



INFORME PERIODO 2012-2013.

1. APELLIDO: Garro
NOMBRES: María Laura
TÍTULO: Doctora en Ciencias Veterinarias
Dirección Electrónica. marialgarro@hotmail.com

2. OTROS DATOS

INGRESO: Categoría: Profesional Asistente.....Mes.....enero.....año.....2000.....

ACTUAL: Categoría: Profesional Adjunto.....Mes.....agosto.....año.....2008.....

3. PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN LOS CUALES COLABORA

- a) Depilado libre de sulfuro de sodio .Empleo de preparados enzimáticos como agentes depilantes.....
- b) Valorización de residuos sólidos de curtiembre: Biotransformación Fúngica del residuo pelo vacuno.

4. DIRECTOR

Apellido y Nombre: Dr Hours Roque.

Cargo Institución: Vicedirector CENT.DE INV EN FERMENTACIONES INDUSTRIALES- CINDEFI- CONICET- UNLP...Investigador Independiente CONICET.....

Dirección: Calle..... Calle 50 Y 115 - Fac. Cs. Exactas UNLP
C. P...1900.....Prov. BSAS.....

Dirección Electrónica: hours@biotec.gob.ar.....

5. LUGAR DE TRABAJO

Centro de Investigación en Tecnología del Cuero-CITEC.

Dependencia: INTI-CIC

Calle: Campus Tecnológico CIC. camino Centenario y 505, MB GONNET. 1897. Prov Buenos Aires

Teléfono: 0221-4841876.

6. INSTITUCIÓN DONDE DESARROLLA TAREAS DOCENTES U OTRAS

Nombre.....

Dependencia.....

Dirección:

Calle.....N°.....

7. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO (Debe exponerse la actividad desarrollada, técnicas empleadas, métodos, etc. en dos carillas como máximo, en letra arial 12, a simple espacio)

8. OTRAS ACTIVIDADES

8.1 PUBLICACIONES, COMUNICACIONES, ETC. Debe hacerse referencia, exclusivamente, a aquellas publicaciones en las cuales se ha hecho explícita mención de la calidad de personal de apoyo de la CIC. Toda publicación donde no figure dicha aclaración no debe ser adjuntada. Indicar el nombre de los autores de cada trabajo en el mismo orden en que aparecen en la publicación, informe o memoria técnica, año y, si corresponde, volumen y página, asignándole a cada uno un número.

8.2 CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. Indicar la denominación del curso, carga horaria, institución que lo dictó y fecha, o motivos del viaje, fecha, duración, instituciones visitadas y actividades realizadas.

8.3 ASISTENCIA A REUNIONES CIENTIFICAS/TECNOLOGICAS o EVENTOS SIMILARES. Indicar la denominación del evento, lugar y fecha de realización, tipo de participación que le cupo y título(s) del(los) trabajo(s) o comunicación(es) presentada(s).

- XVIII Congreso de la Federación Latinoamericana de Técnicos y Químicos de la Industria del Cuero. 9-10 y 11 de octubre de 2012. Montevideo, Uruguay.
Galarza B, Garro L, Gortari C, Bonfranceschi A, Hours R, Cantera C.
Enzimas fúngicas: determinación de parámetros de crecimiento en cultivos sumergidos.
- XXXII. Congress of International Union of Leather Technologists and Chemists Societies- IULTCS. May 29th-31th 2013. Istanbul, Turkey.
Galarza B., Garro ML, Gortari C, Bonfranceschi A, Hours R, Cantera C.
From a problem of solid waste to a useful product in the beamhouse process.
- Trabajo enviado para su evaluación:

VIII Encuentro para Latino América y el Caribe de Biotecnología REDBIO, Biotecnología y Sociedad: diálogos para un desarrollo sostenible”
18-22 de noviembre 2013. Mar del Plata, Argentina.
Galarza B, Garro M, Hours R.
Producción de un pool enzimático con utilidad en tecnología del cuero a partir de un residuo sólido de curtiembre.

9. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO.

10. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TÍTULOS ANTERIORES. (En este punto se indicará todo lo que se considere de interés para una mejor evaluación de la tarea cumplida en el período).

- Asistencia técnica de Natalia Scelsio, Licenciada en Biología Facultad de Ciencias Naturales y Museo UNLP, incorporada en junio de 2012 como Personal de Apoyo al laboratorio de microscopía del CITEC para participar en los Proyectos de cadena de valor de conejo, cabra y ñandú y en el Plan de trabajo” Evaluación histológica de la estructura colágena de la piel durante la elaboración de cuero de distintas especies”
- Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP: Defensa oral del trabajo de tesis doctoral, dirigido por el Doctor Claudio Barbeito, 17 de diciembre de 2012.
Título: Depilado enzimático conservador del pelo: Injurias química y mecánica de la epidermis para incrementar los procesos difusivos. Calificación 10 (diez) sobresaliente
(Se adjunta acta).

7. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO (Debe exponerse la actividad desarrollada, técnicas empleadas, métodos, etc. en dos carillas como máximo, en letra arial 12, a simple espacio)

ÍNDICE

Actividad desarrollada.....	p.5
Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).....	p.5
Técnicas histológicas.....	p.6
Inclusión en parafina.....	p.6
Coloración hematoxilina eosina.....	p.7
Coloración tricrómica de Masson	p.8
Referencias	p.10

Actividad desarrollada

En el transcurso de este periodo se estudió sobre piel de bovino el protocolo de trabajo que utiliza extracto enzimático a partir de cultivo sólido de *Trichophyton ajelloi* durante la etapa de ribera en el proceso del curtido para evitar el uso de sulfuro de sodio en el depilado (Galarza 2013)

La etapa de ribera incluye un conjunto de operaciones mecánicas y químicas destinadas a eliminar de la piel los componentes innecesarios para la producción de cuero. Este tramo comprende las fases de remojo, depilado y purga. Al mismo tiempo, esta piel tratada con enzimas se comparó con pieles sin tratar y con pieles a las que se les aplicó el proceso convencional de depilado a base de sulfuro de sodio.

En este trabajo fueron empleadas distintas técnicas para poner en evidencia 'las huellas' dejadas sobre la epidermis y dermis de la piel de bovinos durante la aplicación de las enzimas (Garro 2008). La acción prolongada de las enzimas sobre el colágeno de la dermis perjudica su integridad dando lugar a efectos no deseados como pérdida de elasticidad. Es importante controlar la actividad enzimática y evitar que se extienda al colágeno desmereciendo la calidad del cuero final.

a. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

En el caso de muestras de piel es necesario trazar un protocolo de deshidratación y fijación con la intención de encontrar el tratamiento que permita su observación con microscopía electrónica de barrido (MEB) ya que en la bibliografía consultada no se describe el modo de preparar estas muestras para su observación. La MEB es una técnica que se utiliza en los trabajos de tecnología del cuero.

Se realizó una prueba de deshidratación de pieles frescas de bovino sin tratamiento, conservadas a 5°C. Las muestras se cubrieron con acetona 4% durante 15 h. A continuación, el reactivo se reemplazó por acetona 100%, 24 h. Al finalizar esta secuencia se colocó el material en desecador hasta que no desprendió olor.

Como parte del acondicionamiento de material, se determinó el punto crítico de la muestra para evitar la deformación del tejido. Punto crítico es un procedimiento por el cual se extrae con dióxido de carbono el agua que no pudo ser eliminada en la deshidratación de las muestras que serán observadas con MEB (Sarmiento 2012).

Trozos de piel de 1 cm de lado se analizaron con el microscopio electrónico de barrido (Jeol 6360 LV) del Museo de Ciencias Naturales de La Plata.

Al finalizar esta prueba, la piel presentaba aspecto de haber sido deshidratada en exceso (figura 1). Por este motivo se decidió intentar la observación del material sin fijar ni deshidratar. Piel conservada a -15°C se expuso a temperatura ambiente y se analizó con el microscopio electrónico de barrido del Laboratorio de Investigaciones de Metalurgia Física (LIMF) de la Facultad de Ingeniería, UNLP. Este microscopio se utilizó en modo ambiental, modo que permite analizar material que necesita mantener una humedad relativa en la cámara del microscopio, sin alto vacío, para evitar la deformación de la muestra. Con esta técnica fue posible obtener una imagen que permitió observar las células de la cutícula y médula del pelo (figura 2).

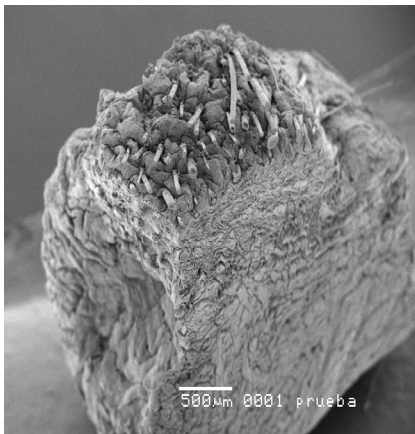


Figura 1. Piel deshidratada en acetona. 500 X

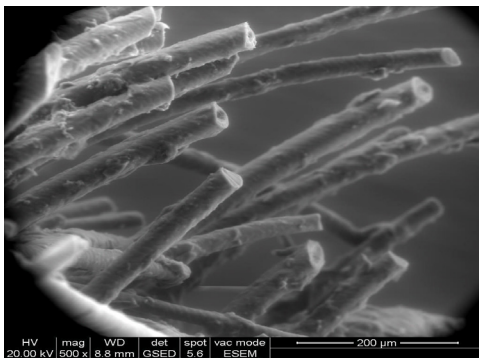


Figura 2. Piel sin deshidratar, se observan las células de la cutícula y la médula del pelo. 500 X

b. Técnicas histológicas

- 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 h en las condiciones descritas.

