

Evaluación histológica del efecto de enzimas con actividad depilatoria sobre piel vacuna. Un estudio preliminar

GARRO M.L.¹; BARBEITO C.^{2,3}; MARIO R. C.²; GALARZA B. C.¹; CANTERA C. S.⁴

Resumen

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 la epidermis, a nivel del estrato corneo, se ubican lípidos que ocupan casi por completo el espacio intercelular entre los queratinocitos y desempeñan un importante papel como barrera hidrofóbica. Esta barrera debe transformarse para permitir el paso de las enzimas depilatorias hacia sus sitios de acción: folículo piloso/pelo y membrana basal. Las estructuras mencionadas deben eliminarse sin dañar el colágeno, proteína determinante de la calidad del cuero. Sobre trozos de piel bovina fueron analizados los efectos de diferentes pretratamientos tendientes a favorecer la penetración de enzimas depilatorias. Se utilizaron tensioactivos y sulfito de sodio como pretratamiento y posteriormente tratamientos con proteasas comerciales, una de origen pancreático y otra alcalina. El control fue tratado con buffer de bicarbonato de sodio. Las muestras se colorearon con Hematoxilina Eosina y Tricrómico de Masson. En los cortes sometidos a acción enzimática se encontraron cambios en el colágeno que podrían alterar la calidad del cuero. Se concluye que el estudio histológico de la piel permite evaluar los cambios que pueden ocasionar los tratamientos que se realizan para convertirla en cuero.

Palabras clave: (enzimas depilatorias), (histología), (epidermis)

Histologically evaluation of the action of depilatory enzymes on bovine skin.
A preliminary study.

Summary

Leather industry produces potentially hazardous waste which depends of the unhairing process employed by the tannery. To diminish pollution, modified unhairing systems had been developed enzymatic among them. It is important to know the processes enzymes have to go through, to reach its site of action. In the epidermis at stratum corneum, corneocytes are surrounded by lipids which plays a crucial role as hydrophobic barrier. This barrier must be transformed to allow the enzymes reach its site of action: the follicle-hair and basal membrane. That structures

1. Personal de apoyo a la Investigación. Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CICPBA). Centro de Investigación y Tecnología del Cuero (CITEC, M.B.Gonnet). 2. Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. 3. Miembro del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas (CONICET). 4. Miembro de la Carrera del Investigador Científico y Tecnológico de la Comisión de Investigaciones Científicas Provincia de Buenos Aires (CICPBA).

Recibido: 24/08/08 - Aceptado: 02/12/08

InVet. 2008, 10(2): 103-110
ISSN(papel): 1514-6634
ISSN (on line) 1668-3498

must be eliminated without collagen damage. Collagen is the principal protein related with leather quality. In this study, the effect of different treatments to allow enzyme depilatory passage through epidermis, was analyzed in bovine skin pieces. First, surfactants and sodium sulphite were employed as penetration enhancers followed by and alkaline and pancreatic proteases. Bicarbonate buffer was used as control. Samples were treated with histological techniques; Hematoxilin and Eosin and Masson's Trichrome stain. In the samples under enzymatic treatment, the changes that we have found, could be responsible of leather alteration. Histological study allows to evaluate the changes produced by the process of transforming bovine skin in to leather.

Key words: (Histology), (Depilatory enzymes), (epidermis)

Introducción

En la actualidad, las curtiembres tienen que lograr mantener un mercado interno y proyectarse a un mercado internacional, elaborando el cuero con la calidad requerida y al mismo tiempo, generar un efluente gaseoso y líquido que satisfaga los límites permisibles para sus descargas, así como realizar una apropiada disposición de sus residuos sólidos. En este sentido, la cantidad de sulfuros permitida en las descargas de la curtiembre está sujeta a límites muy estrictos: en el efluente líquido $< 1 \text{ mg sulfuros/l (S}^{\ominus}\text{)}$, (Resolución 389/1998. Ministerio de Obras y servicios Públicos de la Provincia de Buenos Aires); en el gaseoso $< 15 \text{ ppm ácido sulfhídrico(H}_2\text{S)}$

(United States Environmental Protection Agency) y en los residuos sólidos $< 500 \text{ mg ácido H}_2\text{S/kg de sólido a disponer}$ (Decreto N° 831/1993 de la Ley Nacional 24.051 sobre el régimen de desechos peligrosos. Poder Legislativo Nacional)

El sulfuro de sodio (Na_2S) del efluente puede generar H_2S gaseoso (sulfuro de hidrógeno) cuando disminuye el pH de los líquidos residuales a valores inferiores a 10, ya sea durante el procesamiento de la piel o durante el tratamiento del efluente líquido.

