas. Desde estos desmosomas y hemidesmosomas parten tonofibrillas que ocupan gran parte del citoplasma, estas tonofibrillas están compuestas por filamentos intermedios del grupo de la queratina que forman parte del citoesqueleto.

El control del crecimiento y la diferenciación de los queratinocitos es un tema complejo que todavía no se conoce en su totalidad. Sí se sabe que la proliferación y la diferenciación son procesos excluyentes, que no pueden tener lugar de manera simultánea en la misma célula (1, 5,6).

A medida que se van generando, las células del estrato basal ascienden hacia el estrato espinoso compuesto por un número variable de capas de queratinocitos con un citoplasma menos basófilo. Estas células presentan su eje mayor paralelo a la superficie del epitelio y un núcleo aplanado dispuesto en una dirección similar. La denominación tradicional de esta capa celular hace referencia a los desmosomas

que mantienen unidas a las células entre sí. En esta localización los queratinocitos ya están sufriendo el proceso de diferenciación que los llevará a transformarse en escamas córneas. Apicalmente, se ubica el estrato granuloso caracterizado por la presencia intracelular de gránulos basofílicos conocidos como gránulos de queratohialina. Estos gránulos se componen de proflagrina, proteína que se transforma en filagrina y mantiene unidos los filamentos de queratina (1).

Además, unas organelas pequeñas, ovoides, sintetizadas en los estratos espinoso y granuloso se ubican cerca de la membrana celular de estas células y llegan a ocupar hasta el 15% de su volumen. Son los cuerpos laminares a partir de los que se liberan por exocitosis los lípidos intercelulares (5,6). Según Bowstra (7) frente a cierto tipo de señal, posiblemente el aumento en la concentración de calcio, estos cuerpos se trasladan hacia la periferia de las células granulares más superficiales y se fusionan con la membrana plasmática para secretar su contenido por exocitosis en los espacios intercelulares. Estos lípidos continúan modificándose y organizándose en láminas intercelulares, orientadas en forma paralela a la superficie celular. Luego de la extrusión en la interfase entre los estratos granuloso y córneo, los precursores lipídicos polares son transformados por enzimas en productos no polares y ensamblados en estructuras laminares que rodean a los corneocitos. Esta capa lipídica se compone de ceramidas, ácidos grasos y colesterol (8).

El cambio en la composición lipídica y la morfología celular culmina con la formación de una estructura densamente empaquetada en el estrato córneo: el sobre cornificado. Debido a la impermeabilidad del sobre cornificado, la principal ruta de penetración se ubica entre los corneocitos. Mientras que en los estratos viables de la epidermis las células se unen por desmosomas, en el estrato córneo los

desmosomas lentamente se desintegran y los corneocitos permanecen unidos por los lípidos intercelulares (7,8).

C.1.1.b. Cornificación

La cornificación es la parte final del proceso de diferenciación que ocurre cuando los queratinocitos van desplazándose hacia estratos más apicales. En esta etapa las células pierden sus núcleos, se aplanan, descargan lípidos por exocitosis en el espacio intercelular (estrato granuloso) y se llenan de filamentos de queratina dando origen al estrato corneo (9). Este estrato forma una lámina continua de células ricas en proteínas (corneocitos) embebidas en una matriz intercelular compuesta por lípidos no polares organizados en láminas (6, 7,10).

En la cornificación confluyen tres vías de síntesis bioquímica seguidas por el proceso catabólico de descamación.

Las tres vías son:

- Síntesis y organización de los filamentos intermedios de queratina
- Síntesis y dispersión de la sustancia que mantiene unidas a las células cornificadas.
- Formación de un sobre cornificado que representa la región más resistente del estrato corneo e interconecta la matriz de queratina intracelular con el cemento intercelular lipídico (5, 10,11).

C.1.1.c. Medios de unión entre las células epiteliales

El análisis de las modificaciones que produce la difusión de sustancias a través de la epidermis, exige conocer la organización de las estructuras que la componen y el modo en que se relacionan entre sí.

El ensamblaje de distintos tejidos y su organización dentro de los órganos están determinados por interacciones moleculares a nivel celular.

Las células en los tejidos pueden adherirse directamente entre sí. La adhesión entre célula y célula ocurre a través de proteínas integrales de membrana especializadas denominadas moléculas de adhesión celular: CAM.

A través de los dominios extracelulares las CAM median las interacciones adhesivas entre células del mismo tipo (adhesión homotípica) o entre células de diferentes tipos (adhesión heterotípica). A su vez una CAM puede estar unida directamente a otra CAM de la misma clase en una célula adyacente (unión homofila) o a una clase distinta de CAM, unión heterófila. Dentro de las CAM encontramos distintos grupos de proteínas como las cadherinas, las lectinas, las integrinas y las moléculas de adhesión de la superfamilia de las inmunoglobulinas.

Las CAM pueden distribuirse a lo largo de las membranas plasmáticas que contactan con otras células o agruparse en regiones especializadas denominadas uniones celulares o medios de unión. A su vez los dominios de las CAM orientados hacia el citosol reclutan un grupo de proteínas adaptadoras multifuncionales que actúan como conectores entre las CAM y elementos del citoesqueleto. Por otra parte existen moléculas de adhesión célula-matriz (como muchas integrinas) que conectan a la célula con el entorno extracelular.

Como las adhesiones intercelulares se asocian al citoesqueleto y las vías de señalización, los alrededores de la célula influyen en su forma y sus propiedades funcionales (efecto “externo-interno”) la conectividad y la comunicación se relacionan íntimamente con las propiedades de las células en los tejidos.

Estas uniones cumplen funciones especiales al impartir fuerza y rigidez a un tejido, transmitir información entre el espacio extracelular y el espacio intracelular, controlar el pasaje de iones y moléculas a través de las capas celulares y servir como conductos para el movimiento de iones y moléculas desde el citoplasma de una célula a su célula vecina.

Entre las numerosas variables que determinan la naturaleza de la adhesión entre dos células se encuentran:

- la afinidad de unión de las moléculas interactuantes (propiedades termodinámicas) ,
- las velocidades de “encendido-apagado “ de las asociaciones y disociaciones para cada molécula (propiedades cinéticas);
- la distribución espacial (agrupación, alta o baja densidad)de las moléculas de adhesión(geometría molecular) ,
- los estados activos e inactivos con respecto a la adhesión (propiedades bioquímicas) y las fuerzas externas como el flujo laminar o turbulento en las células del sistema circulatorio (propiedades mecánicas) (12,13).

Es posible reconocer tres tipos principales de uniones celulares; uniones de anclaje, uniones oclusivas o estrechas y uniones de hendidura. En general estos medios de unión poseen tres componentes:

1. proteínas adhesivas que conectan una célula a otra: CAM,

2. proteínas adaptadoras que conectan las CAM con el citoesqueleto
3. los filamentos del citoesqueleto.

La resistencia al estrés físico de tejidos como el músculo cardíaco y la epidermis depende de adhesiones fuertes entre las células; dadas por los desmosomas y puntos de contacto similares a botones, denominados a veces, desmosomas puntuales (14).

A su vez, los hemidesmosomas, en la superficie basal de las células epiteliales anclan el epitelio a la matriz extracelular subyacente. Existen haces de filamentos intermedios que recorren la superficie de la célula e interconectan los desmosomas y los hemidesmosomas, lo que imparte forma y rigidez a la célula.

Los desmosomas y los hemidesmosomas también transmiten fuerzas de fricción desde una región de una capa celular hasta el epitelio en su totalidad y proporcionan rigidez a toda la capa celular. Este tipo de uniones son muy importantes para mantener la integridad de la superficie epitelial.

Las principales moléculas de adhesión CAM que componen los desmosomas son miembros de la familia de las cadherinas: desmocolina y desmogleina que poseen dominios citosólicos distintos a los de las cadherinas clásicas. Los dominios citosólicos de las cadherinas desmosómicas interactúan con proteínas adaptadoras (placofilina y placoglobina) que forman las placas citoplasmáticas gruesas características de los desmosomas (12,13).

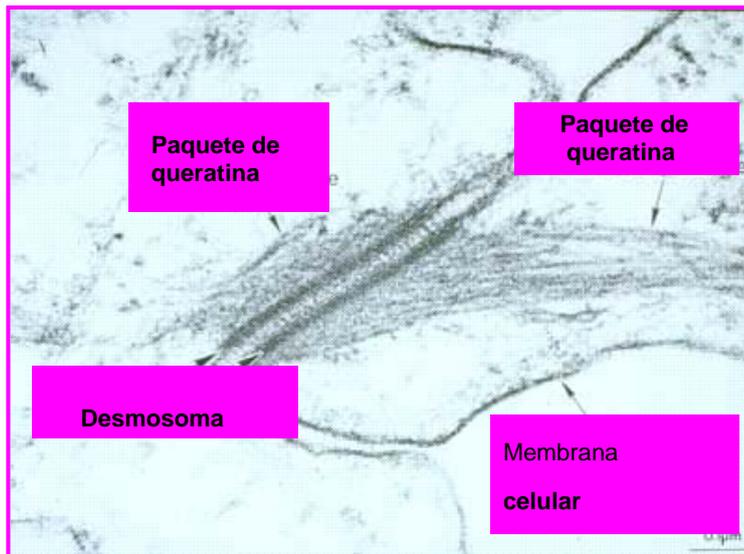


Figura 1. Ultrajestructura de un desmosoma citado junio 2012 tomada de : [Online] www.humpath.com

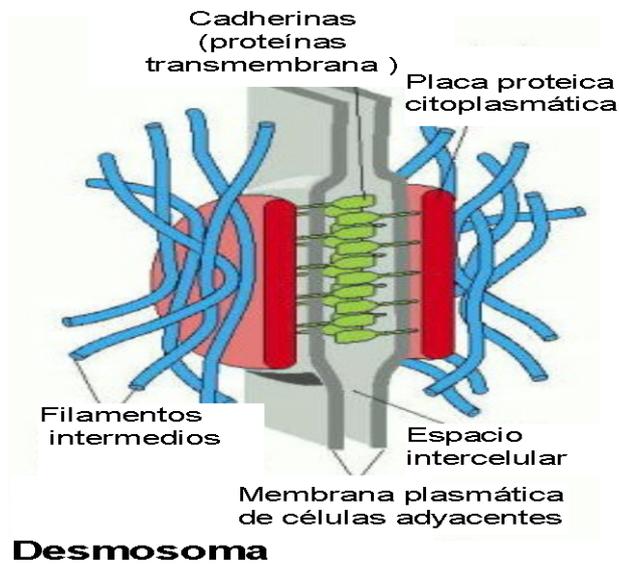


Figura 2. Esquema de la arquitectura molecular de un desmosoma. Tomado de Alberts, 2005 (13).

C.1.2.Lámina Basal

El término membrana basal hace referencia a una estructura que es detectable con la microscopía óptica como una banda delgada y homogénea positiva a las técnicas de PAS y de reticulina, entre otras. La microscopía electrónica reveló que está formada por una lámina basal, secretada especialmente por el epitelio, y una lámina reticular, formada por fibras reticulares originadas por los fibroblastos del tejido conjuntivo

La lámina basal tiene como funciones principales: unir firmemente la epidermis a la dermis, determinar la polaridad de la epidermis, permitir el pasaje selectivo de sustancias entre la dermis y la epidermis, ofrecer una barrera contra la migración epidérmica hacia la dermis, pero a su vez permitir los movimientos celulares epidérmicos en los procesos de reparación de heridas. Al finalizar el armado de esta lámina, cada célula epidérmica la reconoce como su superficie basal. La estratificación de la epidermis se produce con células en proliferación adheridas a la lámina basal y células hijas migrando hacia los estratos superiores (2, 3, 15, 16, 17). Existe consenso para afirmar que la lámina basal influye en la diferenciación de la epidermis y mantiene el estado de proliferación de la capa basal. En estado normal previene el contacto directo de las células de la epidermis con la dermis. Contiene estructuras únicas que la mantienen unida a la epidermis. A su vez, los componentes de este sistema complejo unen la red de filamentos intermedios

intracelulares de los queratinocitos basales con la matriz extracelular de la dermis papilar. La mayoría de los componentes de la lámina basal son sintetizados por las células que reposan sobre ella. La arquitectura molecular de esta lámina consiste en un retículo bidimensional formado principalmente por colágeno tipo IV, laminina y entactina (nidógeno); esta última forma enlaces cruzados entre el colágeno tipo IV y la laminina y al mismo tiempo ayuda a incorporar otros componentes a la matriz extracelular. También se encuentran proteoglicanos que interconectan a la matriz extracelular con la superficie celular (12,13). La lámina basal a su vez se divide en lámina lúcida y lámina densa. La lámina densa se compone principalmente de colágeno tipo IV. La lámina lúcida, ubicada entre el epitelio y la lámina densa forma placas electrondensas que forman parte de los hemidesmosomas y contienen principalmente integrina $\alpha 6\beta 4$ y antígeno bulloso penfigoide (18).

C.1.3. Dermis

La dermis se compone de tejido conectivo con abundante vascularización e inervación. Sirve de soporte a la epidermis y se continúa en profundidad con el tejido subcutáneo. Su estructura es semejante a la de otros tejidos conectivos. Posee sustancia fundamental compuesta por glicosaminoglucanos y proteoglicanos, fibras de colágeno y elásticas, fibroblastos, macrófagos y células cebadas. En menor proporción hay linfocitos, células plasmáticas, neutrófilos y eosinófilos (1).

La gran cantidad de colágeno confiere a la dermis fortaleza mecánica, factor importante para su función protectora y base de la transformación de la piel en cuero.

Se reconocen en la dermis dos zonas o capas de límites poco precisos, la capa papilar superficial que envía extensiones a la epidermis en forma de papilas y la reticular más profunda. La capa papilar se amolda al estrato basal y se compone de tejido conectivo laxo. En las papilas se pueden ver asas capilares. Se encuentran también los corpúsculos de Meissner que son receptores táctiles y terminaciones nerviosas libres, sensibles a la temperatura (2,19).

La capa reticular profunda es más gruesa y densa. Contiene grandes haces de fibras colágenas. Los folículos pilosos, las glándulas sebáceas y sudoríparas, los vasos sanguíneos y linfáticos y los nervios se hallan situados en distintos niveles de la dermis (1,2, 3,19).

C.1.4. Anexos Cutáneos

C.1.4.a. Pelo

Los pelos son estructuras flexibles queratinizadas producidas por el folículo piloso. Es posible representar al pelo en diferentes partes: la región distal o libre, por encima de la piel, es el eje o tallo del pelo. La parte fija en el interior del folículo, es la raíz del pelo que posee una protuberancia terminal, el bulbo, sujeto a la papila dérmica (Fig.3).

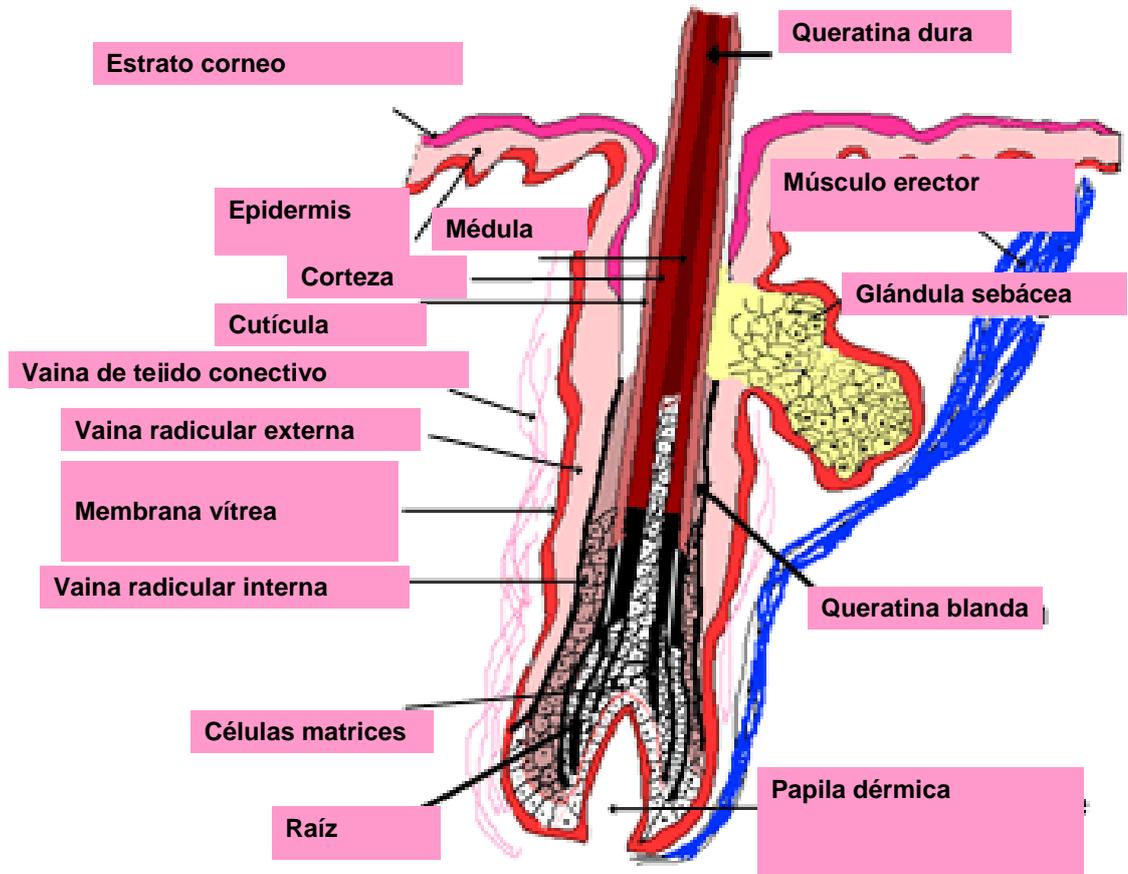


Figura 3. Representación esquemática de la estructura de la sección longitudinal del complejo pilosebáceo.

Modificado de: Histology Guide Faculty of Biological Sciences, University of Leeds.

October 2011 [Online] http://histology.leeds.ac.uk/skin/skin_layers.php.

A su vez el tallo del pelo se compone de tres capas: una externa o cutícula, un córtex o corteza de células queratinizadas y una médula de células cúbicas o aplanadas.

La cutícula está formada por una sola capa de células planas queratinizadas que se superponen como un tejado con los bordes libres dirigidos hacia el extremo distal.

El córtex se compone de una capa densa y compacta de células queratinizadas con sus ejes paralelos al eje del pelo. La médula forma la parte central del pelo. Está compuesta por células cúbicas o aplanadas entre las que se encuentran vacuolas de aire.

La forma de la superficie de las células cuticulares, al igual que la disposición celular de la médula, es característica de cada especie y es utilizada con fines médico legales (2, 3, 19).

C.1.4.b.Folículo Piloso

Los folículos pilosos son invaginaciones tubulares de la epidermis alojadas en la dermis. Por lo general se disponen en forma de ángulo agudo con la base en forma de bulbo orientada hacia la hipodermis (1,3) (Fig.3). La estructura histológica de los folículos es muy compleja, la integran varias capas de células que envuelven a la raíz del pelo. Cerca de la raíz del pelo, la vaina mas interna es la vaina radicular interna de la raíz que está formada a su vez por la cutícula interna, la capa de Huxley media y la capa de Henle externa.