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 µm 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 (Prophet 1992).

- 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 utilizó la coloración tricrómica de Masson.

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.

La coloración hematoxilina eosina es la más utilizada en la práctica histológica. La hematoxilina es un colorante básico selectivo (tiñe estructuras ácidas que son basófilas como el núcleo y las regiones del citoplasma con abundante ARN). En histología, para obtener suficiente contraste de color en los cortes, se acostumbra a colorear con un colorante ácido y uno básico. Acidofilia proviene de la capacidad de colorear con colorantes ácidos, basofilia con colorantes básicos. En la nomenclatura histoquímica un colorante ácido es una sal en que el anión está teñido (aniónico) y a su vez es capaz de formar una unión salina (unión electrostática) con un grupo tisular de carga positiva. Por el contrario, un colorante básico (catiónico) es capaz de formar una unión salina con un grupo tisular de carga negativa.

La hematoxilina es un colorante de origen natural, se extrae de la madera central del palo de Campeche, originario de Méjico. Originalmente se lo utilizaba para oscurecer telas. La hematoxilina no es un colorante por si mismo, sino que debe formar un compuesto oxidado: la hemateína. En la solución de Mayer la oxidación se realiza con iodato de sodio. La oxidación química permite que se pueda utilizar inmediatamente luego de su preparación.

La eosina es un colorante artificial ácido, colorea estructuras básicas como los componentes básicos de las proteínas citoplasmáticas que, por lo tanto, son acidófilas. Químicamente son xantenos (Cátedra de Histología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. 2012)

Coloración tricrómica de Masson

La coloración se desarrolló de la manera siguiente:

- Hidratación en agua destilada.
- Coloración con hematoxilina de Mayer 3 min.
- Viraje en agua corriente.
- Coloración con ponceau de xilidina+ fucsina ácida (solución de Masson) - 5 min.
- Dos lavados con agua corriente y uno con agua destilada.
- Aplicación de ácido fosfomolibdico 1% en solución acuosa - 1 min.
- Aplicación de verde luz durante 1 min.

Con esta técnica fue posible distinguir el citoplasma de las células epiteliales de color rosado y las fibras de colágeno verde. El término "coloración tricrómica" se utiliza en técnicas empleadas en la demostración selectiva de diferentes tejidos. En base a la acidez de las soluciones colorantes utilizadas para diferenciar el tejido conectivo, se tiñen distintas estructuras celulares. Se desconoce el fundamento químico de la unión de los colorantes y los componentes titulares debido a que estos métodos no son específicos desde el punto de vista histoquímico (Bancroft 2008, Geneser 2000).

En los cortes de las muestras control sin tratamiento, 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 los que se utilizó la técnica tricrómica (Figuras 3a-4a).

En muestras tratadas 48 h con enzima y tensioactivo se observó desorganización del colágeno, pérdida de estratos a nivel epidermis y separación dermis epidermis. En los folículos pilosos se perdieron las vainas epiteliales (Figuras 3b-4b).



Figura 3.

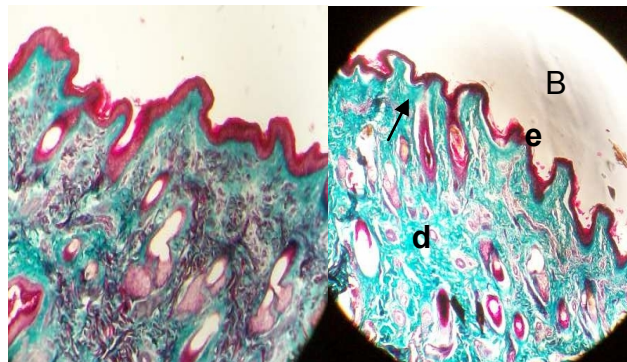


Figura 4

Referencias

- Bancroft JD. Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone - Elsevier Health Sciences, 2008 (146-150 p.).
- Galarza B, Garro ML. From a problem of solid waste to a useful product in beamhouse process. XXXXII Congress of IULTCS Istanbul, Turkey. May 2013.
- Garro ML et al. Evaluación histológica del efecto de enzimas con actividad depilatoria sobre piel vacuna: Un estudio preliminar. InVet (Investigación Veterinaria) 2008:10(103-110 p.).
- Geneser F. Histología 3a. ED. Editorial Panamericana, 2000 (42-48 p.).
- Guía de Técnicas Histológicas de Rutina. Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, 2012.
- Patricia Sarmiento Servicio de Microscopia Electrónica de Barrido del Museo de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de La Plata, 2012.
- 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.