Los riesgos para la salud que genera la composición de estos efluentes estimula el desarrollo de tecnologías 'limpias' dentro de las cuales se encuentra el sistema de depilado enzimático conservador de pelo sin (Na_2S)^{8,17}.

Cuando se utilizan proteasas en el proceso de pelambre, prescindiendo del sulfuro de sodio como agente depilante, es imprescindible controlar la proteólisis. Es necesario evitar que se propague la actividad enzimática hacia el colágeno y la elastina de la dermis desmereciendo las propiedades organolépticas y estructurales del cuero^{4,17}. Esta dificultad en controlar la actividad de los preparados enzimáticos ha generado desconfianza en los técnicos curtidores hacia el uso de enzimas en los procesos de remojo y depilado-efecto de apelmbrado, especialmente cuando se intenta elaborar diferentes tipos de cueros vacunos⁵. El Centro de Investigación y Desarrollo del Cuero (CITEC, Centro de Investigación y Tecnología del Cuero, Instituto Nacional de Tecnología Industrial, (INTI-cueros), Campus Tecnológico Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC), MB GONNET, Prov. de Buenos Aires) propuso un modelo integral de depilado que involucra varias etapas: fase I, injuria química-biológica-mecánica de la epidermis; fase II, difusión del agente depilador, preferentemente a través de la epidermis al disminuir la resistencia de la barrera de este tejido; fase III, proceso de depilado propiamente dicho y fase IV, efecto de apelmbrado-apertura fibrosa.

Como puede observarse, este modelo destaca las acciones dirigidas a injuriar la epidermis para facilitar la llegada del agente depilante. La penetración a través del estrato corneo, comprende mecanismos de transporte intra e

intercelular¹⁵. De esta manera, se intenta alcanzar lo más rápidamente posible la membrana basal, preservando la estructura colágena.

La primera barrera que opone la epidermis a la difusión se ubica en el estrato corneo. La principal ruta de penetración se sitúa en la región intercelular, sitio donde los lípidos desempeñan un papel irremplazable en la formación de la barrera hidrofóbica de la piel^{3,15,23}.

Estas rutas son las que deben modificarse o alterarse para permitir el paso de las enzimas depilatorias hacia sus sitios de acción.^{2,18}

El estudio histológico permite evaluar las alteraciones que pueden ocasionar los distintos tratamientos orientados a modificar biológica y químicamente la epidermis (acción trípica^{1,20,24}, sulfitólisis^{6,19}, acción de álcalis, urea y tensioactivos^{3,16}). A través de diferentes técnicas histológicas, es posible estudiar la separación de las células epiteliales de la epidermis y folículo piloso, como así también las modificaciones que puede experimentar la estructura colágena de la dermis.

En el presente trabajo, se analizan los efectos de distintos tratamientos tendientes a favorecer la penetración de enzimas proteolíticas a través de la epidermis y dermis. El objetivo rector de este estudio preliminar, es demostrar la utilidad de distintas técnicas histológicas para poner en evidencia 'las huellas' dejadas sobre la epidermis durante la injuria biológica y química producida al utilizar sulfito de sodio (reacción de sulfitólisis), tensioactivo aniónico (dodecilsulfato de sodio) y proteasas¹⁴.

Materiales y métodos

Se utilizaron trozos de piel de 6 bovinos Aberdeen-angus adultos provenientes de la región sacro lumbar, de 6cm x 6cm, conservados a 5° C durante su traslado.

Las muestras se sumergieron en distintas soluciones a 28-30°C y pH 8-8,5. Se utilizaron dos volúmenes distintos de soluciones, uno de 0,2 l, a escala de laboratorio (A) y otro de 5 l (B). El tiempo de duración de los ensayos se eligió a

partir de lo establecido por Zugno en 1992²⁴.