La cutícula de la vaina radicular interna está formada por células cornificadas superpuestas, similares a las del pelo, pero, en este caso, con los bordes orientados hacia el bulbo. Esta disposición es consecuencia de la fuerte implantación de la raíz en el folículo.

La capa de Huxley está formada por una a tres capas de células queratinizadas ricas en gránulos de trichialina. La capa de Henle es la más externa, está compuesta de una sola capa de células queratinizadas anucleadas. Al llegar a la desembocadura de la glándula sebácea, la vaina interna se adelgaza y las células se funden y forman parte de la secreción sebácea.

La vaina radicular externa se extiende desde la matriz hasta la epidermis. Está formada por varias capas de células similares a las del estrato espinoso de la epidermis con el que se continúa en la parte superior del folículo. Esta vaina está rodeada por una membrana homogénea de aspecto vítreo que corresponde a la lámina basal de la epidermis, por fuera se observa una vaina de tejido conectivo.

Las células que revisten la papila dérmica, y que componen la mayor parte del bulbo piloso, son las células matrices del pelo. Pueden compararse con las células germinativas de la epidermis y dan origen a las células que se queratinizan para formar el pelo. Estas células sintetizan una queratina muy dura rica en aminoácidos sulfurados. El proceso de cornificación es continuo en la epidermis, pero en el folículo piloso es intermitente permitiendo un cambio estacional del pelo en los animales domésticos. El pigmento del pelo deriva de los melanocitos epidérmicos ubicados sobre la papila dérmica.

Además, se observan en la dermis haces de fibras musculares lisas que forman el músculo erector que se inserta en la vaina de tejido conectivo del folículo y se extiende hacia la epidermis en donde se fija a la capa superficial de la dermis (1,3).

C.1.4.c. Glándulas Sebáceas

Las glándulas sebáceas son glándulas alveolares compuestas de secreción holócrina más desarrolladas en los animales domésticos que en el hombre. Constan de varios lóbulos de pequeño tamaño formados por alveolos alargados. La secreción de sebo implica la liberación de células completas y de su contenido (secreción holocrina). Las células más cercanas al conducto mueren y se desintegran, y tanto sus restos celulares como los lípidos que almacenan contribuyen a formar el sebo. Están situadas junto a los folículos pilosos por encima de la inserción del músculo erector del pelo, y su conducto se abre en el canal folicular que rodea el tallo del pelo. Los conductos de las glándulas están tapizados por un epitelio estratificado queratinizado que se continúa con el folículo piloso. Su producto de secreción es el sebo; mezcla de lípidos en los que predominan los triglicéridos y los ácidos grasos libres (1).

C.1.4.d. Glándulas sudoríparas

Las glándulas sudoríparas pueden ser ecrinas o apocrinas, las últimas son las más abundantes en el bovino y están distribuidas por toda la superficie corporal. Son glándulas tubulares simples con un adenómero contorneado. Están situadas profundamente a las glándulas sebáceas, el conducto excretor termina en el istmo

del canal folicular, por encima del conducto sebáceo. La porción secretora está constituida por una monocapa de células epiteliales cilíndricas rodeadas de células mioepiteliales. La secreción incluye la liberación de fragmentos de citoplasma apical de las células epiteliales a la luz de la glándula.

Las glándulas sudoríparas ecrinas, también denominadas merocrinas, son glándulas simples, de adenómeros contorneadas, presentes exclusivamente en las almohadillas plantares. Su largo conducto excretor se abre en la epidermis. La porción secretora consta de una monocapa de células cúbicas o cilíndricas rodeadas de células mioepiteliales. Secretan una solución acuosa que contiene sodio, potasio, cloro y bicarbonato (1).

C.2. Cuero

C.2.1. Terminología

El cuero se obtiene mediante la estabilización química del colágeno de la piel de vertebrados. Si bien cualquier piel de vertebrado puede convertirse en cuero, las más utilizadas para este fin son las de bovino, ovino y caprino. Se trata de un material de características distintas a la piel original (20).

En el vocabulario de curtiembre se utiliza una nomenclatura particular que no siempre coincide con la de la histología. Se denomina “flor” (grain layer) a la “zona” que contiene los folículos pilosos. Después de la depilación, los folículos vacíos brindan el aspecto superficial característico del cuero de cada especie. La flor varía también de acuerdo a la edad, la región anatómica y el sexo del animal.

En esta especialidad, la dermis es designada como "corium". El corium a su vez, se divide en una zona cercana a la epidermis denominada "capa papilar" que define el aspecto del cuero y otra "reticular" que limita con la hipodermis (Fig.4)(23) y otorga las propiedades mecánicas al cuero terminado (20, 21). A pesar de que no existe una línea concreta de demarcación entre estas dos regiones, es posible determinar una división a la altura del bulbo del folículo piloso (22). En algunos casos la hipodermis es denominada endodermis (Fig.5).

A su vez, el patrón de estructura y distribución de las fibras de colágeno es característico de cada especie, aunque es similar en vaca, cabra y oveja. También es propio de cada especie el espesor total de la piel y el que ocupa la capa flor dentro de ella. En el bovino el espesor total de la piel es de 4 a 6 mm, las fibras del corium son relativamente grandes y la flor ocupa un sexto del espesor total de la piel. (Fig.6).

En oveja y cabra, el espesor total de la piel varía entre 1 y 2 mm, el corium posee manojos relativamente finos y la flor ocupa la mitad del espesor total.

Esta variedad de estructura ofrece materiales diferentes al curtidor quien deberá seleccionar los que reúnan las propiedades estéticas y mecánicas deseadas para el objetivo de su trabajo (20).

Figura.4.Corte de piel en que se señalan los términos específicos utilizados en curtiembre.

Modificado de Thorstensen,1976 , (23)

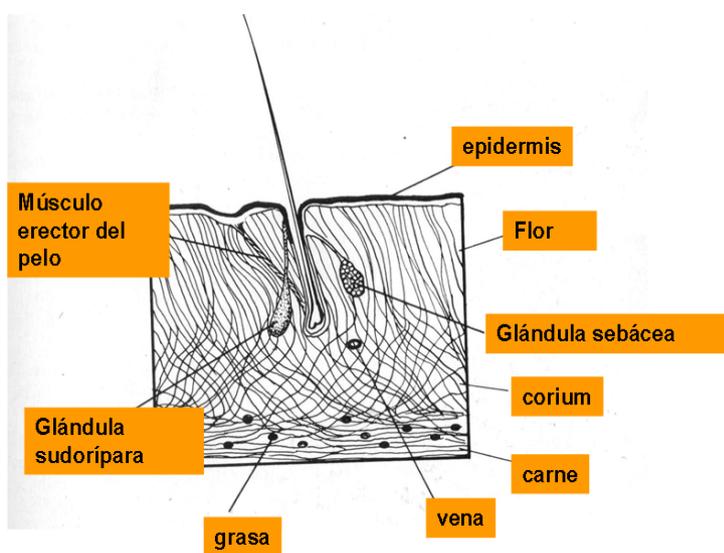


Figura 5. Esquema de piel. Denominaciones utilizadas en curtiembre. Modificado de INTI cueros.



Figura 6. Microfotografía de un corte histológico de cuero bovino curtido sin colorear.
10 X.

C.2.1.a. Etapas del curtido

El “Proceso de Curtido” comprende la industrialización de pieles que se utilizan en la elaboración de diversos objetos de piel con valor comercial (Fig.7)

Este procedimiento se realiza en base a técnicas y formulaciones adquiridas por experiencia del curtidor a lo largo de sus años de trabajo, por lo que las cantidades de productos químicos y tiempos de operación utilizados no son constantes.

Es posible resumir en cuatro etapas el ciclo de la elaboración del cuero: ribera, curtido, recurtido y acabado (24).

C.2.1.b. Ribera

Ribera: en esta fase se incluye un conjunto de operaciones mecánicas y químicas destinadas a eliminar de la piel los componentes innecesarios para la producción de cuero (25).

Este tramo comprende:

- remojo,
- depilado-encalado,
- desencalado,
- purga enzimática.

Remojo: La piel del bovino puede llegar a la curtiembre conservada en sal gruesa o fresca desde el frigorífico. Cuando fue conservada en sal gruesa el ciclo de curtición comienza con el remojo. En los casos en que no hubo conservación se pasa directamente a la etapa siguiente; el depilado. El objetivo del remojo es hidratar y limpiar la piel de los restos de suciedad que acumularon los animales encerrados en el matadero y eliminar los componentes que no serán transformados en cuero. Se utilizan como auxiliares sustancias alcalinas, como hidróxido o sulfuro de sodio, para lograr la “apertura” de las fibras y acelerar la rehidratación (26). También se agregan tensioactivos para remover las grasas (27).

El volumen de agua que se emplea se calcula en relación al peso de la piel y en función del equipamiento del curtidor. Es muy importante además el agregado de hialuronidasas y proteasas para hidrolizar los “componentes no colagénicos” que incluyen: glicosaminoglicanos (como el ácido hialurónico y el coindroitin sulfato), proteínas no estructurales del tejido conectivo y proteínas plasmáticas (globulinas y albúmina), ya que su presencia dificulta la difusión de los reactivos del curtido (28).

Al finalizar el remojo, el colágeno queda preparado para las etapas posteriores (24, 26).

Depilado-encalado: Durante el depilado, en el procedimiento tradicional destructor del pelo se eliminan el pelo y la epidermis con sulfuro de sodio Na_2S y cal. El Na_2S produce la hidrólisis del enlace disulfuro del aminoácido cistina de la queratina. La cal provoca la tumefacción de las fibras_manteniendo la alcalinidad del proceso (24).

Al mismo tiempo, el desarrollo de procesos de depilado conservador del pelo -con sus diferentes modalidades- está produciendo en la industria curtidora mundial un

desplazamiento de las tecnologías tradicionales. El depilado sin el uso de Na_2S representó un gran desafío a nivel internacional especialmente en las décadas de 1960 y 1970.

Los argumentos rectores de este cambio tecnológico fueron la disminución de la contaminación de las aguas residuales del sector de la ribera, la recuperación del pelo parcialmente degradado; residuo con potenciales aplicaciones industriales y la obtención de pieles adecuadas para la producción de diferentes tipo de cueros. Este tipo de tecnología ha comenzado a utilizarse en las curtiembres de algunos países en reemplazo del depilado tradicional destructor del pelo.

El gran desafío consiste en desarrollar un depilado con el empleo de preparados enzimáticos con actividad proteolítica. A modo de péndulo, el interés por esta técnica va y viene intentando solucionar las dificultades que aparecen cuando se pretende depilar sin Na_2S . Este procedimiento necesita para su aplicación que la actividad de la enzima esté restringida a la epidermis y pelo (29,30,31,32,33).

Desencalado: En esta fase se quita la cal residual de la fase anterior, de este modo se regula la tumefacción. Con este propósito se utilizan sulfato de amonio y metabisulfito de sodio. El pH se adapta al pH óptimo de las enzimas que se utilizarán en la etapa siguiente. La reducción de la tumefacción del colágeno en el vocabulario de curtiembre se denomina “caída” (22, 26).

Purga enzimática: Se aplican enzimas que eliminan el material que no será transformado en cuero (epidermis y pelo) y de esta manera se genera un cuero más flexible (22, 24,26).

Al finalizar esta etapa se obtiene una piel limpia o en “tripa” que será curtida con cromo o vegetales.

C.2. 1.c. Curtido

En esta segunda etapa antes de adicionar el curtiente, se realiza el “piquelado”; complemento del desencalado. Para el piquelado se agregan ácidos orgánicos e inorgánicos para finalizar la liberación del calcio que quedó unido al colágeno. Se detienen las acciones enzimáticas y se adecua el pH a 1, 8/3,5 dependiendo del artículo que se quiere fabricar. Se utiliza principalmente ácido sulfúrico.

Una vez piquelada la piel, se agregan sustancias orgánicas (sintéticas o naturales) o inorgánicas (minerales) para estabilizar las proteínas. Como curtientes naturales podemos mencionar la acacia, la mimosa, el quebracho y el castaño. Todos estos vegetales contienen taninos. Los curtientes inorgánicos son sales que liberan metales en solución y en la piel reaccionan formando compuestos de coordinación muy estables. Las sales utilizadas contienen cromo por lo que la piel que se obtiene luego de este tratamiento modifica su color y se denomina wet blue o cuero azul (24).

C.2.1.d. Recurtido-Teñido y Engrase

El recurtido aporta la suavidad necesaria al cuero para lograr en el artículo final la propiedad denominada carácter del cuero. Estas características son relleno, tacto, y esponjosidad. En esta fase se utilizan los mismos reactivos que en el curtido. El teñido consiste en darle color al cuero en todo su espesor o en la superficie (26).

C.2.1.e. Acabado-Terminación

Aquí es donde se realizan operaciones mecánicas que orientan las características del producto hacia las exigencias del mercado. Estas cualidades se obtienen mediante el grabado y pulido manual o mecánico (24).

Las etapas realizadas para la generación del cuero se esquematizan en la figura 7.

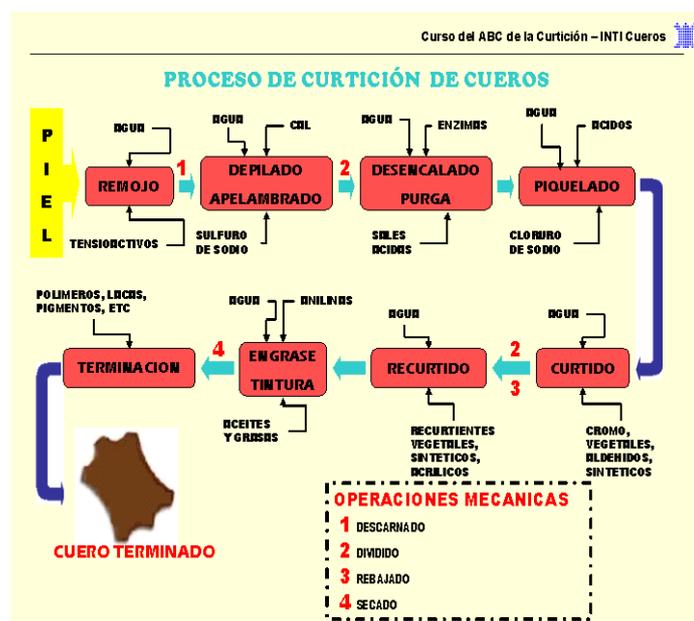


Figura.7. Etapas del proceso de curtido, tomado del Curso del ABC de la Curtición- INTI cueros, 2010

C.2.1.f. Depilado tradicional y No contaminante

La industria curtidora genera una variedad de desechos potencialmente tóxicos que dependen del proceso de depilado utilizado. Para atenuar esta contaminación se desarrollaron sistemas alternativos de depilado, entre ellos el enzimático. En las últimas décadas se está intentando generar un cambio de tecnología que propone disminuir la contaminación de las aguas residuales del sector de la ribera, recuperar el pelo parcialmente degradado (residuo con potenciales aplicaciones industriales) además de producir pieles adecuadas para la elaboración de diferentes tipos de cueros (31,32). Una de las técnicas principales propone el depilado con proteasas en reemplazo del Na_2S , en este caso es importante controlar la proteólisis y evitar que la actividad enzimática se extienda hacia el colágeno desmereciendo la calidad del cuero final (33).

C.2.1.g. Depilado enzimático.

El depilado enzimático ideal debería permitir la separación entre la vaina externa de la raíz del pelo y el tejido conectivo que la rodea dando lugar de este modo a la eliminación completa del pelo.

Los procesos difusivos a través de los estratos de la epidermis, desempeñan un papel preponderante para que las enzimas alcancen más rápidamente sus sitios de acción y expresen su actividad depilatoria. La epidermis se presenta como una

barrera que es necesario atravesar, por lo que debe prestarse debida atención a su composición y morfología para encontrar mecanismos que permitan vulnerarla antes de la acción depilatoria de las enzimas (33). En los últimos años se ha considerado en forma creciente la importancia de la vía transapendicular (también denominada transfolicular) para el transporte de sustancias. Esta vía implica la difusión a través de la unidad pilosebácea compuesta por el folículo piloso, pelo, músculo erector del pelo y glándulas sebáceas asociadas (34).

Se debe entonces vulnerar la piel y generar “canales difusivos” fácilmente accesibles para acercar más rápidamente a las enzimas a los lugares de acción y minimizar el acercamiento de éstas a través de la dermis. La acción prolongada de las enzimas sobre la estructura colagénica desmerece la integridad de esta capa dando lugar a pérdida de elasticidad, de estructura y de soltura de flor. El desafío superior es confinar la actividad proteolítica a la epidermis, folículo piloso/pelo y lámina basal para ocasionar una completa remoción de estos componentes (33).

C.3.. Accesibilidad de la dermis y la epidermis

Trabitzch (35) en referencia al aflojamiento del pelo, sugirió que a pesar de ser mayor el espesor del corium en comparación con el de epidermis, las enzimas difunden más rápido a través de él porque la queratina de la epidermis actúa como una barrera que impide la difusión de las enzimas. Por otra parte, Yates (36) analizó el tiempo utilizado por la enzima para difundir desde el corium hasta el folículo y determinó que este es uno de los factores que más influye en la velocidad del depilado. Este autor trabajó con pieles de oveja en las que

evaluó el espesor de la piel, las formas de agregar el producto enzimático (inyección o pincelado) y distintos tratamientos con sustancias promotoras de la difusión.

Stirtz y Schröder (Citado en (33)) refieren que las primeras manifestaciones de la acción proteolítica se producen en la región de la lámina lúcida de la lámina basal favoreciendo de este modo el desprendimiento epidermis/dermis. Tras analizar los trabajos mencionados, Cantera propuso un modelo que describe la secuencia de pasos a seguir para permitir la llegada de las enzimas depilatorias al folículo piloso a través de la epidermis. Las fases requeridas son las siguientes:

- “Injuria” química-biológica-mecánica de la epidermis
- Difusión del agente depilador a través de la epidermis.
- Depilado
- Efecto de “apelambrado” apertura fibrosa.

C.4. Reactivos empleados en el experimento

C.4.1. Urea

La urea es un reconocido agente desestabilizante de la estructura tridimensional de las proteínas; este efecto lo produce por competencia con los grupos activos de los puentes de hidrógeno (37). La actividad química de la urea repercute en el aumento de la permeabilidad a través de la combinación del incremento del contenido de agua del estrato corneo y la queratolisis (25,38 ,39).

C.4.1.a. Terpenos

Los terpenos son el componente principal de aceites esenciales que se obtienen de distintas plantas. Poseen sabores y aromas característicos. Pueden ser moléculas lineales o cíclicas, formadas por múltiples unidades del hidrocarburo de cinco átomos de carbono isopreno ó 2-metil-1,3-butadieno. Son clasificados de acuerdo al número de unidades de isopreno y se los subdivide tomando como base a los grupos químicos que tienen unidos: hidrocarburos, alcoholes, óxidos y cetonas. (40,41).

Los terpenos funcionan como solventes orgánicos que incrementan la solubilidad de drogas en el estrato corneo. El estudio de la relación entre diversas drogas y el aumento de su permeabilidad con terpenos, sugiere que estos actúan modificando la naturaleza del estrato corneo y elevan el coeficiente de partición de la droga en el tejido. Es posible que los terpenos con grupos no polares como el limonene favorezcan más la difusión de aceleradores lipofílicos que los terpenos polares

(7, 38).

La idea de preparar una emulsión de terpenos para favorecer el pasaje de sustancias surgió a partir del concepto de combinar formulaciones farmacológicas utilizadas en veterinaria y medicina humana con técnicas de curtiembre en las que se utilizaban surfactantes para desengrasar.