Pretratamientos y tratamientos:

En el presente trabajo se realizaron cuatro ensayos 1, 2, 3 y 4 en dos etapas, denominadas pretratamiento y tratamiento de 5 y 17 horas de duración respectivamente. El líquido utilizado en el pretratamiento fue igual en los cuatro ensayos y consistió en colocar la muestra en una solución de sulfito de sodio (1,23g/l) y dodecilsulfato de sodio 0,25g/l, (tensioactivo aniónico). En el tratamiento, variaron los reactivos en los distintos ensayos. En los ensayos 1 y 3 se utilizó únicamente proteasa de origen pancreático (500 mg/l) mientras que en el tratamiento para los ensayos 2 y 4 además de la enzima citada, se agregó proteasa alcalina (250 mg/l, enzimas provistas por Cergen srl, Buenos Aires, Argentina). En lo que respecta a los volúmenes de solución, se emplearon 200 ml en los ensayos 1 y 2 y 5l en los ensayos 3 y 4. Como control, se empleó piel sumergida en buffer bicarbonato de sodio 0,05 M de pH 8,5. Los tratamientos y pretratamientos realizados se resumen en la Tabla 1.

Las pieles se fijaron en formol al 10% y se incluyeron en parafina. Con micrótopo de deslizamiento se realizaron cortes perpendiculares a la superficie de la piel de 4-5µm de espesor que se colorearon con Hematoxilina Eosina. En el caso del grupo B, se realizó también la coloración tricrómica de Masson según Goldner¹³.

Resultados

Los cortes de las muestras control, sumergidas en buffer bicarbonato de sodio pH 8,5 y 0,05 M, presentaron la epidermis y la lámina basal intacta. La disposición y las propiedades tintoriales de las fibras colágenas fueron las esperadas con las técnicas utilizadas, observándose de color rosado en los cortes coloreados con hematoxilina y eosina y verdes en aquellos en los que se utilizó la técnica tricrómica de coloración (Figura 1).

Tabla 1

| Ensayo | Pretratamiento con Sulfito de sodio(1,23g /l)+ dodecilsulfato de sodio(0,25 g/l) | Tiempo (horas) | Tratamiento enzimático | Tiempo (horas) | Total (horas) |
|--------|--|----------------|--|----------------|---------------|
| 1 | 0,21 | 5 | Proteasa de origen pancreático | 17 | 22 |
| 2 | 0,21 | 5 | Proteasa de origen pancreático + proteasa alcalina | 17 | 22 |
| 3 | 51 | 5 | Proteasa de origen pancreático | 17 | 22 |
| 4 | 51 | 5 | Proteasa de origen pancreático + proteasa alcalina | 17 | 22 |

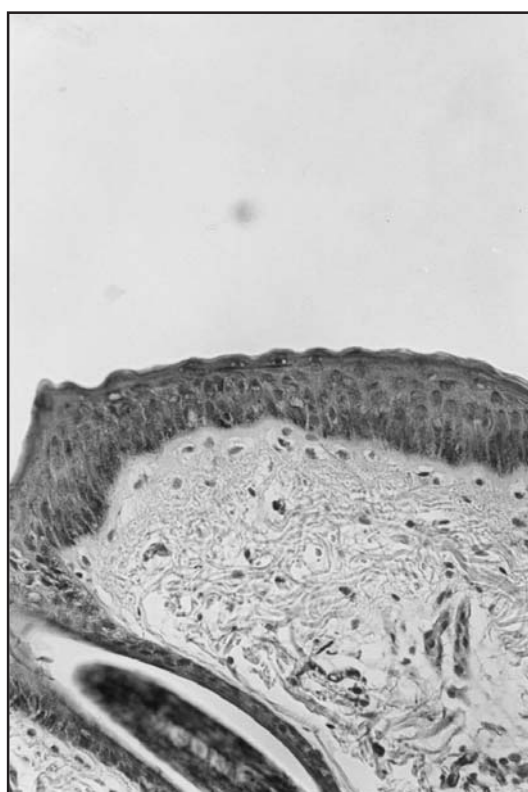


Figura 1. Corte de piel bovina normal. HE. 40X. La estructura de la epidermis y la dermis no está alterada.

En los cortes obtenidos a partir de las muestras provenientes de los ensayos 1y 3, tratados con enzima pancreática, coloreados con H-E, fue posible observar a nivel del estrato basal, células epiteliales con signos de lisis y disgregadas. En la dermis las fibras colágenas se colorearon en forma homogénea con eosina (Figura 2). En los ensayos 2 y 4, tratados con ambas enzimas, desapareció la epidermis, por lo que solo se pudo observar la dermis con fibras colágenas desorganizadas y disgregadas (Figura 3).

En los cuatro grupos tratados con enzimas, las fibras colágenas se observaron de color rosado.

Discusión

Las propiedades de la barrera epidérmica en bovinos, ovinos y caprinos, son menos conocidas que en humano, roedores y cerdos¹². El mayor grosor de la epidermis hace que sea difícil extrapolar en grandes animales, los datos provenientes de ensayos realizados en otras especies.

Nuestros resultados parecen demostrar, a través de la observación de los cambios en el colágeno, que las enzimas proteolíticas pudieron atravesar la epidermis y alcanzar la dermis.

Dentro de las sustancias utilizadas en el pretratamiento, el sulfito de sodio, mediante la reacción de sulfitólisis, actúa desestabilizando la queratina al interferir en los puentes disulfuro entre cisteínas de cadenas adyacentes¹⁹, de esta manera, podría desempeñar un papel importante alterando la estructura de los queratinocitos.

El surfactante SDS, sal sódica del ácido dodecilsulfúrico, podría ser el responsable de emulsificar y dispersar los lípidos en el espacio intercelular del estrato corneo, facilitando la penetración enzimática. A su vez, esta sustancia es capaz de combinarse con proteínas fibrosas y globulares^{10,3}, de este modo, puede alterar las hélices de queratina por interactuar con sus sitios de unión y aumentar así la absorción en la epidermis. Sobre el colágeno, esta sustancia

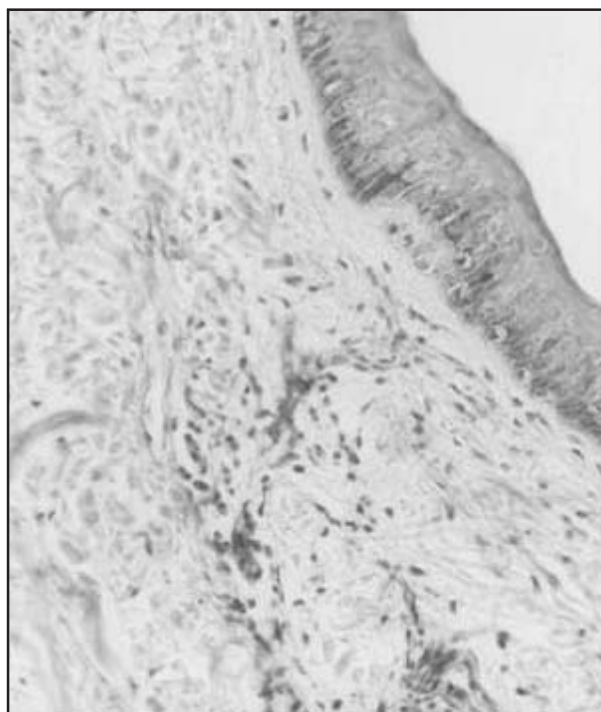


Figura 2. Corte de piel bovina pretratada con sulfito de sodio y dodecilsulfato de sodio y tratada con tripsina. HE. 40X. Se observan áreas de separación dermo-epidérmica.