C.4.1.b. Tensioactivos

Un tensioactivo puede definirse como toda sustancia que utilizada en bajas concentraciones es capaz de reducir la tensión superficial. Esta característica es aportada por su estructura molecular basada en un componente hidrofílico y otro hidrofóbico (42).

En la curtiembre en las fases de “remojo” y “depilado-encalado” se utilizan tensioactivos. Durante el remojo se aplican como auxiliares humectantes que reducen la tensión superficial del agua facilitando su difusión y rehidratan las fibras de colágeno luego de su conservación por salado. El objetivo de la fase de remojo es remover sales de conservación y sustancias solubles. En el remojo la piel regresa a su estado inicial, limpia y turgente (26).

A su vez, son utilizados en esta misma fase por su capacidad de eliminar grasas naturales formando emulsiones. Durante el encalado favorecen la dispersión de la cal. Por otro lado, cuando se buscan efectos especiales sobre la estructura fibrosa también se emplean tensioactivos. Esta actividad depende del estado del colágeno (si fue modificado o curtido), del tipo de tensioactivo empleado y de las condiciones de trabajo (pH, temperatura y concentración de sales) (26).

Los tensioactivos se clasifican en cuatro categorías según la carga de la superficie activa en solución acuosa. Las características de cada categoría se describen a continuación.

- Aniónicos: contienen uno o más grupos funcionales que imparten carga negativa.

- Catiónicos: se disocian en el agua y forman iones activos con carga positiva.
- Anfotéricos: están a mitad de camino entre los aniónicos y catiónicos. Según el pH, en solución acuosa pueden transportar carga negativa, positiva, o ser eléctricamente neutros.
- No iónicos: el componente hidrofílico de este tipo de surfactante está integrado por varios grupos etoxi o hidroxilo.

En la mayoría de los estudios realizados en la evaluación del aumento de la permeabilidad se utilizan surfactantes aniónicos y no iónicos. Los aniónicos tienden a incrementar levemente la permeabilidad del estrato corneo en humanos luego de un período corto de exposición, dicho aumento se produce a medida que se eleva el tiempo de exposición. Alrededor del 0,5% de la dosis aplicada de tensioactivos no iónicos (nonoxinol) , atraviesan la piel humana luego de 48 h de exposición in Vitro (38, 43). Otros tensioactivos como el politilenglicol y el propilenglicol son mencionados en bibliografía veterinaria como facilitadores de la difusión de drogas (43).

C.4.1.c. Sulfito de sodio

El sulfito de sodio actúa desestabilizando la queratina al interferir en los puentes disulfuro entre cisteínas de cadenas adyacentes (sulfitolisis):

Como consecuencia de este proceso, los queratinocitos se podrían modificar y permitir a la enzima llegar hasta la unión dermis epidermis. Durante la sulfitolisis

la cistina (enlace disulfuro) de la queratina, es convertida en S-sulfocisteína (éster sulfúrico $RS-SO_3^-$) y cisteína (RS^-) (33).

La ruptura de los enlaces disulfuro y la incorporación de enlaces SO_3^- modifican la conformación de las proteínas y afectan sus propiedades (44).

C.4.1.d. Tripsina

La tripsina es una endopeptidasa que presenta su máxima actividad a pH 7. Es bastante específica porque escinde los enlaces peptídicos de la proteína sustrato cuyos grupos carbonilo son aportados por la arginina y la lisina dondequiera que estén situados en la cadena.

El tripsinógeno y quimotripsinógeno son zimógenos inactivos segregados por el páncreas que penetran en el intestino a través del conducto pancreático. El tripsinógeno se compone de una cadena de 249 aminoácidos de secuencia conocida. Se convierte en tripsina activa por acción de la enteroquinasa, enzima proteolítica segregada por el intestino, o de la propia tripsina.

El quimotripsinógeno se compone de una sola cadena polipeptídica, se convierte en su forma químicamente activa por acción de la tripsina al final de tres etapas de conversión. En el intestino delgado la quimotripsina, que también es una endopeptidasa, hidroliza enlaces peptídicos con funciones carbonilo aportadas por el triptófano, fenilalanina, tirosina y en menor medida leucina y metionina. La quimotripsina y la tripsina se suplementan entre sí en cuanto a su especificidad de sustrato (41).

La actividad de la tripsina para separar la epidermis de la dermis en piel humana fue estudiada por varios autores. Medawar en 1941 (45) realizaba la digestión trípica

suave de láminas de piel humana obteniendo láminas enteras de epidermis. Posteriormente Van Scott (46), estiraba trozos de piel desprovista de la grasa de la hipodermis, la fijaba con chinches sobre una tabla y luego la raspaba con una hoja de bisturí. Atribuía la separación dermis epidermis al aplanamiento de las papilas dérmicas. Este autor mencionaba también que el estiramiento de la lámina basal participaba de la separación.

En 1953 Billingham y Reynolds reconocieron la importancia de las láminas de epidermis o de las suspensiones de queratinocitos para cubrir zonas corporales con pérdidas extensas de piel. Veintidós años más tarde, Rheinwald y Green describieron el método homónimo por el cual los queratinocitos se aislaban de biopsias de piel mediante la digestión con tripsina 0,05% en presencia del ácido [etilendiamina] tetra-acético (EDTA) y un quelante de Ca^{+2} . Estos procedimientos permitían expandir los queratinocitos en aproximadamente 10.000 veces su número inicial (47).

C.5. Tripsina y depilado enzimático

La tripsina es un activo depilante de piel vacuna. Heidemann en 1993 mencionó que es posible depilar con tripsina luego de frotar con una solución de NaOH 1N durante 10 minutos el lado pelo aplicando después una solución al 1% de tripsina “técnica”, otros diez minutos más. Al finalizar una hora de incubación a 33° C los pelos pudieron quitarse por completo raspando con espátula. El procedimiento descrito demostraba la influencia de la apertura mecánica sobre el lado pelo (22). Heidemann (22) también cita a Stirtz quien realizó coloraciones de PAS en piel correctamente depilada lista para curtir y observó que no presentaba lámina basal. Con la misma técnica comparando pieles frescas con pieles encaladas y desencaladas se pudo apreciar que la piel sin tratamiento fue la que se coloreó más intensamente.

Roberts and Brunt (48) analizaron las glicoproteínas que intervienen en la unión entre queratinocitos de epidermis humana. Estos autores realizaron un estudio en el que cultivaban queratinocitos de epidermis humana con tripsina/EDTA y se perdía la adhesión célula – sustrato y entre las células de un mismo sustrato. La adhesión se interrumpía por la ruptura de una glicoproteína M_r 126000 expuesta sobre la superficie de la membrana celular. La adición de Ca^{+2} protegía a la glicoproteína de la superficie celular de la digestión trípica y prevenía la dispersión de los queratinocitos. A partir de estos resultados, hoy se considera que esta glicoproteína desempeñaría un rol importante en la unión intercelular de los queratinocitos epidérmicos. (33). Actualmente es posible afirmar que esta glicoproteína corresponde a la cadherina E (12).

D. HIPÓTESIS

La combinación de tratamientos químicos y mecánicos aplicados sobre piel de bovino lleva a una mejor penetración de las enzimas a través de la epidermis.

E. OBJETIVOS

Vulnerar la epidermis para facilitar la difusión de enzimas con actividad depilatoria hacia la lámina basal.

Evaluar los daños que los distintos tratamientos generan sobre la piel.

F. MATERIALES Y MÉTODOS

F.1.Diseño Experimental

Condiciones de ensayo aplicadas durante el desarrollo de los experimentos.

Se utilizaron pieles frescas de la zona del crupón de bovinos adultos conservadas a 5° C durante el traslado desde la curtiembre. Estas pieles permanecieron a 25°C en contacto con siete soluciones diferentes utilizadas como pretratamiento durante 2 horas (Tabla1) y luego se realizó la incubación con un preparado enzimático comercial en base a proteasa pancreática durante 3 horas. Al mismo tiempo se utilizó una muestra de piel control que permaneció las 5 horas en contacto con buffer bicarbonato pH 8,5. Los ensayos se realizaron a 25° C. En total se desarrollaron siete ensayos en las condiciones descritas, seis estáticos y uno en movimiento, cada uno de ellos por duplicado.

SULFITO DE SODIO
TENSIOACTIVO
EMULSIÓN DE TERPENOS
SULFITO DE SODIO- EMULSION DE TERPENOS
SULFITO DE SODIO - TENSIOACTIVO
UREA
SULFITO DE SODIO - UREA
BUFFER

Tabla1.

F.1.a. Material Utilizado para soporte de las pieles

En estudios preliminares realizados durante esta tesis, y con el objetivo de que la epidermis se relacionara de manera más directa con las soluciones para analizar sus posibles modificaciones, se incorporaron como soportes de las muestras cilindros de plástico de 200 ml de capacidad (Fig.8). Los mismos sujetaban la piel con anillos y un sistema de vástagos con tuercas entre los dos recipientes en los que se depositaba la solución en contacto con el lado del pelo (Fig. 9y10).



Figura 8. Cilindro de 200 ml para contener los reactivos utilizados.



Figuras 9 y 10. Anillo sujetador de los cilindros de 200 ml. (Fig.9). Recipiente armado resultante de la unión de los elementos mostrados en las figuras 8 y 9 para contener los reactivos (Fig.10).





Figura 11. Recipientes mostrados en la figura 10 sujetos en bandeja

Las cinco botellas (Fig.10) se fijaban por tornillos en una base de madera con forma de bandeja (Fig.11). La estructura se depositaba dentro del fulón para simular la actividad de este dispositivo sobre la piel con agitación continua y temperatura constante de 25° C. El uso de este material implicaba la necesidad de utilizar grandes cantidades de reactivos lo que dificultaba y encarecía los experimentos, además el gran tamaño de los recipientes hacía difícil su manipulación. Por lo tanto se realizaron con ellos solo algunos ensayos preliminares cuyos resultados fueron comparados con los obtenidos cuando se emplearon los materiales que se describen a continuación.

Para que se facilitaran los ensayos, se diseñó un sistema en el que la piel se sujetaba con soportes más livianos y de menor tamaño. Para ello se optó por utilizar planchas de plástico de 26 cm de largo y 14 cm de ancho con 8 pocillos de 5 cm de

diámetro de 20ml de capacidad (Fig. 12). Estas planchas se adaptaron para mantener el contacto del lado del pelo con las soluciones sin derramar líquido entre los compartimentos, sujetando la piel sobre la plancha con tablitas de madera de 20 cm de largo y 2 cm de ancho ajustadas con tuercas mariposa (Fig.13).

La capacidad de 20 ml cada recipiente al apretar la piel durante el ensayo se redujo a 10 ml.

Al ser ocho los pocillos, fue posible procesar las muestras por duplicado. El procesar 16 muestras por ensayo, reducía el espacio y el material utilizado.

Cuando se compararon los resultados obtenidos a partir de dos ensayos con cada uno de los sistemas de contención previamente descritos, se encontró que no existían diferencias importantes y por lo tanto se completaron los ensayos con el sistema de pocillos.



Figura 12. Planchas de plástico utilizadas para que las muestras contacten con los reactivos en los ensayos con 10 ml



Figura 13. Plancha de plástico que sujeta la piel en los ensayos con movimiento

F.2. Esquema de pretratamientos empleados por duplicado.

Los reactivos se elaboraron tomando en cuenta el volumen de los recipientes. Se prepararon soluciones madre de las que se emplearon 5ml de cada una para completar los 10 ml. Cuando se utilizaba un reactivo único (tensoactivo, sulfito, emulsión o urea) el volumen se completaba con buffer para mantener la concentración. Las diluciones fueron preparadas con buffer bicarbonato pH 8,5.

Esquema de pretratamientos empleados por duplicado: Tabla 2.

a.1. sul fito	a.1. sul fito	e.5 Sulfito- Tensioactivo	e.5 Sulfito- Tensioactivo
b.2. emul sión - terpenos	b.2. emul sión - terpenos	f.6. Urea	f.6. Urea
c.3. Tensioac Tivo	c.3. Tensioac Tivo	g.7. Sulfito- urea	g.7. Sulfito- urea
d.4. Sulfito- emulsión.	d.4. Sulfito- emulsión.	h.8. bu ffer	h.8. bu ffer

En la tabla 2. se describen los pretratamientos efectuados durante dos horas en muestras procesadas por duplicado con soluciones de: Sulfito (**a.1.**), Emulsión de terpenos (**b.2.**), Tensioactivos (**c.3.**) y Urea (**f.6.**). A su vez los reactivos mencionados fueron combinados en (**d.4.**), (**e.5.**) y (**g.7.**).

F.2.1.a. Sulfito de sodio y combinaciones

Cuando el sulfito se usó como pretratamiento combinado con otros reactivos, se preparó una solución madre 0,246g/100 ml. En **(a.1.)** se utilizó solamente el sulfito, en ese caso se realizó una dilución colocando 5 ml de la solución madre con 5ml de buffer obteniendo una solución final de sulfito de sodio de 0,123 g en 100 ml.

Al mismo tiempo, 5 ml de esta solución madre de sulfito se mezclaron con los siguientes reactivos generando en todas igual concentración que en **(a.1.)**

- 5 ml de emulsión de terpenos 10%,**(d.4.)**
- 5ml de solución madre de tensioactivo 2% **(e.5.)**
- 5ml de solución madre de urea 10M **(g.7.)**.

F.2.1.b. Emulsión de Terpenos

La combinación de los componentes de este preparado (PEG 400, Tween 20 y terpenos) surgió a partir de la idea de conjugar productos de aplicación en curtiembre y en la facilitación de la absorción transdérmica de fármacos en medicina humana y veterinaria (7,8,38,40,42,43,49,50,51,52,53,54,55). De este modo se utilizó una emulsión elaborada a partir de una solución comercial de terpenos (terpenos EUMA S.A. Villa Adelina - Buenos Aires)

La preparación final incluyó además de la solución de terpenos 10% V/V, a los siguientes componentes:

-polietilenglicol 400(Parafarm SA) - 25%

-tween 20- 10%

-agua csp -

Para realizar la emulsión se realizó el siguiente procedimiento:

1º) Se mezclaron suavemente los terpenos con el tween 20 y el polietilenglicol 400.

2º) Se agregó el agua y se agitó vigorosamente con agitador durante 10 minutos.

En el pretratamiento en que la emulsión se utilizó sola **(b.2.)** se colocaron 5ml junto a 5 ml de buffer. La combinación con 5ml de sulfito de sodio se describió al comienzo de la presente sección **(d.4.)**.

En las dos situaciones se obtuvo un porcentaje final de la emulsión de terpenos de 5% v/v.

F.2.1.c.Tensioactivo

Se trata de un tensioactivo comercial. Se utilizó el Isogras AN 1% (tensioactivo aniónico + disolventes Pellital SA, Buenos Aires). Se preparó una solución madre 2%. Cuando se emplearon tensioactivos solos **(c.3.)**, 5 ml de la solución madre se combinaron con 5 ml de buffer, obteniéndose una concentración final del tensioactivo 1% V/V. La misma concentración final se obtuvo al combinar la solución con 5ml de solución de sulfitos **(e.5.)**.

F.2.1.d. Urea -PM60 (Biopack, BsAs para análisis)

Cuando se utilizó solamente solución de urea 10M **(f.6.)** se realizó una dilución colocando 5 ml de la solución madre 10M con 5ml de buffer. Los mismos pasos se efectuaron cuando se combinó con 5 ml de solución madre de sulfito de sodio **(g.7.)** En ambos casos se obtuvo una concentración final de urea 5M.

A su vez cada pocillo fue ocupado con 10 ml de buffer bicarbonato 3g/l, pH 8.5 durante 5 horas **(h.8.)**

F.3.Tratamiento

Se utilizó el preparado comercial M152 (Cergen srl, Buenos Aires, Argentina) que es una proteasa de origen pancreático (tripsina).

Se colocaron 10 ml de este preparado en cada recipiente después de extraer con pipeta, jeringa o guía, los reactivos del pretratamiento .

La dilución se realizó con buffer bicarbonato pH 8,5 que es el pH óptimo de actividad enzimática (56). El producto contiene un soporte arenoso, por este motivo se diluyó con el buffer: dilución: 500 mg/l y se centrifugó a 4 ° C 20 minutos a 10000 rpm.

Al final del pretratamiento y tratamiento descriptos, se tomaron muestras de cada uno de los grupos que se describen en los siguientes apartados.

.

F.4. Técnicas:

F.4.1. Técnicas histológicas

F.4.1.a Inclusión en parafina

Los pasos en el procesamiento de tejidos; deshidratación e infiltración en parafina comprendieron la extracción del agua tisular y su reemplazo por sustancias que solidifican y permiten efectuar cortes para su posterior coloración y observación microscópica.

La inclusión en parafina comenzó con la deshidratación progresiva de las muestras de piel fijadas en formol 10% que se sumergieron en recipientes anchos con soluciones de alcohol de concentración creciente:

1. alcohol 70%; dos pasajes,
2. alcohol 96% dos pasajes de una hora cada uno
3. alcohol 100%, dos pasajes de media hora cada uno.

Al finalizar esta secuencia y como la parafina es insoluble en alcohol, se reemplazó este último por xilol en dos pasajes de tres horas cada uno. A su vez, el xilol se extendió sobre la pieza hasta que reemplazó a la parafina. A continuación, se incluyó la muestra dentro de cassettes de inclusión de plástico que se sumergieron en frascos con parafina líquida dentro de una estufa con una temperatura de 1 a 2° C por encima del punto de fusión de la parafina utilizada (56-58° C). Esta etapa se realizó en forma gradual, efectuando dos baños de 24 horas en las condiciones descriptas.

Al terminar esta etapa con la parafina líquida y transparente, el tejido se orientó con pinzas recalentadas dentro del cassette de inclusión y la epidermis paralela a la cuchilla. En estas condiciones quedó formado un bloque de parafina que solidificó a temperatura ambiente con el tejido incluido apoyado sobre la tapa del cassette. Este material se sujetó en el micrótopo de deslizamiento marca Reichert. Se realizaron cortes de 6 μ de espesor que se descargaron con pincel sobre una bandeja llena de agua corriente a 40° C de modo tal que esta sección cortada, en el momento de rescatarla del agua quedaba extendida sobre el portaobjetos de vidrio (57,58).

F.4.1.b. Tinciones

Como paso previo a las tinciones y al utilizar colorantes hidrosolubles, los cortes incluidos en parafina y adheridos al portaobjetos se rehidrataron en soluciones alcohólicas de concentración decreciente por las que transitaban en pasajes de cinco minutos cada uno, hasta llegar al agua destilada para luego realizar la coloración.

Una vez coloreado el tejido fue necesario volver a deshidratarlo porque las sustancias que permiten su observación con el microscopio óptico, no son hidrosolubles. El preparado se sumergió en concentraciones crecientes de alcohol durante un minuto y medio por pasaje y por último en xilol, para luego recubrirlo

con el medio de montar sintético o natural y el cubreobjetos. Además de la tinción histológica tradicional de hematoxilina eosina, se utilizaron la coloración tricrómica de Masson e histoquímica del reactivo de Schiff (PAS). Las técnicas fueron realizadas según Prophet et al, 1992(57).

F.4.1.c.Coloración de hematoxilina eosina

Se realizó utilizando la técnica que se describe a continuación:

- coloración con hematoxilina de Mayer durante tres minutos previa hidratación en agua destilada,
- viraje en agua corriente,
- coloración con eosina durante un minuto,
- deshidratado y montaje.

F.4.1.d. Coloración Tricrómica de Masson

La coloración se desarrolló de la manera siguiente:

- hidratación en agua destilada,
- Coloración con hematoxilina de Mayer 3 minutos
- Viraje en agua corriente.
- Coloración con ponceau de xilidina+ fucsina ácida(solución de Masson) -5 minutos
- Dos lavados con agua corriente y uno con agua destilada.

- Aplicación de ácido fosfomolibdico 1% en solución acuosa un minuto.
- Aplicación de verde luz durante un minuto.

Con esta técnica fue posible distinguir el citoplasma de las células epiteliales de color rosado y las fibras de colágeno verde.

F.4.1.e. Coloración del Reactivo de Schiff (Periodic Acid Schiff-PAS)

La técnica histoquímica de PAS se basa en la capacidad del ácido peryódico de oxidar las uniones carbono de los grupos glicoles de los carbohidratos produciendo aldehídos. Estos aldehídos se revelan en la etapa siguiente con el reactivo de Schiff produciendo un compuesto rosa-fucsia insoluble (19).

El procedimiento realizado fue el siguiente

1. Desparafinización e hidratación hasta agua destilada
2. Sumergir en solución de ácido peryódico 0,5%, 5 minutos
3. Enjuague en agua destilada
4. Sumergir en reactivo de Schiff (fucsina básica 0,5%+ metabisulfito de potasio 2% y 10 ml de ácido clorhídrico 1N) hasta alcanzar el color deseado (5 minutos aproximadamente).
5. Lavado con agua corriente
6. Contraste con solución de hematoxilina de Mayer durante 3 minutos.
7. Lavado con agua corriente

Los cortes fueron deshidratados y montados, las estructuras PAS positivas se observaron color fucsia

F.5. Microscopia Electrónica de Transmisión

La fijación primaria de muestras se realizó en glutaraldehído al 2% en buffer de fosfato 0,2M pH 7,4 (PBS) durante 2 horas a 4°C. A continuación, para eliminar el exceso de fijador se lavaron con el mismo buffer en tres cambios de 30 minutos cada uno a la misma temperatura.

La fijación secundaria se realizó con tetróxido de osmio al 1% en el mismo buffer durante 1 hora a 4°C. En el transcurso de esta etapa, el tejido se ennegreció porque el osmio agrega contraste por ser un metal pesado.

Posteriormente, las muestras se deshidrataron en una serie creciente de alcoholes 50, 70 y 80% a 4°C, 90 y 100% a temperatura ambiente. Para finalizar la deshidratación, el alcohol 100% se reemplazó por acetona a la misma temperatura. De este modo, el agua se removió del tejido que quedó preparado para su infiltración en medios de inclusión no acuosos. En este trabajo las muestras se incluyeron en resina epoxi en moldes de silicona en los que se formó el taquito listo para cortar.

Previo a la realización de los cortes ultrafinos se realizaron cortes de 1 μ de espesor (semifinos) que se colorearon con azul de toluidina.

Durante la coloración con azul de toluidina el portaobjetos se colocó sobre una platina a 60-70° C. El exceso de colorante se lavó en agua corriente caliente para evitar que se rompa el portaobjetos. El tiempo de coloración fue de 10-30 segundos.

Esta tinción nos aportó datos acerca de la orientación del tejido y permitió determinar las áreas de interés en la superficie del bloque (59).

Los cortes ultrafinos (90 nm) se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron en el microscopio electrónico de transmisión JEM 1200 EX II (JEOL) del Servicio Central de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP.

F.6.Difusión de colorantes Adaptación a la piel de bovino de la técnica de Rosado y Monteiro

Se realizaron cuatro ensayos de difusión de colorante bajo las condiciones mencionadas. Tres estáticos y uno en movimiento, en este caso no fueron por duplicado. El ensayo duró 13 horas en total, dentro de las cuales 5 horas comprendían el contacto con los reactivos descriptos (dos horas de pretratamiento y tres de tratamiento enzimático).

A continuación, se cortaron los pelos y se cubrió la superficie tratada de la piel con gotas de solución de azul de metileno 4% durante 8 horas. Una vez finalizado el tiempo de contacto, se enjuagaron bajo canilla las muestras y se cortaron con micrótopo de congelamiento. Los preparados se montaron con glicerina Jelly y se fotografiaron a 4X. Esta técnica es una adaptación a la piel bovina de la utilizada por Rosado Monteiro en piel humana (60, 61, 62, 63). Las imágenes obtenidas fueron analizadas mediante el software Image Proplus determinándose la profundidad de penetración del colorante en micrómetros.

F.7. Espectroscopia Infrarroja Transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia infrarroja es una técnica que mide la cantidad de radiación que absorbe una sustancia a diferentes longitudes de onda.

A partir del espectro de un compuesto, es posible obtener información acerca de su estructura química (44). Este procedimiento permite caracterizar la conformación y dinámica de proteínas y lípidos e investigarlas en ambientes fisiológicos reales. Al mismo tiempo posibilita informarse acerca de la orientación de diferentes partes de la molécula investigada. Es posible de este modo, comprender detalles de la estructura de sistemas biológicos. La espectroscopia FTIR es un procedimiento rápido que se realiza utilizando microgramos de muestra. Cuando la radiación IR pasa a través de la muestra (sólido, líquido o gas), la molécula y sus grupos funcionales característicos absorben ciertas frecuencias de la radiación que son indicadoras de cambios vibracionales (64,65). Estas frecuencias de distribución de la radiación absorbida son únicas para cada molécula o grupo funcional. Como resultado se obtiene el espectro vibracional de distintos componentes tisulares (proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos) (7, 38, 64).

Durante el desarrollo de este experimento fue posible adaptar la técnica descrita a la piel de bovino a pesar de las dificultades que presentaba (manto de pelos gruesos, espesor del estrato corneo, distribución de los lípidos intercelulares) (7, 38, 64, 65, 66, 67, 68).

Procesamiento de muestras:

Para el procesamiento se siguió lo propuesto por Krishna, Marcelli y Movasaghi (64, 65,69).

1. Las muestras de dos ensayos y sus duplicados, fijadas en formol al 10%, se conservaron en desecador durante un mes para eliminar el formol.
2. Al finalizar este período se pesaron con 24h de diferencia. Este valor se tomó como parámetro de eliminación de formol.
3. Luego se conservaron en freezer a -20°C durante dos días.
4. A continuación se liofilizaron a -55°C durante 16 horas.

Para obtener los espectros FTIR, se utilizó un espectrómetro Nicolet 380 FTIR con accesorio ATR (Attenuated Total Reflectance) de cristal de Diamante. El análisis fue elaborado con el software Minitab 15 y 16 (Minitab Inc.).

Por cada material se recolectaron tres espectros con 32 barridos y una resolución de 1 cm^{-1} en la región de dislocación entre 900 y 3800 cm^{-1} . El preprocesamiento se realizó de la siguiente manera:

División de espectros en dos regiones de análisis distintas: $900 - 1800\text{ cm}^{-1}$ y $2600 - 3800\text{ cm}^{-1}$; corrección de línea de base seguida de normalización vectorial; análisis visual de espectros; identificación de los modos vibracionales característicos de cada muestra; construcción de una tabla relacionando los modos vibracionales y su estructura química correspondiente; identificación objetiva de las interferencias espectrales del espectro de piel bovina sometida a los diferentes tratamientos para desprender los pelos; identificación

de las regiones de interés para evaluar el contenido lipídico compatible con el tratamiento realizado.

La interpretación de los resultados de esta técnica se basó en el trabajo de Movasaghi

(2008). Este autor elaboró una base de datos a través de la recopilación de huellas dactilares de tejidos biológicos. En la publicación mencionada (64) se encuentran los picos de absorción más importantes presentes en los tejidos.

Análisis Estadístico:

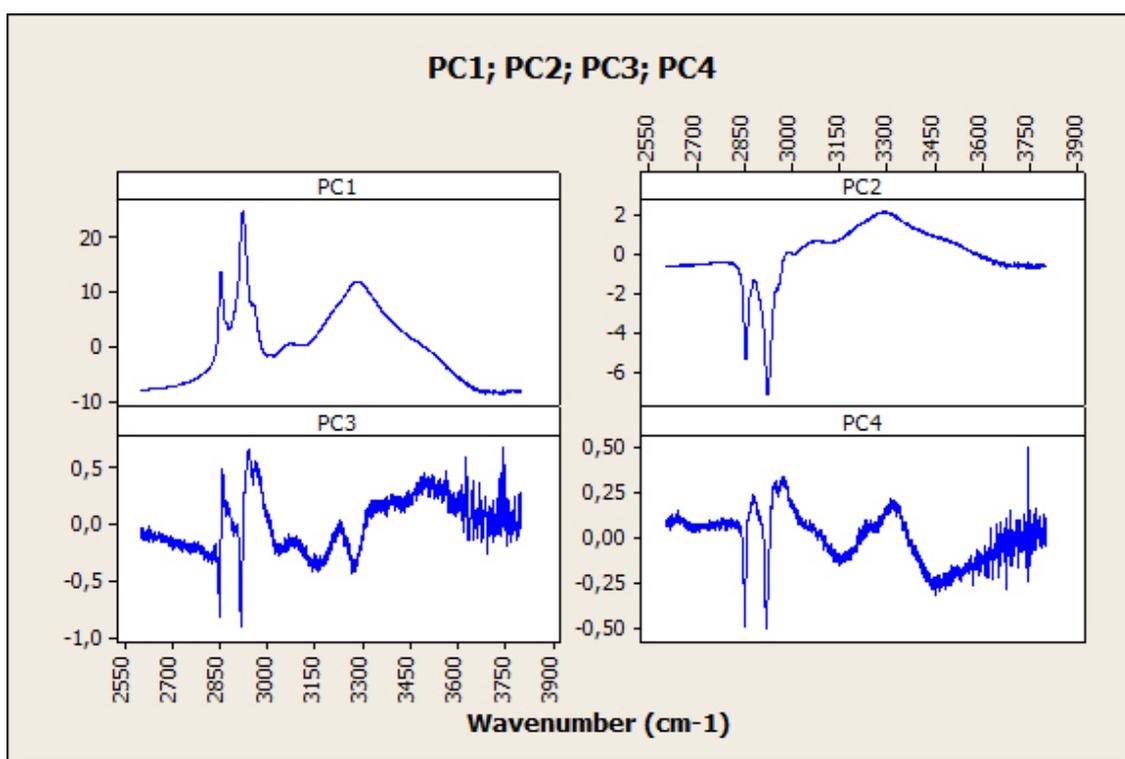
Se analizó mediante el Análisis de Componentes Principales la región de longitud de onda $2600-3800\text{ cm}^{-1}$ región espectral que se refiere a los modos vibracionales CH, correspondientes a las cadenas de los ácidos grasos,

El ACP, Análisis de Componentes Principales es una técnica exploratoria de análisis que transforma un conjunto de variables correlacionadas en un conjunto menor de variables independientes. Se trata de un método de reducción de datos. Además el análisis de grupos o de "Clusters" es una técnica exploratoria de análisis multivariada que permite agrupar sujetos en grupos homogéneos o compactos en relación a una o más características comunes. Se analizaron todos los espectros de los 8 grupos con la intención de agruparlos por similitud y establecer cuáles son las diferencias espectrales que determinan su comportamiento.

Iniciamos los resultados con Análisis de Componentes Principales (ACP) para reducir la cantidad de medidas en componentes que son combinaciones lineares de las medidas originales. Se seleccionaron las regiones espectrales que

diferenciaron a los dos grupos Control y Emulsión para separarlos de los demás grupos experimentales. De acuerdo con el gráfico que describe el valor propio de los componentes, PC1 describe 95,5% de la variabilidad de los espectros. Este dato solo es incapaz de demostrar alguna diferencia entre los grupos. Adicionando los demás PCs analizados, fue posible clasificar los espectros del Grupo Control y Grupo Emulsión separados de los demás grupos experimentales.

Para describir espectralmente las diferencias, se hizo un gráfico Loading Plot que expresó: PC2 describe el 4,2% de variabilidad de los espectros, PC1: 95% de todos los espectros, PC3 y PC 4 el 0,1%.



RESULTADOS

G.1. Microscopia Óptica

Dada las características de las muestras, algunos cambios como condensación excesiva de la cromatina nuclear y una ligera vacuolización se encontraron en todos los casos, incluyendo a los controles. Por lo tanto, se consideran como alteraciones generadas por el pretratamiento a todas las modificaciones de la estructura cutánea normal que no se presentaron en las muestras sometidas a Buffer (Fig.14-A)

Entre los cambios observados con los pretratamientos se destacan la separación entre dermis y epidermis (Fig.14-B) y la separación entre las vainas foliculares y los pelos (Fig. 14-C). Los resultados fueron variables dentro de un mismo grupo y los porcentajes en que se encontraron estos cambios en las distintas muestras se resumen en la tabla 3.

Vale destacar que en el caso del pretratamiento con sulfito se encontró el mayor porcentaje de cambios y también los cambios cualitativamente más importantes (Fig 14-D). Cuando se combinó el sulfito con otras sustancias, la disminución de los cambios fue más manifiesta en la epidermis que en los folículos (tabla 3).

El tratamiento con urea generó en algunas muestras una vacuolización importante de la epidermis (Fig.15-A) sin embargo en la mayoría de los casos no se encontraron cambios importantes.

En los casos en que la dermis y epidermis se separaron, la técnica de PAS permitió visualizar una lámina basal continua (Fig. 15-B). Las técnicas tricrómicas no

evidenciaron alteraciones en las fibras colágenas (Fig. 15-C). Tampoco se observó con ninguno de los tratamientos modificación en las fibras elásticas (Fig. 15-D).

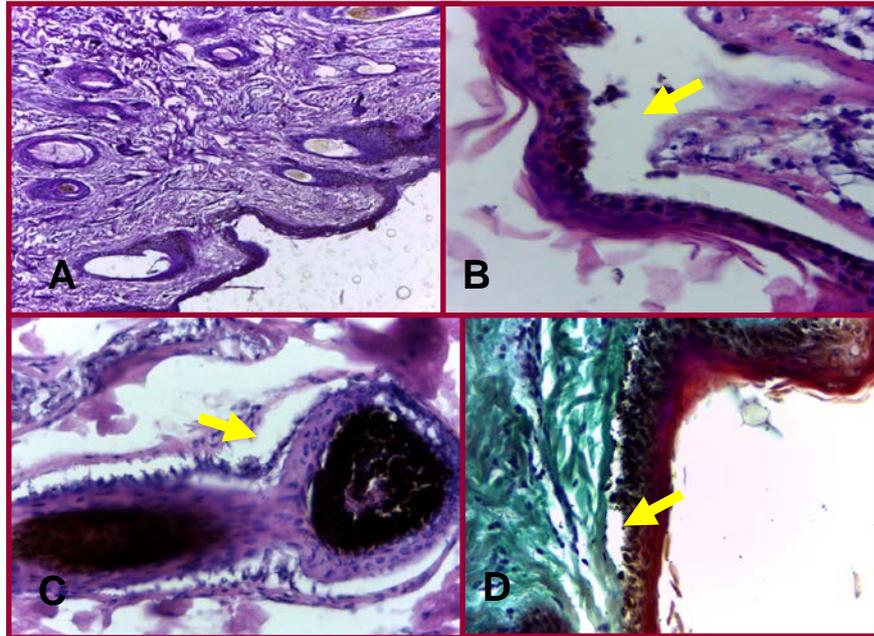


FIGURA 14. Microscopia óptica de piel bovina sometida a distintos pretratamientos

A. Buffer: hematoxilina eosina-10X. Se observa la estructura normal de la piel en las condiciones de trabajo. **B. Sulfito- Tensioactivo:** hematoxilina eosina-40X. La flecha señala la separación dermis-epidermis. **C. Sulfito – Tensioactivo:** hematoxilina eosina 40X. La flecha señala la separación entre las vainas conectivas y epiteliales del folículo piloso. **D. Sulfito:** Tricrómica de Masson 40X . La flecha señala la separación dermis-epidermis.

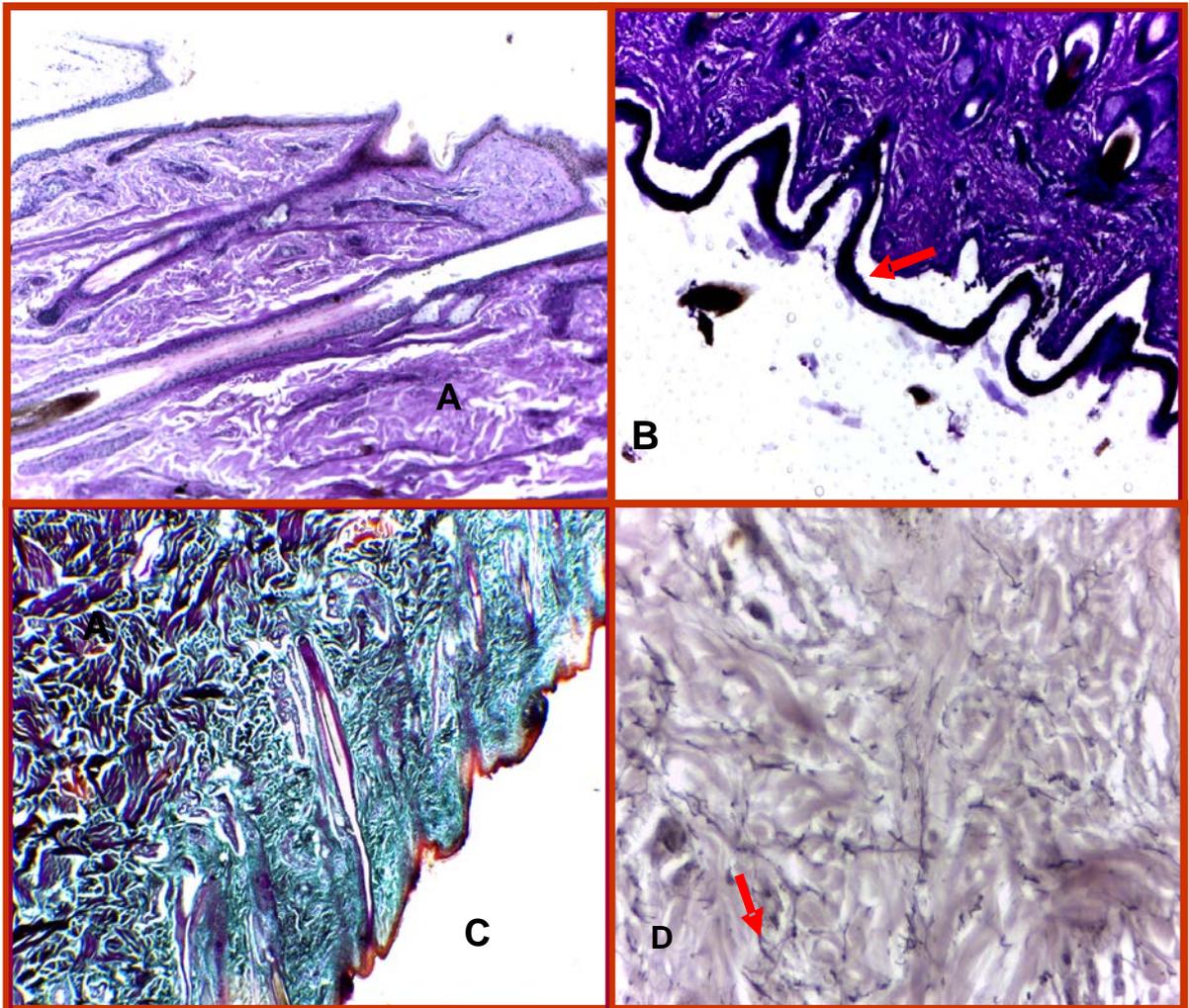


FIGURA 15. Microscopia óptica de piel bovina sometida a distintos pretratamientos

A. Urea: hematoxilina eosina, 10X. No se observan cambios significativos.

B. Sulfito-Emulsión: PAS-10X, Separación dermis-epidermis (flecha) sin alteración de lámina basal.

C. Sulfito: coloración Tricrómica de Masson 10X.

Se observa el colágeno sin modificaciones tintoriales.