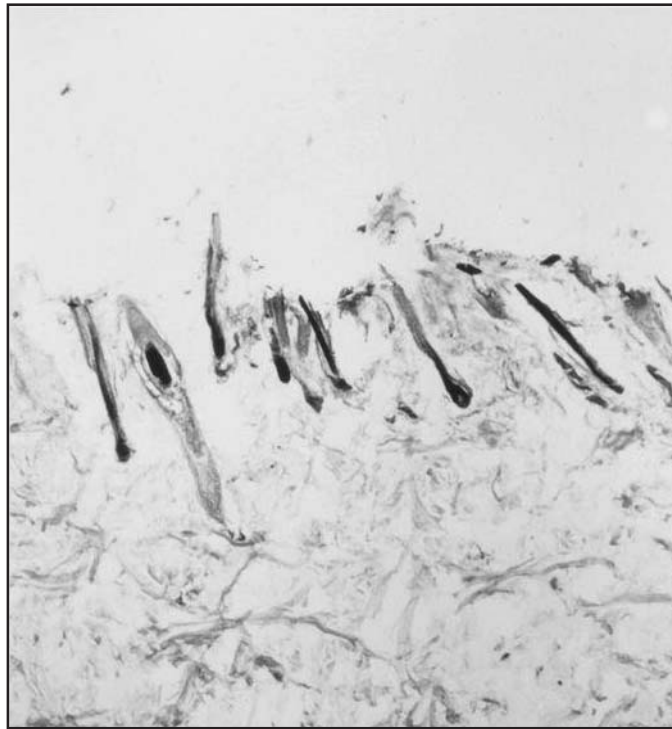


Figura 3. Corte de piel bovina pretratada con sulfito de sodio y dodecilsulfato de sodio y tratada con tripsina y proteasa bacteriana. HE. 40X. La epidermis se ha desprendido y no se observa en el corte.

se adsorbe por un mecanismo similar, aunque la estructura fibrilar de esta proteína, es un factor limitante para la combinación^{10,16}.

Por otro lado, la tripsina (presente en la proteasa comercial de origen pancreático) actúa a nivel de las uniones intercelulares de la epidermis y sobre la lámina basal hasta llegar al colágeno de la dermis modificándolo. En nuestro trabajo, dicha modificación pudo observarse inclusive mediante la microscopía óptica convencional. Nuestros resultados difieren de los encontrados en la piel humana en donde el tratamiento con tripsina produce separación de los estratos basal y suprabasal de la epidermis, pero no separa al estrato basal de la lámina basal como ocurre cuando la piel humana es tratada con otras proteasas como la termolisina bacteriana^{7, 22}. Las diferencias entre nuestros resultados y los hallados en la piel humana podrían deberse a las características específicas de la piel tanto respecto a su morfología como en su composición química.

En el presente estudio, la difusión de la enzima a través de la epidermis pudo originarse por la actividad del sulfito de sodio junto con el SDS sobre los queratinocitos.

Las enzimas proteolíticas, son potenciales generadoras de daño para el colágeno a pesar de su utilidad en el depilado^{9,11}. Por este motivo, es necesario continuar en la búsqueda de proteasas específicas que puedan remover el pelo sin dañar a las fibras¹⁷. En el presente estudio, demostramos que la tripsina puede alterar el colágeno en las concentraciones y los tiempos empleados, y que estos cambios pueden reconocerse con una técnica histológica sencilla. La incorporación de proteasa alcalina al tratamiento aumenta el daño sobre la epidermis, lo que se evidenció en los dos grupos en los que se agregó esta enzima al tratamiento. Por otra parte pudimos comprobar que el volumen de líquido utilizado en el pretratamiento y tratamiento no modifica los resultados observables con microscopía óptica

ya que tanto cuando se realizó el tratamiento únicamente con enzima pancreática como cuando se agregó proteasa alcalina, los resultados fueron los mismos en el grupo sumergido en 200 ml, como en aquel que se encontraba en un volumen de 5000 ml.

Conclusiones

Nuestros resultados apoyan la hipótesis según la cual la epidermis bovina puede ser vulnerada utilizando agentes tensioactivos y sulfito de sodio como pretratamiento con la aplicación posterior de tripsina. Ensayos posteriores podrán determinar concentraciones y tiempos de uso de las enzimas que no alteren la calidad del colágeno.

Como puede apreciarse, el estudio histológico es una herramienta de importancia para evaluar el efecto de diferentes sustancias empleadas en la industria del cuero.