D. Sulfito: Orceína 40X. Se observan fibras elásticas sin alteraciones morfológicas.

Tabla 3. Porcentaje de muestras en las que se encontraron cambios en la epidermis y los folículos pilosos

Pretratamiento	Separación estratos epidermis	Separación pelo-folículo piloso
1. Sulfito	100%	100%
2. Emulsión	14,2%	43%
3. Tensioactivo	57%	100%
4. Sulfito-Emulsión	57%	100%
5. Sulfito-Tensioactivo	57%	16,6%
6. Urea	100% sin separación	100% sin separación
7. Sulfito-Urea	57%	43%
8. Buffer	100% sin cambios	100% sin cambios

G.2 Microscopía Electrónica de Transmisión

Las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión de todas las muestras mostraron diversos cambios relacionados con el procedimiento que implica congelación previa, 2 horas de pretratamiento y 5 horas de tratamiento previos a la fijación. Ciertas modificaciones como condensación excesiva de la cromatina, vacuolización celular y pérdida de nitidez de los límites celulares, se observaron en todos los casos. Por lo tanto, se consideran únicamente las modificaciones que se encuentran en los tratamientos pero no en los controles.

En las muestras control se observó el patrón de bandas característico de las fibras colágenas (Fig.16-A) que no pudo encontrarse en el caso de las muestras en las que se utilizó sulfito solo, tratamiento determinante de los mayores cambios. En estas muestras se perdió la distribución fibrilar típica, observándose ruptura de las fibras y gran separación entre ellas (Fig.16-B). Cuando no se aplicó sulfito, las fibras no se alteraron (Fig.16-C)

La presencia de desmosomas únicamente pudo detectarse en las muestras provenientes de tratamientos con buffer (Fig.16-D). El pretratamiento con sulfito determinó además la pérdida completa de la unión con la lámina basal y de las uniones intercelulares en los estratos más basales de la epidermis (Fig.17-A). En cambio en los estratos más superficiales la separación fue menos marcada, aunque se encontró fragmentación del estrato corneo (Fig.17-B). Cuando se utilizó el sulfito combinado con otras sustancias se encontró un efecto menos evidente en la separación entre las células y en la separación entre estas y la lámina basal. Esta disminución del efecto fue especialmente notoria cuando se combinó el sulfito con

emulsión (Fig.17-C). Cuando se combinó el sulfito con tensioactivo o con urea las separaciones fueron de un grado intermedio comparados con los hallados con el sulfito solo (Fig.17-D).Las combinaciones entre el sulfito y otras sustancias mantuvieron el efecto de fragmentación del estrato corneo (Fig.18-A).

En todos los casos, pese a que se separaron dermis y epidermis, la lámina basal se mantuvo (Fig. 18-B).

El uso de emulsión o tensioactivo no alteró las uniones entre las células en los estratos superficiales de la epidermis (Fig.18-C).

Los ensayos en movimiento no presentaron diferencias con los estáticos.

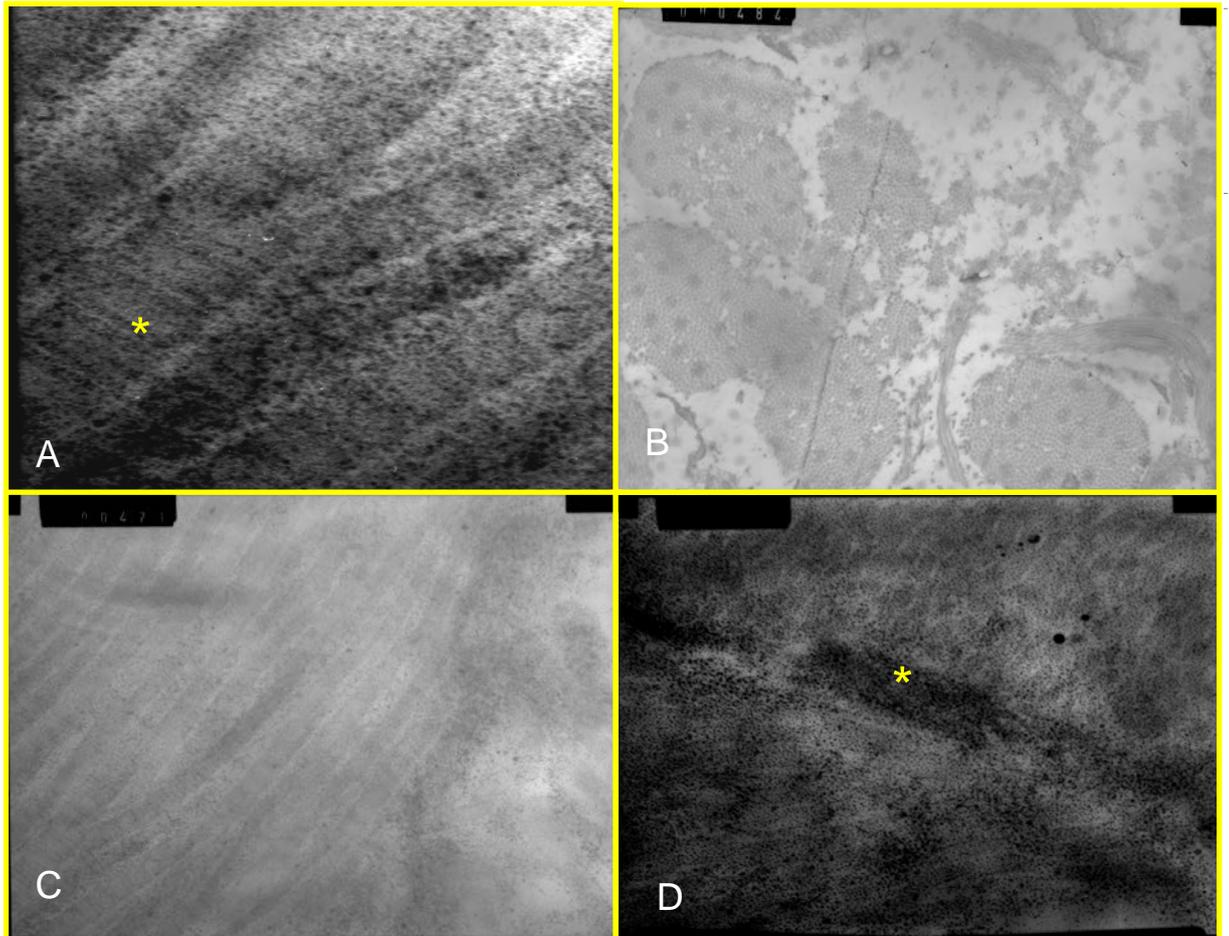


Figura 16 Microscopía Electrónica de Transmisión de piel bovina sometida a distintos pretratamientos: A .Buffer: fibras colágenas patrón característico. 17000X. **B. Sulfito:** pérdida de distribución, ruptura y separación de fibras de colágeno 20000X. **C. Tensioactivo:** colágeno sin alteraciones 60000X. **D. Buffer:** desmosoma 17000X.

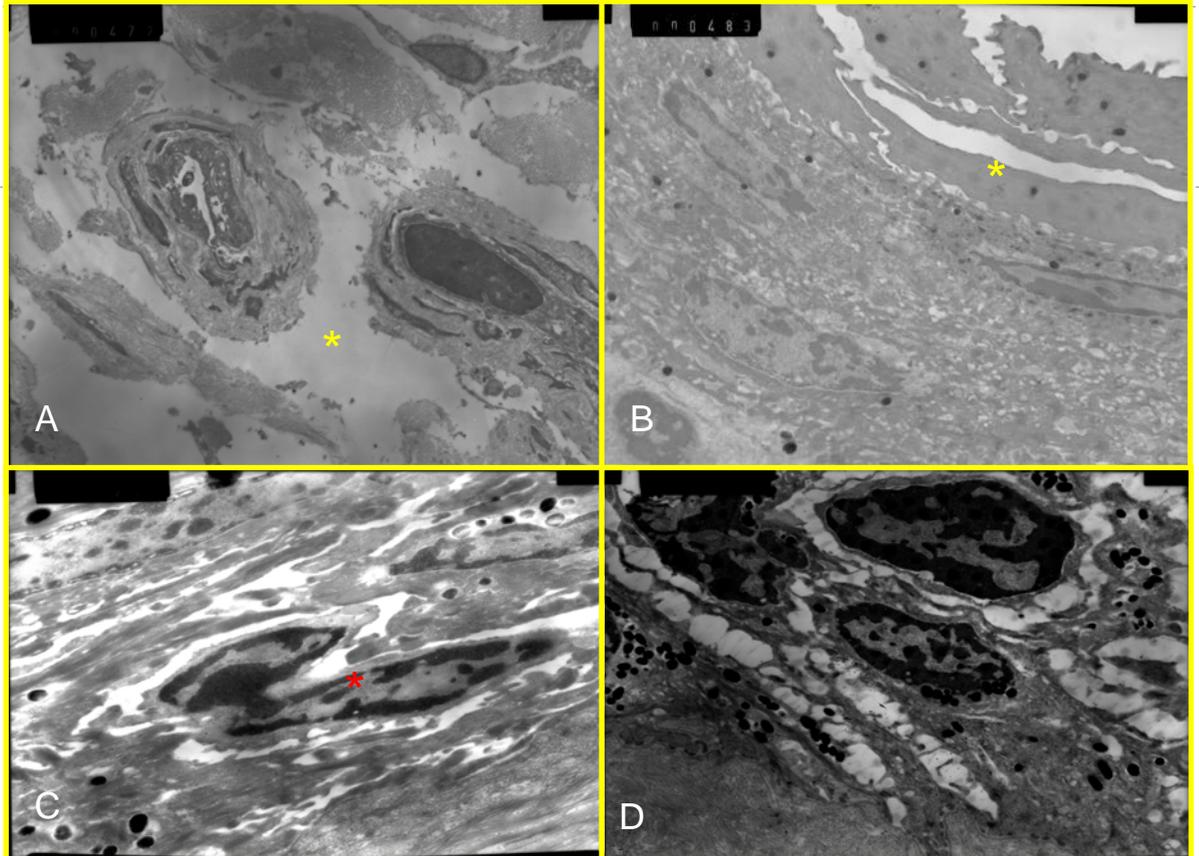


Figura 17. Microscopía Electrónica de Transmisión de piel bovina sometida a distintos pretratamientos. A. Sulfito: pérdida de uniones intercelulares y con la lámina basal 36000X. **B. Sulfito:** fragmentación de estrato corneo 46000X. **C. Sulfito-emulsión:** separación de queratinocitos 14000X. **D. Sulfito- tensioactivo:** separación de queratinocitos 26000. X.

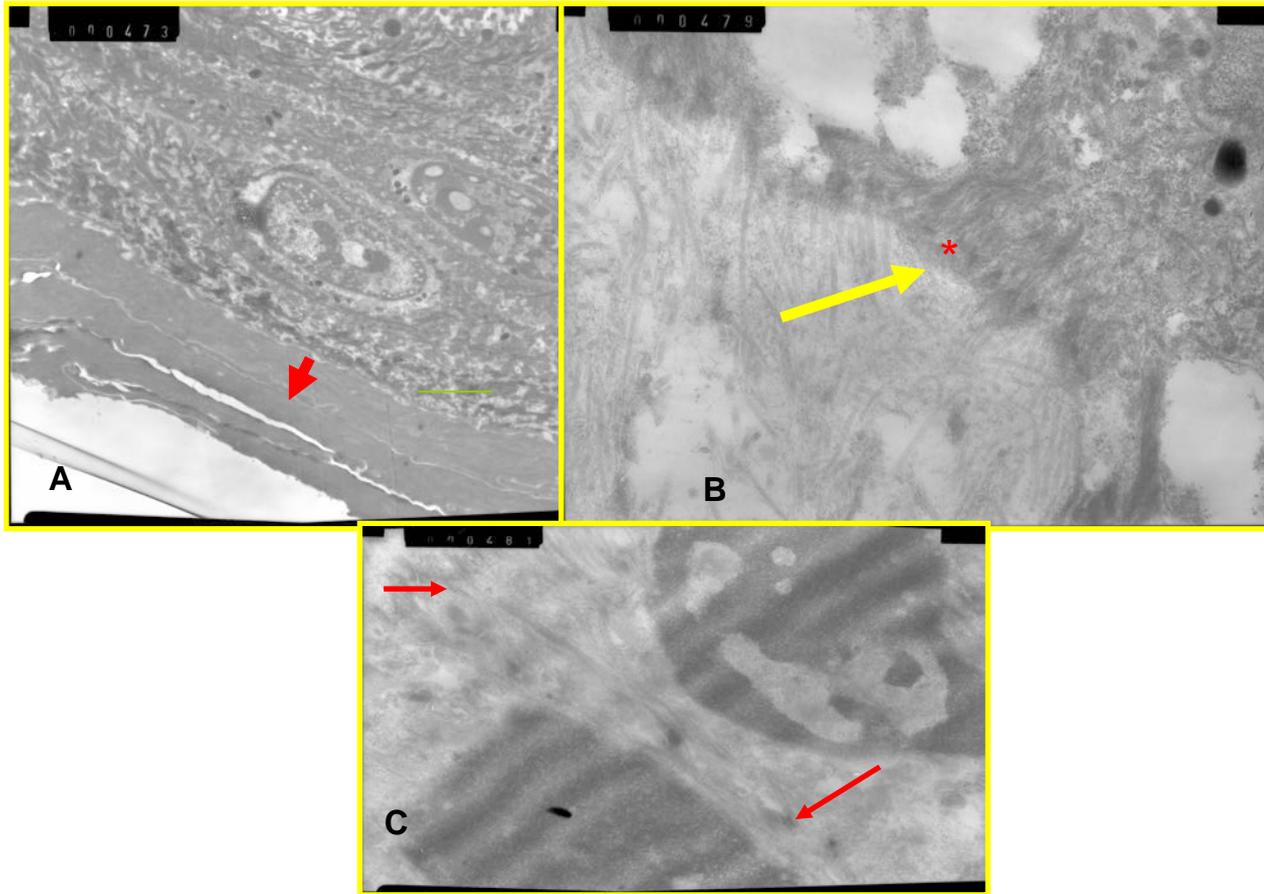


Figura 18. Microscopía Electrónica de Transmisión de piel bovina sometida a distintos pretratamientos: A. Sulfito-urea: fragmentación del estrato corneo 26000 X. B. Sulfito-tensioactivo: persistencia de la lámina basal 26000X. C. Tensioactivo: células epidérmicas sin alteraciones en sus uniones 18500. X

G.3 Difusión de colorantes

La difusión en las muestras tratadas con buffer fue escasa o nula. En el caso de los demás tratamientos, el colorante difundió hasta la profundidad de la dermis. La mayor penetración ocurrió en el caso del tratamiento con sulfito. De las sustancias agregadas al sulfito únicamente el tensioactivo no produjo una diferencia significativa en la capacidad de penetración. Por otro lado este reactivo sin sulfito también generó una difusión elevada (TABLA 4.). En todos los casos se observó una difusión más manifiesta alrededor de los folículos pilosos (Fig.19 y Fig.20)

Tabla 4.

Pretratamiento	X	ES	Diferencias significativas con
a. buffer	32,67	17,1	b-c-d-e-f-g-h
b. sulfito	1926,67	30,1	a-c-d-e-f-g-h
c. urea	634,01	85,6	a-b-d-g
d. tensioactivo	1367,01	74	a-b-c-e-f-h
e. emulsión	710,02	26,8	a-b-e-g
f. sulfito-urea	630,33	126,7	a-b-d-g
g. sulfito-tensioactivo	1460,33	128,3	a-b-c-e-f-h
h. sulfito- emulsión	630,1	29,44	a-b-d-g

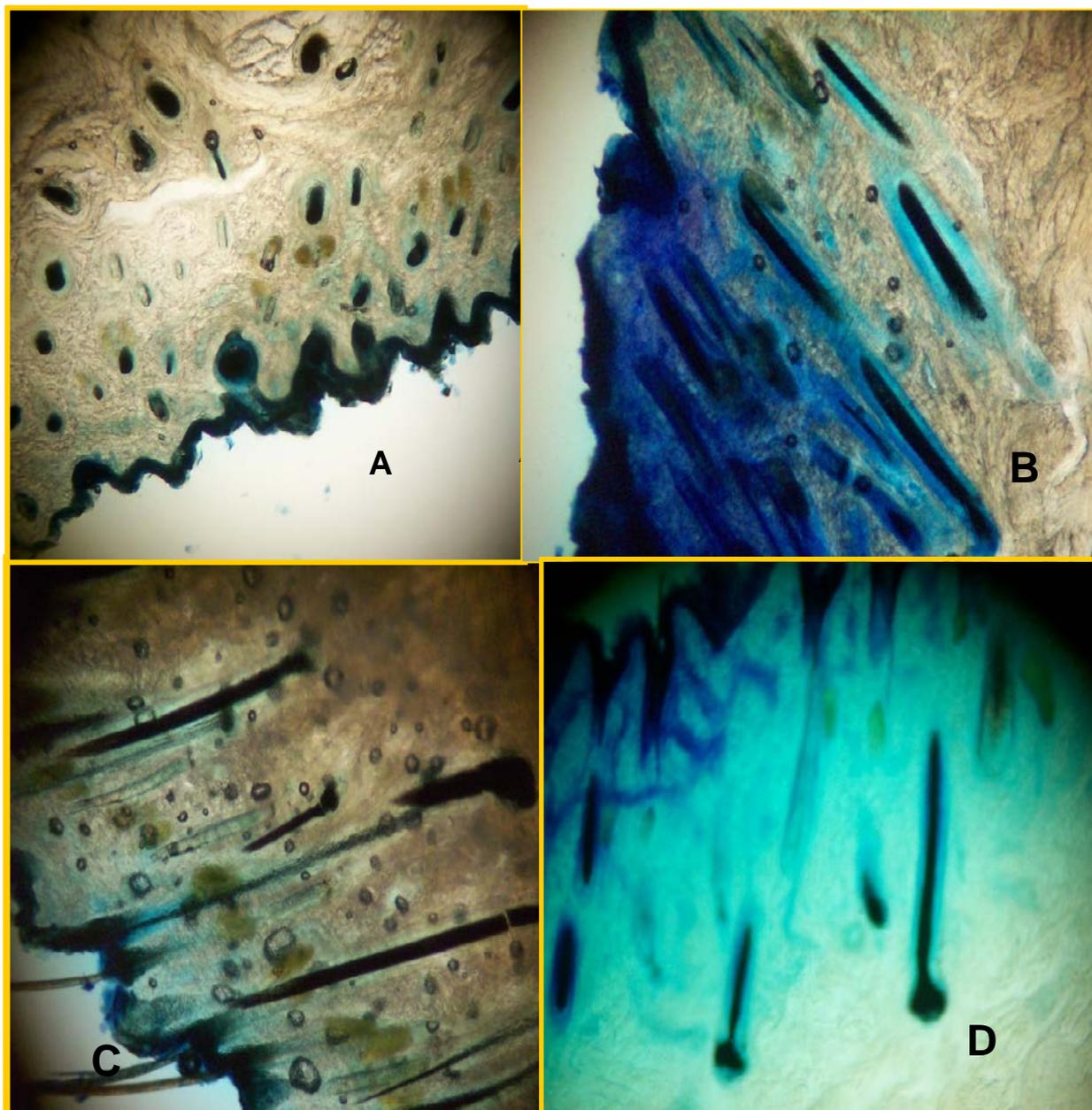


Figura 19. Imágenes de piel bovina coloreadas con Azul de metileno:

A. Buffer 4X. B. Sulfito 40X. C. Urea 10 X D. Tensioactivo.40X.

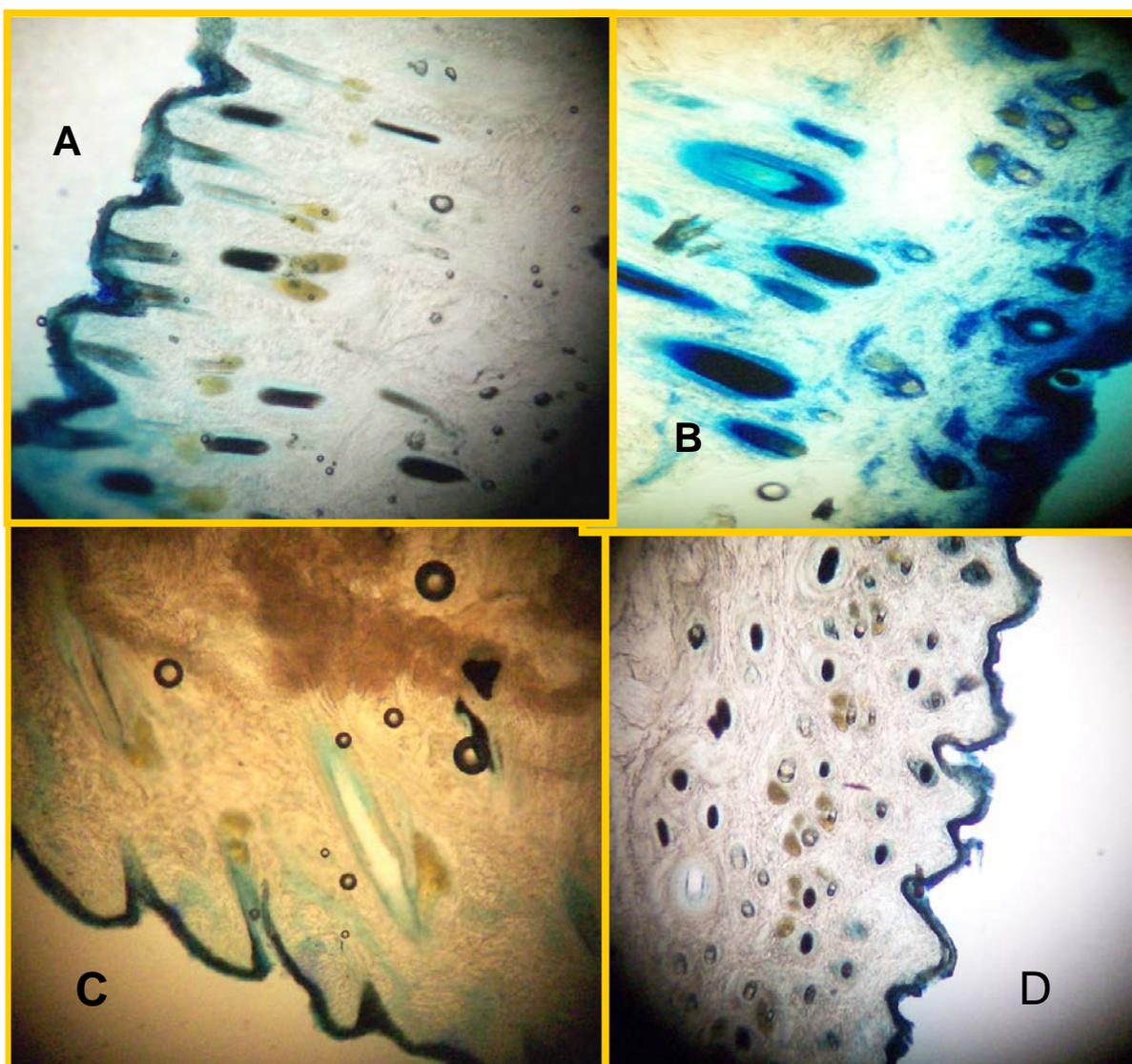


Figura 20. Imágenes de piel bovina coloreadas con Azul de metileno: A. Sulfito-Urea 10X. B. Sulfito-tensioactivo 40X. C. Sulfito-emulsion 40X. D. Emulsion .4X

G.4 Espectroscopía

El resultado de los análisis estadísticos nos permite inferir que no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los pretratamientos y el grupo control, tampoco entre el grupo control y los terpenos presentes en la emulsión. Esto podría explicar porqué las pieles bovinas tratadas solamente con emulsión no sufrieron ninguna alteración en relación a los ácidos grasos, de acuerdo con los datos de la región espectral analizada (2600 a 3800 cm^{-1}) que se refiere a los modos vibracionales CH, referentes a las cadenas de ácidos grasos. En las figuras 21-29 se presentan los gráficos de las lecturas espectroscópicas.

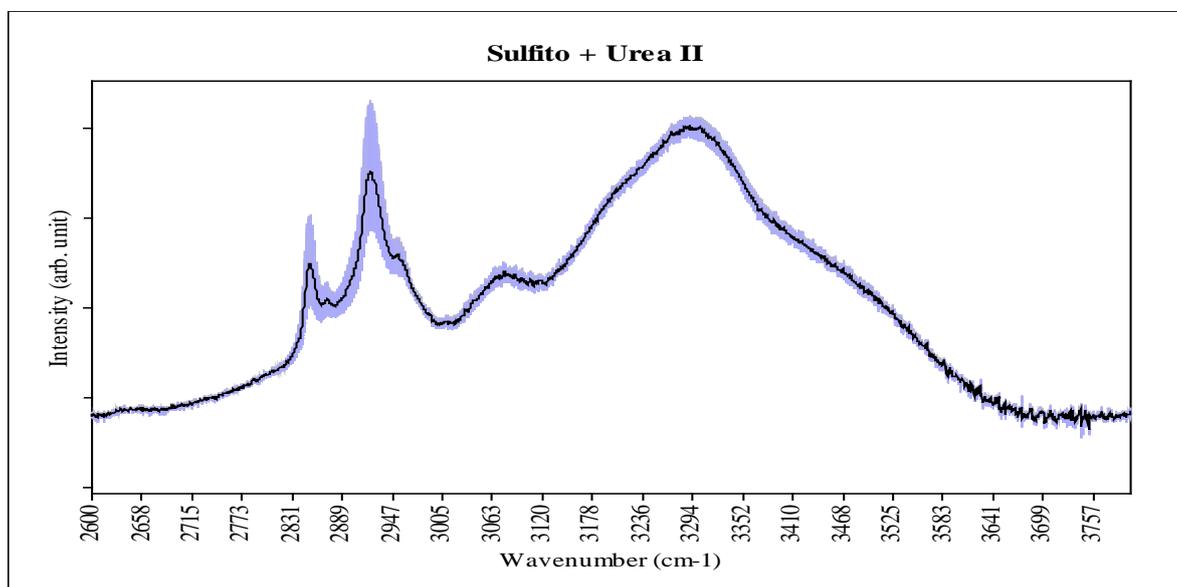


Figura 21: Sulfito-Urea

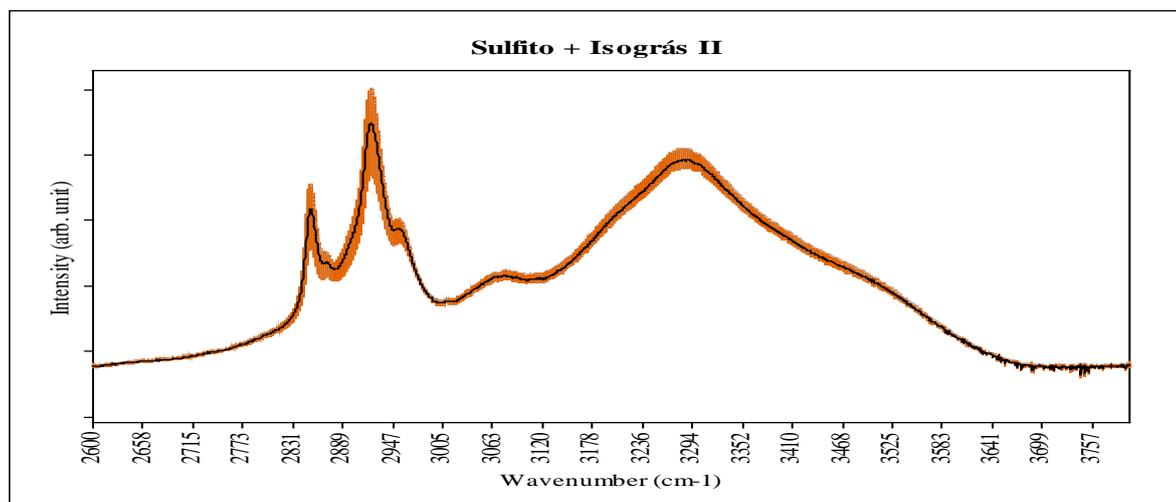


Figura 22: Sulfito-Tensioactivo

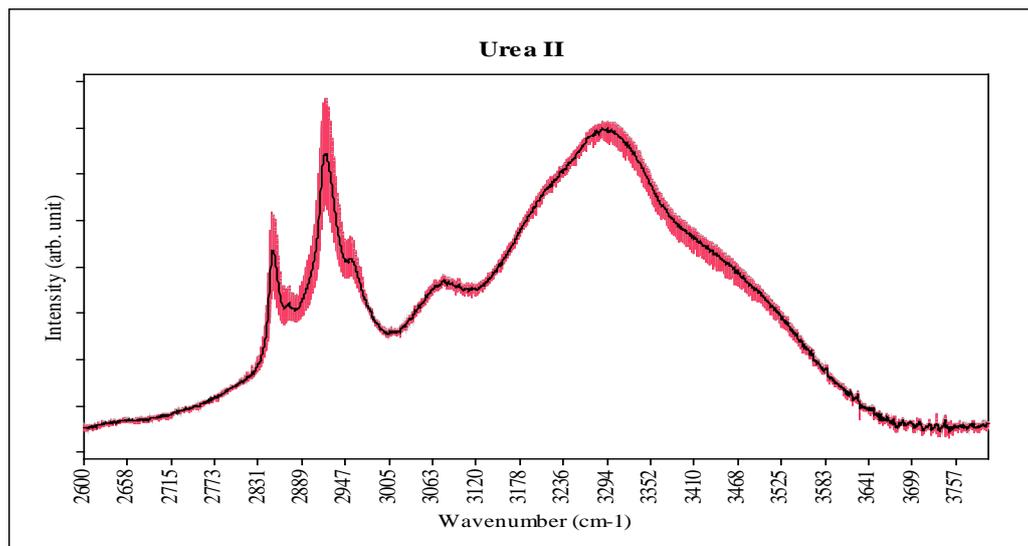


Figura 23: Urea

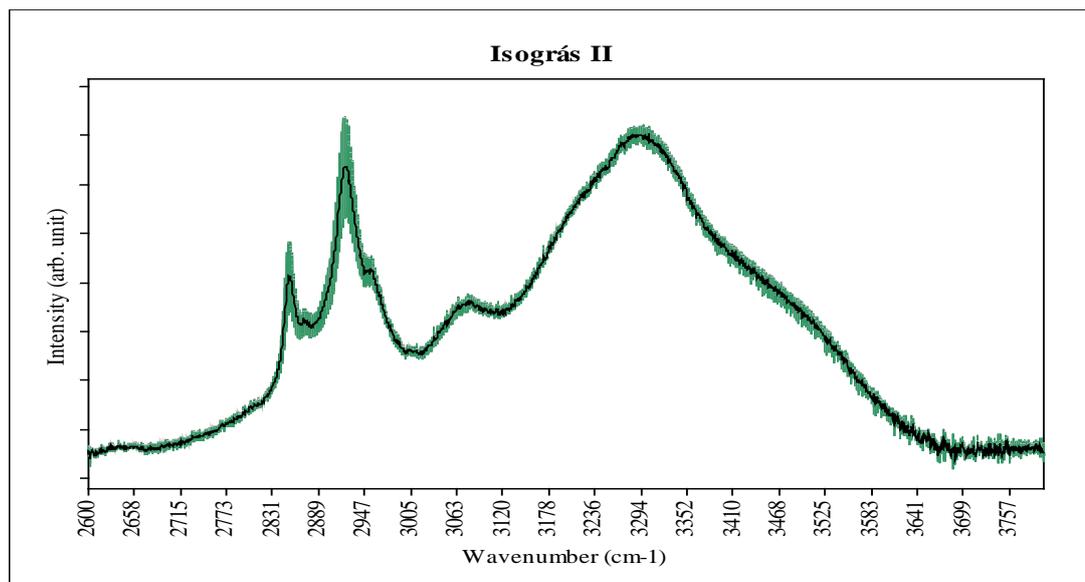


Figura 24: Tensioactivo (Isográs)