Bibliografía

1. Brady, D.; Duncan, J.R. A model for proteolytic depilation of skins. *J. Amer. Leather Chem. Ass.* 1990; 85: 334- 43.
2. Bowstra, J.A.; Honeywell-Nguyen, P. L.; Gooris, G.S. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Prog. in Lipid Res.* 2003; 42:1-36.
3. Bronaugh, R.L.; Maibach, H.I. Optimizing Percutaneous Absorption. In *Percutaneous Absorption- Mechanisms- Methodology- Drug Delivery*. 2nd Edition. *Revised and Expanded*. Marcel Dekker INC. New York and Basel, 1989: 537
4. Cantera, C.S.; Garro, M.L.; Goya, L.; Barbeito, C. y Galarza, B. Hair saving unhairing process. Part 6 Stratum corneum as a diffusion barrier. Chemical-mechanical injury of epidermis *J. Soc. Leather Technol. Chem.* 2004; 88, 3: 121-31
5. Cantera, C. S. Hair Saving unhairing process. Part 4 Remarks on the Evolution of the Investigations on Enzyme Unhairing. *J. Soc. Leather Technol. Chem* 2000; 85:121-31.
6. Cecil, R.; Wake, R.G. The reaction of the disulphide groups of insulin with sodium sulphite. *Biochem. J.* 1960; 76:146-55.
7. Einbinder, J.; Walzer, R.; Mandl, I. Epidermal-dermal separation with proteolytic enzymes. *J. Invest. Dermatol.* 1966; 5: 492-504
8. Fendrup, W.; Buljan, J. Hair Save- Unhairing Methods in Leather Processing. *United Nations Industrial Development Organization*. 2000.UNIDO.
9. Grosskreutz, J.C. The fibrillar structure of collagen from enzyme and lyme-unhaired hides. *J. Amer Leather Chem. Ass.* 1964; 59: 126-35
10. Gustavson K.H., *The chemistry of tanning Processes*, Academic Press INC. New York, USA, 1956: 108
11. Heidemann E. *Collagen Chemistry, Fundamentals of Leather Manufacture*, Eduard Roether KG, Darmstadt, 1993:139
12. Magnusson, B.M.; Walters, K.A.; Roberts, M.S. Veterinary drug delivery: potencial for skin penetration enhancement. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 50: 205-27
13. Masson, P.J. Trichrome staining and their preliminary techniques. *J Tech. Met. Armed Forces Institute of Pathology*. AFIP, Washington DC, USA, 1929: 12- 75
14. Nashy, E.H.A.; Ismail, S.A. Enzymatic Bacterial dehairing of bovine hide by *Bacillus licheniformis*. *J. Soc. Leather Technol. Chem.* 2005; 89: 242-49.
15. Panchagnula, R. Transdermal Delivery of Drugs. *Ind. J. Pharmacol.* 1997; 29:154-56
16. Pankhurst, K.G. The action of large ions on collagen and gelatin. *J. Soc. Leather Trades Chem.* 1953; 37: 312-20.
17. Paul, R.G.; Mohamed, I. The use of neutral protease in enzymatic unhairing. *J. Amer. Leather Chem. Ass.* 2001; 96:180-85
18. Percot, A.; Lafleur, M. Direct observation of Domains in Model Stratum Corneum Lipid Mixtures by Raman Microspectroscopy. *Biophys. J.* 2001; 81:2144-153
19. Ruffin, P.; Andrieu, S.; Biserte, G. Sulphytolysis in keratinolysis. *Biochemical proof, Sabouraudia*, 1976; 14: 181-84.
20. Skerrow, C. The experimental production of high-level intraepidermal splits. *British J. Dermatol.* 1980; 102: 75-83.

21. Skrabs, R. *Das Leder*. 1976; 27: 153.

22. Walzer, C.; Benathan, M.; Frenk E. Thermolysin Treatment: A New method for Dermo-epidermal Separation. *The Soc. For Inv. Derm.* 1989; 78-81.

23 Williams, A.C.; Barry, B. Penetration enhancers. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2004; 56 603-18

24 Zugno, L. The effect of trypsin on soaking of salt cured hides. *J. Amer. Leather Chem. Ass.* 1992; 87: 207-20