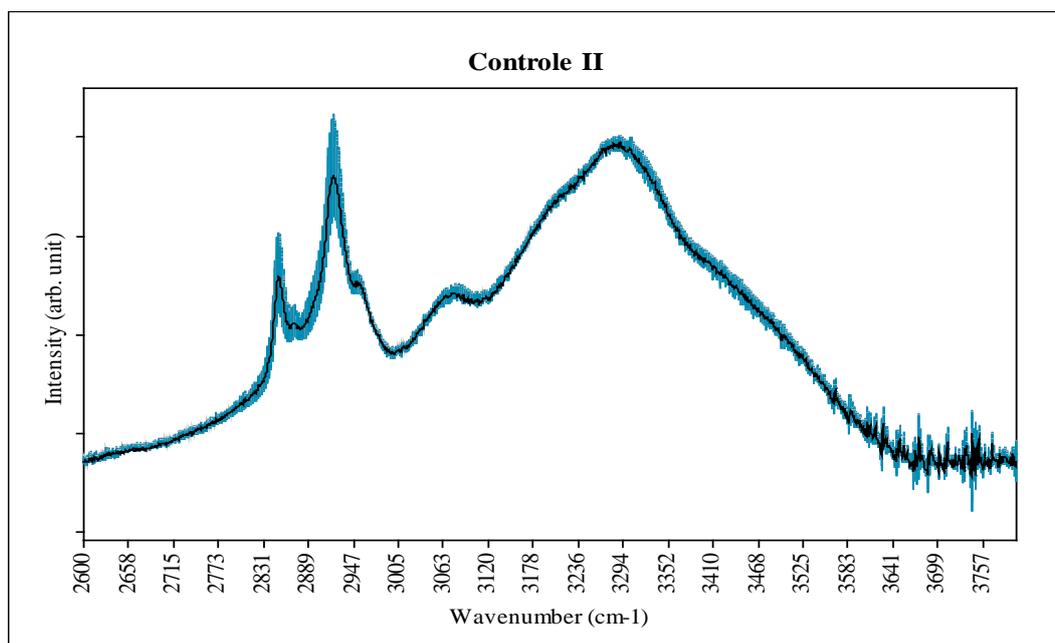


Figura 25 : Control

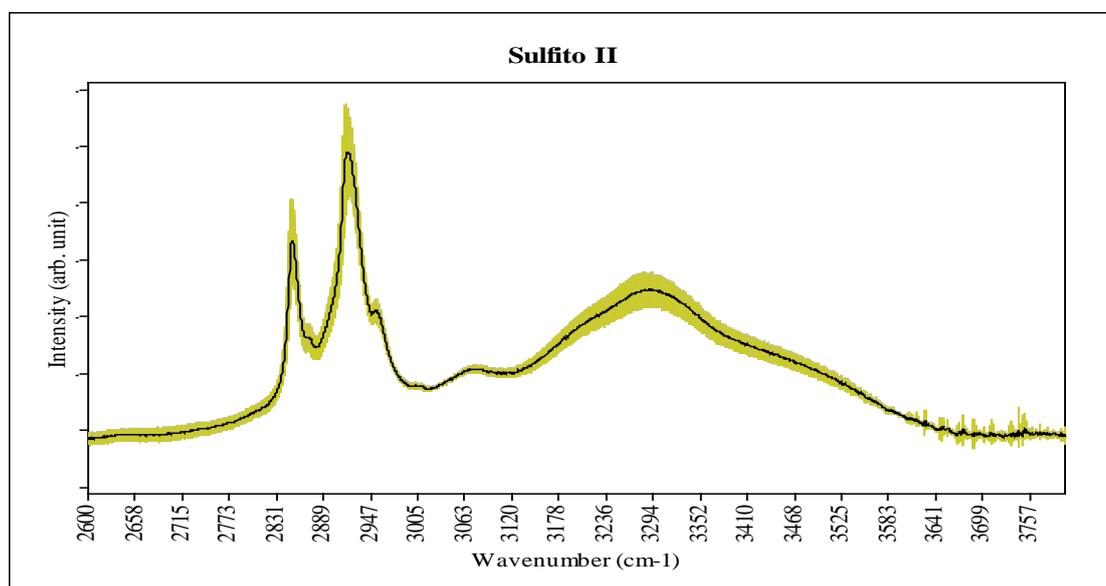


Figura 26: Sulfito

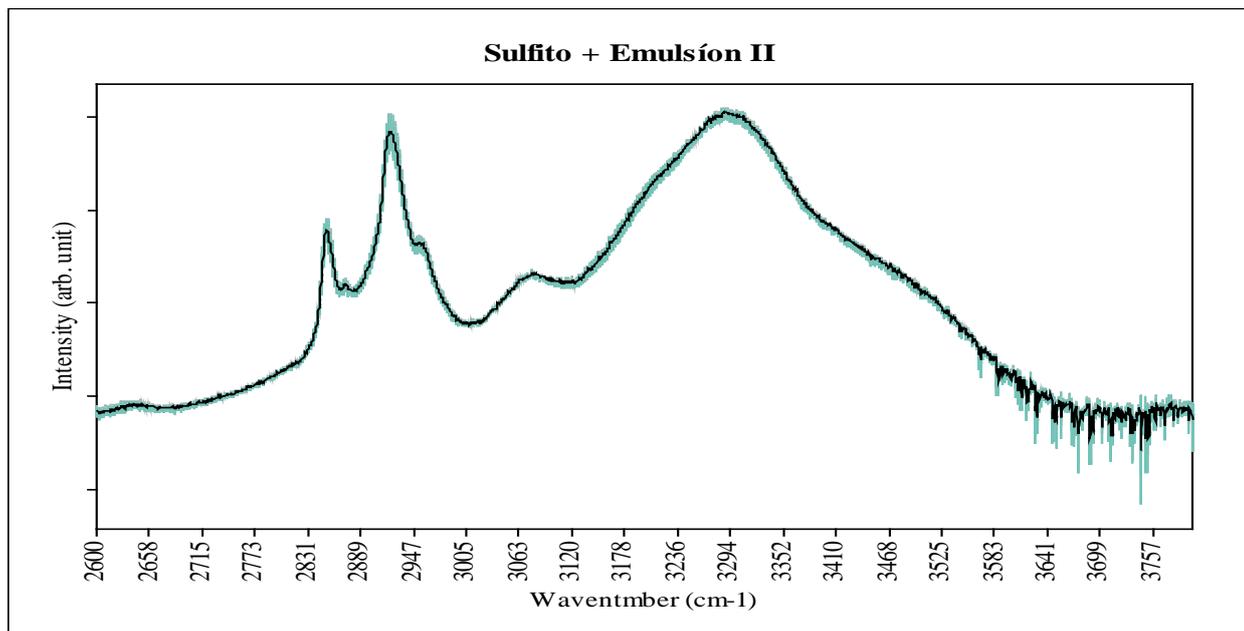


Figura 27: Sulfito-Emulsión

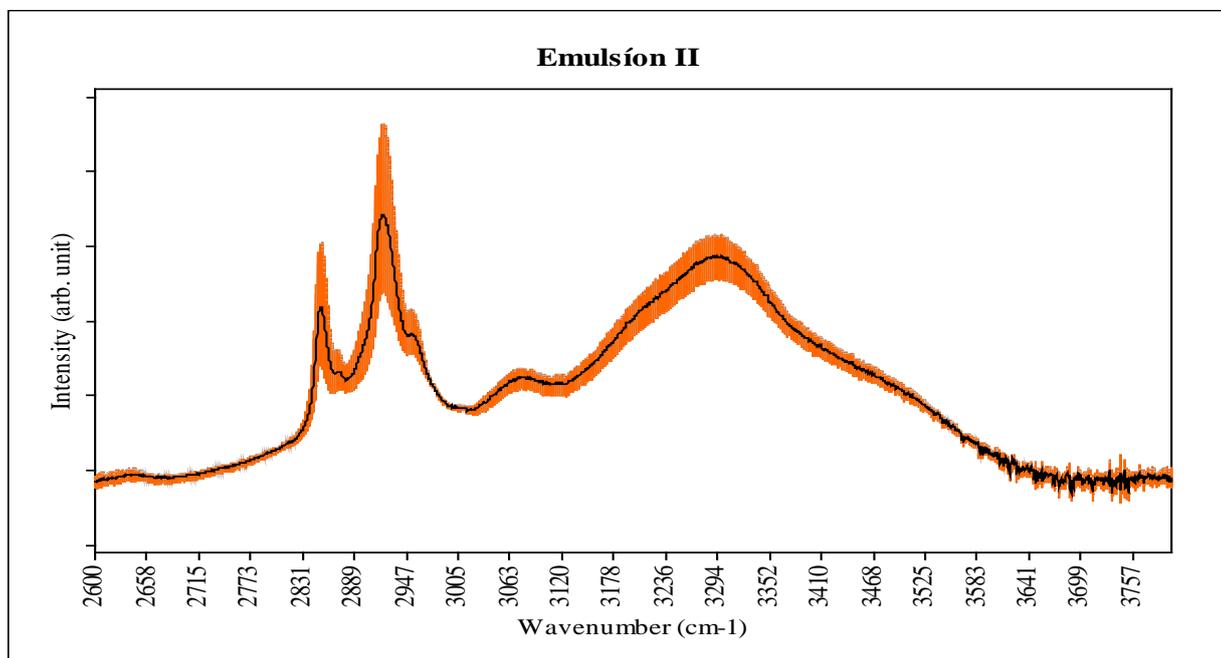


Figura 28: Emulsión

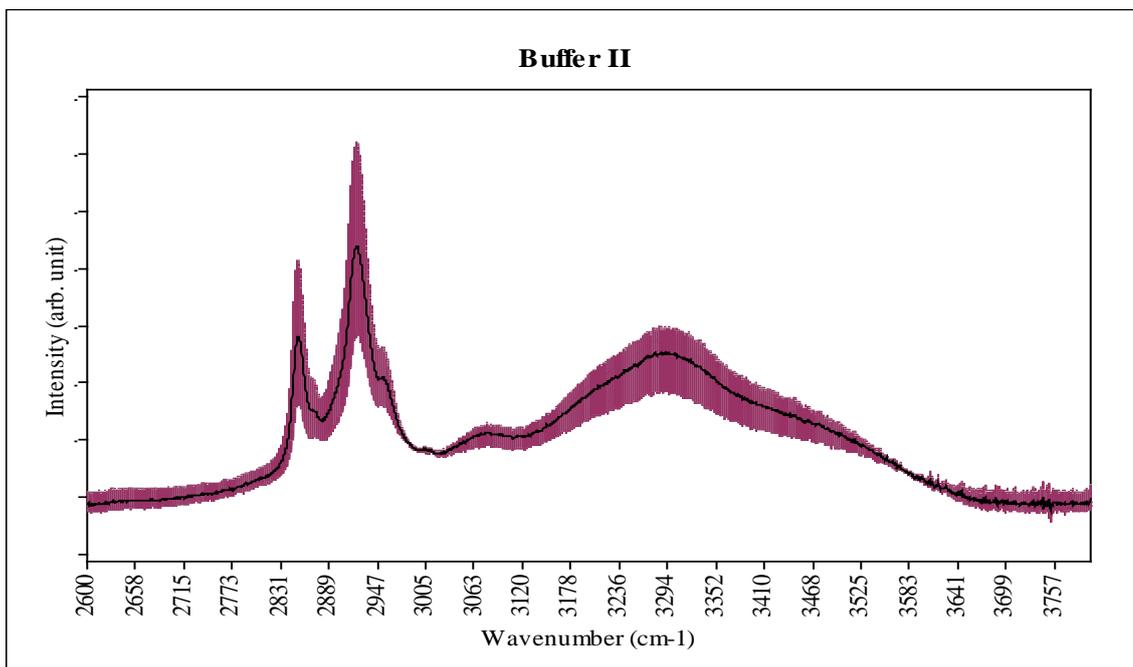


Figura 29: Buffer

H. DISCUSION

Los distintos pretratamientos generaron cambios de diferente intensidad tanto en la morfología de la piel bovina como en la permeabilidad de esta a los colorantes.

Con respecto al epitelio, el efecto queratolítico del sulfito se corroboró por la ruptura de la capa cornea manifiesta mediante la observación de las fotografías obtenidas con el MET. Este cambio se originaría por que el sulfito de sodio da lugar a la reacción conocida como sulfitólisis, en la cual la cistina (con enlaces disulfuro) de la queratina, es convertida en S-sulfocisteína y cisteína (70).

La ruptura de los enlaces disulfuro y la incorporación de enlaces SO^{-3} modifican la conformación de las proteínas y afectan sus propiedades por lo tanto, podrían generar una menor capacidad de unión entre los corneocitos.

En cuanto al efecto de los otros reactivos utilizados, la urea en dermatología humana es empleada en el tratamiento de enfermedades hiperqueratósicas por sus efectos queratolíticos (51) y como promotora de la difusión por su capacidad de aumentar el contenido de agua del estrato corneo. A su vez, en combinación con ácido salicílico es utilizada en la ablación no quirúrgica de las uñas en el tratamiento de las

onicomicosis (51). Magnusson (43) describe su efecto desnaturizante sobre la queratina en animales. En nuestro caso no encontramos alteraciones del estrato corneo generadas por la urea e inclusive cuando se combinó a esta sustancia con el sulfito, disminuyó el efecto de este último sobre el estrato corneo. Por otra parte, Williams (38) señala que el efecto de la urea sobre el aumento de difusión es débil. Este resultado es coincidente con nuestra observación en los ensayos de difusión de colorantes, en los que la urea no solo tuvo un escaso efecto sino que también disminuyó el efecto del sulfito sobre la difusión.

Algunos facilitadores de la absorción interactúan con los lípidos intercelulares aumentando su licuefacción y desorganizándolos. Otros interactúan con proteínas intercelulares y desnaturizan la queratina (azona, ácido oleico) mientras que varios combinan ambos mecanismos (DMSO y propilenglicol) (52,54). El polietilenglicol en dermatología humana, es utilizado como vehículo junto con el ácido acetilsalicílico, para remover el estrato córneo y también como supresor de tumores de piel (71). Algunos autores destacan su propiedad como acelerador de la difusión por modificaciones a nivel de lípidos y proteínas del estrato corneo (52). En nuestro caso evaluamos el efecto de los terpenos y del tensioactivo como facilitadores de la difusión, encontrando un efecto mucho mayor en el último. Inclusive los terpenos, al igual que la urea, disminuyeron significativamente la acción del sulfito.

La aplicación de terpenos y tensioactivo se basa en su potencial efecto sobre los lípidos que intervienen en las uniones intercelualres en los estratos más superficiales de la epidermis.

Magnusson (43) señala que la distribución y tipos de lípidos presentes en el SC no se conoce completamente ya que durante la diferenciación de la epidermis de los

mamíferos se producen cambios en su composición en concordancia con los requerimientos de impermeabilidad. Asimismo, en relación a la actividad de los terpenos sobre los lípidos intercelulares, desestima la posibilidad de que existan modificaciones a nivel de las proteínas como mecanismo de aumento de absorción de los terpenos. Sin embargo, Sapra (53) en su trabajo acerca de la aplicación de terpenos en medicina humana, cita la capacidad de los mismos de aumentar la permeabilidad de la piel al interactuar con los lípidos del SC y con la queratina. En nuestro caso no encontramos modificaciones ultraestructurales del estrato corneo cuando aplicamos terpenos e inclusive fueron menos marcadas que las modificaciones generadas por el sulfito. Gupta (72) hace referencia a las diferencias de características estructurales y lipídicas de la piel entre especies distintas. Menciona que cada especie posee una composición lipídica única a nivel del estrato corneo lo que podría explicar los diferentes efectos de los terpenos.

Los lípidos intercelulares de la epidermis humana incluyen colesterol, ácidos grasos libres y ceramidas. Las ceramidas en forma de láminas ordenadas comprenden la mayoría de estos lípidos (73). De acuerdo con Bowstra (7) es fundamental para la función de barrera de la piel, el estado en fase cristalina de los lípidos intercelulares. Esta organización en estrato corneo humano ha sido analizada en años anteriores por difracción de rayos X. En la actualidad estos lípidos son estudiados por sincrotrón y microscopía electrónica de criofractura. En los años ochenta se incorporó además la espectroscopía FTIR (7).

Las modificaciones que producen los terpenos sobre la epidermis fueron analizadas por Jain y Narisetty con FTIR (74). Utilizaron terpenos al 5% w/v en alcohol en piel de ratones sumergidas en la solución durante 12 horas. Los autores concluyeron que la interrupción de los puentes de hidrógeno de las ceramidas por los terpenos fue el mecanismo posible del aumento de la permeabilidad de la droga en estudio (hidrocloruro de imipramina).

Los modos vibracionales de los lípidos analizados con FTIR se encuentran en la región 2600-3800 cm^{-1} (64). En nuestro caso los resultados de los análisis estadísticos de los espectros analizados (2600 a 3800 cm^{-1}) en la región espectral que se refiere a los modos vibracionales CH, correspondientes a las cadenas de los ácidos grasos del grupo control y el grupo tratado con emulsión de terpenos, se posicionaron en un mismo grupo por similitud. Esto podría significar que la región de los ácidos grasos de las pieles bovinas tratadas con emulsión no sufrió alteraciones. Este resultado explicaría el escaso efecto de la emulsión de terpenos sobre la permeabilidad al colorante en el presente trabajo.

Al analizar el proceso de descamación del estrato corneo Egelrud et al (75) propusieron que uno de los mecanismos involucrados en la descamación era la proteólisis regulada de las estructuras adhesivas intercelulares. De acuerdo con este autor sería evidente que una de las enzimas involucradas en el proceso es una quimotripsina (SCCE, stratum corneum chymotryptic enzyme); esta serinproteasa con especificidad de sustrato primaria tipo quimotripsina que ha sido clonada y expresada en células de mamífero, posee propiedades enzimáticas y una localización tisular que permite suponer que es responsable de la degradación de partes intercelulares de los

desmosomas, procedimiento que es prerrequisito de la descamación(75,76). Por otra parte, Roberts and Brunt (48) en 1985 analizaron distintas moléculas de adhesión celular en cultivo de queratinocitos humanos y el efecto que ejercía sobre ellas la tripsina. Encontraron que la enzima producía pérdida de la adhesión intercelular por clivar una glicoproteína de PM 126 Kda. A partir del conocimiento actual se puede afirmar que el efecto obedece a la acción de la enzima sobre una de las familias de proteínas más importantes para la adhesión intercelular, las cadherinas que son glicoproteínas con PM entre 120 y 140 Kda (77). Las cadherinas son componentes fundamentales de los desmosomas y constituyen el principal mecanismo de unión intercelular de esta estructura (78,79). A partir de estos antecedentes postulamos que la pérdida de desmosomas encontrada en todos los casos en que se utilizó tripsina obedece al efecto de dicha enzima. Sin embargo, el efecto sobre la separación celular en los estratos basal y espinoso fue distinto según el pretratamiento utilizado, lo que permite especular que distintas sustancias generan efectos sobre otros mecanismos de unión además del efecto de la tripsina sobre los pretratamientos.

Briggaman (80) trabajó con suspensiones de células de epidermis de embriones de humano sumergidas en tripsina 0,4% durante 45 minutos. Al final del ensayo el autor observó separación en la unión dermis epidermis. Las láminas de epidermis estaban compuestas de todos los estratos, incluido el basal. La dermis, luego de separarla de la epidermis conservaba la lámina basal coloreada débilmente con PAS. Zugno (56) describió que la tripsina producía su efecto también sobre la unión dermis-epidermis de la piel bovina.

Stirtz y Schroder en relación al proceso de depilado enzimático analizaron la lámina basal. Propusieron que las primeras manifestaciones de la acción proteolítica se producían en la región de la lámina lúcida de la lámina basal favoreciendo de este modo la separación epidermis/dermis (22). En nuestro estudio la PAS positividad en la región de la lámina basal fue encontrada en todos los casos, esta observación se vio reforzada por la microscopia electrónica. Los principales componentes de la lámina basal son proteínas como colágeno tipo IV, lamininas y entactina. La permanencia de esta estructura indicaría que estas sustancias no son tan sensibles al efecto de la tripsina como otras proteínas. Esto podría relacionarse con el tiempo en que la tripsina actuó, ya que en un trabajo previo (81) en que se realizó una exposición mas prolongada a la enzima encontramos desprendimiento de la epidermis con pérdida de esta lámina. Por lo tanto el tiempo de la exposición a la proteasa podría ser un factor muy importante para determinar el daño sobre la lámina basal. Pese a no haber afectado la afinidad tintorial y la ultraestructura de la lámina basal, los distintos pretratamientos generaron desprendimiento dermis-epidermis, especialmente cuando se utilizo sulfito o sulfito y tensioactivo. La lámina basal se conecta con las células epiteliales por receptores de adhesión (integrinas). El posible efecto de la tripsina sobre las integrinas explica la separación entre epitelio y lámina basal encontrado con algunos de los tratamientos no acompañado de daño de la lámina basal.

Durante las últimas décadas se ha discutido mucho acerca de la importancia de la absorción de sustancias, no por la epidermis, sino atravesando los anexos cutáneos. Especialmente en el ser humano el papel de los apéndices en la penetración transdérmica resulta controvertido debido a la escasa cubierta pilosa (menos del

0,1% de la superficie total) de esta especie (54). En los años sesenta se realizaron estudios que concedían a la vía folicular escasa importancia en el transporte percutáneo como consecuencia del predominio de la vía intercelular epidérmica que ocupaba mayor superficie. Sin embargo, resultados de investigaciones posteriores pusieron en duda este concepto (4,82). Lademann (83) estudió in Vitro, mediante técnicas histológicas partículas de 320 nm de diámetro marcadas con sustancias fluorescentes en piel de oreja de porcino y observó que las partículas penetraron en el folículo luego de friccionar la piel. Para analizar la importancia de la vía folicular Meidan (82) realizó ensayos cualitativos en ratones sin pelo con colorantes que demostraron su acumulación en el folículo piloso. Al mismo tiempo la mayor absorción de algunos compuestos la observó en humanos en regiones que presentaban densidad folicular importante. A continuación, estos estudios fueron cuestionados ya que a las regiones ricas en folículos se las asociaba con corneocitos de pequeño tamaño que podrían influenciar la absorción. A pesar de la necesidad de mayor cantidad de datos sobre la intervención de los mecanismos de transporte pilosebáceo, en los últimos años algunas comunicaciones proponen que la penetración por esta vía podría ser más importante de lo que se pensaba (34).

En medicina veterinaria, es posible considerar al pelo como barrera inicial en la aplicación tópica de medicamentos en varias especies, ya que es capaz de reducir el contacto de la piel con la formulación. El número de folículos varía de acuerdo a la especie y a la región anatómica. Los humanos poseen 40-70 folículos/cm², los bovinos 890/cm², los ovinos 10.000/cm². Ante una importante pilosidad los apéndices cutáneos se transforman en vías de difusión muy útiles debido a la disminución del espesor del estrato corneo a este nivel y a la menor resistencia

de las células epiteliales que lo recubren (8,72). Magnusson (43) menciona a los folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas como vías que a través del estrato corneo facilitan la absorción de sustancias tóxicas. De este modo y de acuerdo con este autor las áreas cubiertas de pelo presentarían mayor superficie disponible para la absorción transdérmica y la densidad de folículos pilosos sería un factor determinante del aumento de la permeabilidad. Este autor también propone que el transporte “vía apendicular” en vaca y oveja podría ser más importante que el trans e intercelular a nivel de la epidermis. A su vez este aumento estaría relacionado con las invaginaciones del estrato corneo las que incrementarían el área de superficie. De este modo las regiones cubiertas de pelo abarcarían una superficie mayor disponible para la absorción transepidérmica (43). En nuestro trabajo la importancia de esta vía fue muy evidente en las muestras coloreadas con azul de metileno, en las que cuando existió permeabilidad, esta se manifestó mucho más alrededor de los folículos pilosos. Vale destacar que el pretatamiento con sulfito de sodio fue fundamental para que esto ocurriera. Cantera (33) considera que la tripsina probablemente atravesase el estrato corneo por las aberturas que representan los folículos pilosos, esta difusión puede ser asistida por un tratamiento alcalino moderado y la acción de tensioactivos y solventes apropiados. Sin embargo, nosotros encontramos que el agregado de tensioactivos o urea disminuían el efecto del sulfito sobre la permeabilidad.

Durante el depilado y previo al curtido, se extraen el pelo, la epidermis, las proteínas no colagenosas y la sustancia interfibrilar cementante localizada en la superficie de la fibrilla. El proceso de curtido incluye el efecto de empaquetar el colágeno sin dañar su estructura y rellenar los espacios de la dermis (26, 28, 84). En trabajos

previos se destacó la importancia de controlar la actividad enzimática sobre el colágeno ya que sin esta supervisión se corre el riesgo de alterar la calidad del cuero final (33). Einbinder en 1966(85) analizó histológicamente el efecto de la tripsina 2,5 mg/10 ml en buffer tris 0,05M, 37°C durante 30, 90 minutos y a intervalos de 4horas sobre piel de humano sumergida en esta solución. El autor observó que luego de 4h el colágeno se separaba en fibrillas en la dermis y atribuyó este efecto a la pérdida de sustancia cementante por acción de la enzima. Cantera (86) resumió opiniones de especialistas que analizaban el proceso de depilado enzimático y también aludió a que este tipo de depilado era el producto de proteasas que hidrolizaban y eliminaban proteoglicanos ubicados en los espacios interfibrilares, alrededor del folículo y en la lámina basal. Riffel en 2003 trabajó con proteasas extracelulares de bacterias queratinolíticas de potencial uso en el depilado enzimático. Sumergió piel de bovino durante una noche a 25°C en soluciones de enzima, como control utilizó piel sin enzima a la misma temperatura. Al finalizar el ensayo no observó diferencias entre el colágeno tratado y el control (87). Sin embargo, en un ensayo preliminar a esta tesis aplicada en muestras de piel de bovino sumergidas en combinación de proteasas durante 17 horas, encontramos cambios en la afinidad tintorial de las fibras colágenas utilizando coloración tricrómica de Masson (81).En el presente trabajo, en cambio, la coloración de las fibras colágenas no se alteró. Pero sí se observó desorganización del patrón fibrilar del colágeno cuando se realizó un pretratamiento con sulfito de sodio solo, y no cuando se lo combinaba con otras sustancias. Este resultado se vio corroborado por microscopia electrónica. Por lo que la alteración observada en los casos en que se aplicó sulfito solo es negativa para el proceso de curtiembre. El uso de productos

como tensioactivos o emulsión de terpenos disminuyen notoriamente los efectos negativos del sulfito sobre el colágeno. Es interesante que el agregado de tensioactivo detiene los efectos deletéreos sobre el colágeno pese a generar una buena penetración de colorantes.

La acción prolongada de las enzimas proteolíticas sobre la dermis desmerece la integridad con pérdida de elasticidad de la capa flor (29). En los experimentos realizados para la presente tesis, en ningún caso se observaron alteraciones en las fibras elásticas en los cortes coloreados con orceína (87). Riffel trabajó con piel bovina sumergida en un medio con proteasas extraídas de tres cepas de bacterias queratinolíticas. Al examinar las pieles luego del ensayo observó que las fibras elásticas se presentaban desorganizadas. Diferentes proteasas poseen efectos distintos sobre las fibras elásticas. La elastasa hidroliza a la elastina rápidamente, en cambio la tripsina y la quimotripsina lo hacen con lentitud extrema. Esto se explicaría porque la elastina es un sustrato más pequeño que no se inmoviliza lo suficiente en la superficie de la enzima para que tenga lugar una reacción rápida (88,89). Por lo tanto la necesidad de un mayor tiempo de exposición a la tripsina para que se manifieste el efecto hidrolítico sobre las fibras elásticas podría ser la causa de la diferencia entre los resultados de Riffel y los nuestros.

I. CONCLUSIONES

Los estudios realizados en este trabajo permiten concluir que:

Todos los pretratamientos utilizados previamente a la tripsina, generaron cambios de distinta intensidad en la morfología de la piel bovina y en la permeabilidad de esta a los colorantes.

Es importante la participación de la unidad pilosebácea en la permeabilidad de la piel bovina.

En todos los grupos experimentales, la tripsina generó pérdida de los desmosomas. La lámina basal, en cambio, no fue afectada por la tripsina, el tiempo de exposición a la enzima podría ser un factor muy importante para explicar las diferencias entre este resultado y el de estudios previos.

El sulfito de sodio, utilizado como pretratamiento, generó ruptura de la capa cornea, separación dermis epidermis, aumento de la difusión de colorantes y desorganización del patrón fibrilar del colágeno.

Los efectos del sulfito de sodio disminuyeron cuando este se combinó con urea.

Los lípidos intercelulares del estrato corneo no fueron modificados por ninguno de los pretratamientos, ni siquiera por la emulsión de terpenos.

A partir de nuestros resultados se puede considerar que el uso de terpenos y tensioactivos no mejorarían las posibilidades de depilado y sí lo haría el sulfito de sodio.

J. BIBLIOGRAFIA

1-Espinosa de los Monteros A, Zayas A. Capítulo 18: Piel y anejos cutáneos. Gazquez Ortiz. Tratado de Histología Veterinaria.1ªEdición. Barcelona, España, Editorial Masson, 2004, p.401- 412.

2- Geneser F. Capítulo 17: Piel .Histología. 3ª.Edición. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana, 2000, p. 445-463.

3- Monteiro Riviere N.A.Chapter16. Integument. Eurell JA, Frappier B.Dellmann`s Textbook of Veterinary Histology. Sixth Edition. Iowa, USA, Blackwell Publishing. 2006, p. 320-349.

4- Mills PC, Cross SE. Transdermal drug delivery: Basic principles for the veterinarian .Vet J 2006; 172: 21

5- Denda M. Skin Barrier Function as a Self Organizing System. Forma 2000; 15:227-232.

- 6- Bragulla HH, Homberger DG. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *J Anat* 2009; 214:516-559.
- 7- Bowstra JA, Honeywell-Nguyen PL, Gooris GS, Ponc M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Prog Lipid Res* 2003; 42:1-36.
- 8- Villarino N, Landoni F. Administración Transdérmica de fármacos: una alternativa terapéutica. *Analecta Veterinaria* 2006; 26: 28-37.
- 9- Schaefer UF, Hansen S, Schneider M, Luengo Contreras J, Claus Michael L. Models for skin absorption and skin toxicity testing. *Drug Absorption Studies in situ, in vitro and in silico models*. New York, USA, Edited by Ehrhardt C. Kwang JK. Springer, 2008, p.3- 33.
- 10- Proksch E, Brandner J. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* 2008; 17:1063-1072.
- 11- Dunstan W.R, Credille KM. Born to die: The pathophysiology of Cornification. Proceedings of the forty-eight meeting of the American College of Veterinary Pathology, 1997; 141-157. (Comunicación Personal)

12- Lodish A, Berk A. Capítulo 2: Organización celular y Bioquímica-Integración de células en tejidos. Biología Celular y Molecular. 5ª Edición. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana, 2005, p. 197-213.

13- Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P
Capitulo 21. Tejidos y Cáncer. Introducción a la Biología Celular. 2da. Edición
Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana, 2005, p.698-736.

14- Garrod D, Mohamed B. Hyper-adhesion in desmosomes: its regulation in wound healing and possible relationship to cadherin crystal structure. J Cell Sci 2005; 118: 5743-5754.

15- Watt FM. Selective migration of terminally differentiating cells from the basal layer of cultured human epidermis. J Cell Sci 2005; 118: 5743-5754.

16- Bohnert A, Hornurt J, McKenzie IC, Fusenig NE. Epithelial-mesenchymal interactions control basement membrane production and differentiation in cultured and transplanted mouse keratinocytes. Cell Tissue Res 1986; 244:413-429.

17- Barrandon Y, Green H. Three clonal types of keratinocytes with different capacities for multiplication. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84:2302-2306.

18- Amano, S. Possible Involvement of Basement Membrane Damage in Skin Photoaging. J Invest Dermatol 2009; 14: 2–7.

19-Junqueira L. Capítulo 18: Piel y Anexos. Histología Básica.6ª Edición. Barcelona. Editorial Masson, 2005.359-368.

20- Haines BM, Barlow JR.The anatomy of leather. J Mat Sci 1975; 10: 525-538.

21- Haines BM.The skin before tannage-Procter`s view and now. J Soc Leather Technol Chem 1984; 68:57-70. .

22- Heidemann E. 6.Preservation and Beamhouse Work. Fundamentals of Leather Manufacture. Darmstadt, Germany. Eduard Roether KG, 1993, p. 190-191.

23- Thorstensen T.C.2.Hide and Skin Structure. Practical Leather Technology. Second Revised Edition. New York, USA, Krieger Publishing Company, 1976.p.18-29.

24- Manual de Procedimientos para el Manejo Adecuado de los Residuos de Curtiduría, Instituto Nacional de Ecología, Colonia Tlacopac Méjico DF. 1999

25- Gratacós E, Boleda M, Portavella JM, Adzet G, Lluch J. Tecnología Química del Cuero. Barcelona,1962.

26- Angelinetti A, Cantera C. Remojo, depilado y sus aguas residuales. Problemas y Soluciones. Departamento de ediciones del Instituto Nacional de Tecnología Industrial-INTI. Miguelete, Provincia de Buenos Aires, Argentina, 1987.

27- Hankey VL, Addy K, Landridge DA, Bowen W, Scholz W. The use and subsequent treatment of Surfactants for Leather Processing. J Amer Leather Chem Ass 2001; 96: 205-213.

28- Cantera C. Hair-Saving Unhairing Process Part3. Cementing Substances and the Basement Membrane. J Soc Leather Technol Chem 2001; 93-98.

29- Cantera C. Hair saving unhairing process Part4. Remarks on the evolution of the investigations on enzyme unhairing. J Soc Leather Technol Chem 2001;85: 125-132.

30- Cantera C, Galarza B. Depilados conservadores de pelo ¿Qué hacer con el residuo pelo? Cuero 2005; 404:62-69.

31- Cantera C. Adressing the problem of hair. World Leather 1999; 12-12.

32- Cantera C, Buljan J. Overview: hair- a new raw material, World Leather 1997; 10:51-56.

33- Cantera C. Proceso de depilado conservador del pelo Parte7.El estrato corneo como barrera difusiva .Injuria química y mecánica de la epidermis. Tecnología del Cuero 2004; 11:518-20.

34- Knorr F, Lademann J. Follicular transport route- Research progress and future perspectives. Eur J Phar Biopharm 2009; 71: 173-180.

35- Trabitcz H. Concerning the possibility of employing enzyme in the beamhouse J Soc Leather Technol Chem 1966; 5:382-389.

36- Yates, J.R.Studies in depilation. IX. Effect of skin thickness and diffusion on the rate of depilation of sheepskins, J. Amer Leather Chem Ass. 1969; 64:71-81.

37- Rudall KM. The protein of the mammalian epidermis. Adv Protein Chem 1952; 7: 253-289.

38- Williams A, Barry B. Penetration enhancers. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56:603-618.

39- Cecil R, Loening UE. The reaction of the disulphide groups of insulin with sodium sulphite. *Biochem J* 1960; 76:146-155.

40- Koyama Y, Bando H, Yamashita F. Comparative analysis of percutaneous absorption enhancement by d-limonene and oleic acid based on skin diffusion model. *Pharm Res* 1994; 11: 377-383.

41-. Lehninger A. capítulo 20. Degradación Oxidativa de los aminoácidos. *Bioquímica -Las bases moleculares de la estructura y función celular*. 5ª. Edición. Barcelona, Ediciones Omega, 1972, p.460-461.

42- Gustavson KH. Chapter 8. Lyotropic Effects . *The chemistry and reactivity of collagen*. New York, USA, Academic Press INC Publishers, 1956,p.171-198.

43-Magnusson B, Walters K. Veterinary drug delivery: Potential for skin penetration enhancement. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 50:205-207.

44- Streitwieser A Heathcock C. Capítulo 15. Espectroscopía Infrarroja. Química Orgánica. 3a. Edición. Méjico DF, Mc Graw-Hill –Interamericana, 1993 p. 454-479.

45- Medawar P. B. Sheets of pure epidermal epithelium from human skin. Nature 1941; 148:783-783.

46- Van Scott EJ. Mechanical Separation of the Epidermis from the Corium. J Invest Dermatol 1952; 18: 377-379.

47- Concha M, Vidal A. Producción de equivalentes dermo-epidérmicos autólogos para el tratamiento de grandes quemados y cicatrices queloideas . Cuadernos de Cirugía Valdivia Chile 2002;16: 41-47.

48- Roberts G P, Brunt J. Identification of an epidermal cell-adhesion glycoprotein. Biochem J 1985; 232:67-70.

49- Narishetty Sunil TK , Panchagnula R. Effect of L-menthol and 1,8 cineole on phase behavior and molecular organization of SC lipids and skin permeation of zidovudine .J Control Release 2005;102:59-70.

50- Lim Perry Fung, Liu X, Kang L, Ho P, Cha Y, Chan S. Limonene GP1/PG organogel as a vehicle in transdermal delivery of haloperidol. *Int J Pharm* 2006; 311 :157-164.

51- Bronaugh R. *Percutaneous Absorption: Mechanisms –Methodology-Drug Delivery*. Second Edition Revised and Expanded. New York, USA, Marcel Dekker Inc,1989,p.534-539.

52- Carpentieri- Rodrigues L, Zanluchi J, Grebogi I. *Percutaneous Absorption Enhancers mechanisms and potential*. *Braz Arch Biol Technol* 2007; 50:983-992.

53- Sapra B, Subheet J, Tiwari AK. *Percutaneous Permeation Enhancement by Terpenes: Mechanistic View*. *AAPS J* 2008; 10:120-132.

54- Panchagnula R. *Transdermal Delivery of Drugs*. *Indian J Pharmacol* 1997; 29: 140- 156.

55- Nair V, Panchagnula R. *The effect of pretreatment with terpenes on transdermal iontophoretic delivery of arginine vasopressin*. *Farmaco Prat* 2004; 59:575-581.

56- Zugno L. The effect of trypsin on soaking of salt of cured hides, J Amer Leather Chem Ass 1992;87:1.207-219.

57- Prophet E, Mills B, Arrington J, Sobin L. Laboratory Methods in Histotechnology. Armed Forces Institute of Pathology (AFIP), United States of America Washington DC, American Registry of Pathology, 1992.

58- Reyna JC, Flamini A, Savignone C. Elementos de técnicas histológicas básicas. Publicación de la Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.1997.

59- Manual del Curso Microscopía Electrónica de Transmisión y Barrido: Técnicas para el procesamiento de especímenes biológicos. Servicio Central de MET, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. Servicio de MEB, Facultad de Ciencias Naturales y Museo UNLP La Plata, Argentina. 2005.

60- Rosado C, Monteiro Rodrigues L. Solvent effects in permeation assessed in vivo by skin surface biopsy. BMC dermatology [Online] 2003. Open Acces. citado junio 2012..

61- Hicks CL, Morales MM, Russell-Campbell E. Use of Agglutination-Sensitive Bulk Starters in the Manufacture of Stirred Curd Cheese. J Dairy Sci 1998; 81:621-630.

62- Titford M. Progress in the Development of Microscopical Techniques for Diagnostic Pathology. J Histotechnol 2009; 11:9-19.

63- Talreja, P.S; Kleene, N.K. Pickens W, Tsuo Feng W, Kasting G. Visualization of the lipid barrier and measurement of lipid pathlength in human stratum corneum. AAPS Pharm Sci [Online] 2001; 3: (2) .citado junio 2012.

64- Movasaghi Z, Rehman S, Rehman I. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues .Applied Spectroscopy Reviews 2008; 43:134-179.

65- Marcelli A. Protein structure and function in the time-domain of vibrational spectroscopies. The promising applications of IR Synchrotron Radiation Micro-Spectroscopy. Acta Physica Polonica 2006; 3:287-303.

66- Percot A, Lafleur M. Direct observation of Domains in Model Stratum Corneum Lipid Mixtures by Raman Microspectroscopy. *Biophys J* 2001; 81:2144-2153.

67- Lawson EE, Anigbogu AN, Williams AC, Barry BW, Edwards HG. Thermally induced molecular disorder in human stratum corneum lipids compared with a model phospholipid system; FT-Raman spectroscopy. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 1998; 54:543-558.

68- Laugel C, Yagoubi N, Baillet A. ATR-FTIR spectroscopy: a chemometric approach for studying the lipid organization of the stratum corneum. *Chem Phys Lipids* 2005; 135: 55-68.

69- Krishna M, Sockalingum GD, Vidyasagar MS, Manfait M. An overview on applications of optical spectroscopy in cervical cancers. *J Cancer Res Ther* 2008;4: 26-36.

70- Clarke HT . The action of sulfite upon cystine. *J Biol Chem* 1932; 97: 235-248.

71- Dainichi T, Satoshi A. Chemical peeling by SA-PEG remodels photo-damaged skin: suppressing p53 Expression and Normalizing Keratinocyte Differentiation. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 416-421.

72- Gupta P, Singh P. Topical immunization: Mechanistic insight and novel delivery Systems. *Indian J Biotechnol* 2004; 3: 9-21.

73- Jager M, Gooris G, Dolbina I, Bras W, Ponc M. Novel lipid mixtures based on synthetic ceramides reproduce the unique stratum corneum lipid organization. *J Lipid Res* 2004; 45:923-932.

74- Jain AK, Narisetty S. Transdermal drug delivery of imipramine hydrochloride.1.Effect of terpenes. *J Control Release* 2002; 79:93-101.

75- Egelrud T, Brattsand M. Purification, Molecular Cloning and Expression of a Human Stratum Corneum Trypsin-like Serin Protease with Possible Function in Desquamation. *J Biol Chem* 1999; 274: 33-40.

76- Egelrud T. Desquamation in the Stratum Corneum. *Acta Derm Venereol* 2000; 208: 44-45.

77- Rufas O, Fisch B. Expression of cadherin adhesion molecules on human gametes. *Mol Hum Reprod* 2000; 2:163-169.

78- Yang T, Dongcai L. Epidermal detachment, desmosomal dissociation and destabilization of corneodesmosin in *Spink5* ^{-/-} mice. *Genes Dev.*, 2004; 18: 2354-2358.

79- Peltonen S, Raiko L. [Desmosomes in Developing Human Epidermis. *Dermatol Res Pract Rev* [Online]2010 citado junio 2012.

80- Briggaman R, Abele D, Harris S, Clayton E. Preparation and Characterization of a viable suspension of postembryonic human epidermal cells. *J Invest Dermatol* 1967; 48: 159-168.

81- Garro M L. et al. Evaluación histológica del efecto de enzimas con actividad depilatoria sobre piel vacuna: Un estudio preliminar. *InVet* 2008;10: 103-110 .

82- Meidan V, Bonner MC, Bozena B. Transfollicular drug delivery-Is it a reality? *Int J Pharm* 2005; 306:1-14

83- Lademann J, Richter H, Schanzer S, Knorr F, Meinke M, Sterry W, Patzelt A. Penetration and storage of particles in human skin :Perspective and safety aspects. *Eur J Pharm Biopharm* 2011;465-468.

84- Sivasubramanian S. Mechanism of enzymatic dehairing of skins using a bacterial alkaline protease. *Chemosphere* 2008; 70:1025-1034.

85- Einbinder JM, Walzer RA, Mandl I. Epidermal dermal separation with proteolytic enzymes. *J Invest Dermatol* 1966; 46:492-504.

86- Cantera C. Hair saving unhairing process Part4. Remarks on the evolution of the investigations on enzyme unhairing. *J Soc Leather Technol Chem* 2001;85: 125-132.

87- Riffel A, Ortolan S, Brandelli A. De-hairing activity of extracellular proteases produced by keratinolytic bacteria. *J Chem Technol Biotechnol* 2003; 78: 855–859.

88- Voet D ,Voet J, Pratt CH. Parte3.Enzimas.Fundamentos de bioquímica la vida a nivel molecular. 2da Edición. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana, 2007,p.312-357.

89- Paul RG, Mohammed D.The use of neutral protease in enzymatic unhairing.
J Amer Leather Chem Ass 2001;96:180-185.



