

ASOCIACIÓN ENTRE LA REACTIVIDAD TINTORIAL POR GRAM CON SÍNTESIS DE ADN Y ARN EN *Staphylococcus* spp.

E. M. Flores Fernández*, L. S. Albarado Ysasis

Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, CP 6101, Venezuela; Tlf.: +58(293)4162068;

*Corresponding autor e-mail: eve_linff@yahoo.com

Recibido: Junio 2013. Aprobado: Agosto 2014.

Publicado: Noviembre 2014.

RESUMEN

El género *Staphylococcus* está integrado por cocos grampositivos, sin embargo, pueden ser gramvariables, una explicación precisa a esta doble reactividad no se ha establecido. El presente estudio plantea como hipótesis, que en la reacción de Gram, los componentes bacterianos coloreados con cristal violeta-iodo son los ácidos nucleicos, por lo que, el objetivo fue evaluar la asociación entre las características tintoriales por Gram con síntesis de ADN y ARN en *Staphylococcus* spp. Se hizo el estudio del ciclo celular por microscopía óptica, a partir de cultivos sincronizados, elaborándose extendidos a intervalos de 5 min por 2 h, se colorearon con Gram y DAPI pre y post-tratamiento con ADNasa y ARNasa; se aplicó la prueba de McNemar, para asociar la reactividad tintorial por Gram, pre y post-tratamiento enzimático, y la prueba de Pearson para asociar la reactividad tintorial por Gram y DAPI con un nivel de confianza del 95%. Durante el ciclo celular, se observaron cocos grampositivos aislados, en pares y racimos. Post-tratamiento con ADNasa, los cocos cambiaron de color morado a rosado en un alto porcentaje de los tiempos del ciclo celular. Post-tratamiento con ARNasa, los cocos permanecieron como grampositivos, cambiaron a gramnegativos o presentaron la doble tinción, encontrándose asociación estadísticamente significativa ($p=0,0001$) entre el color morado de las células grampositivas con síntesis de ADN y ARN. Asimismo, hubo asociación estadísticamente significativa ($p=0,0000$) entre la tinción morada del Gram y DAPI positivo. Estos resultados demuestran que los ácidos nucleicos, participan en el carácter grampositivo del género *Staphylococcus*.

Palabras clave: Gram, ADN, ARN, grampositivo, *Staphylococcus*.

ASSOCIATION BETWEEN THE REACTIVITY GRAM STAINING WITH SYNTHESIS OF DNA AND RNA IN *Staphylococcus* spp.

ABSTRACT

Staphylococcus comprises Gram-positive cocci, however, may be seen as Gram-variable, a precise explanation for this dual reactivity has not been established. The present study hypothesized that in the Gram reaction, bacterial components stained with crystal violet-iodine are nucleic acids, the objective was to evaluate the association between Gram staining characteristics with DNA and RNA synthesis in *Staphylococcus* spp. It was the study of the cell cycle by light microscopy from cultures synchronized were developed extended every 5 min for 2 h, they were stained with Gram and DAPI pre and post-treatment with DNase and RNase, the test was applied McNemar, to associate Gram dye reactivity, pre and post-treatment enzyme, and the Pearson test for reactivity associated Gram and DAPI dye with a confidence level of 95%. During the cell cycle were observed isolated Gram-positive cocci in pairs and clusters. Post-treatment with DNase, the cocci changed in purple to pink in a high percentage of cell cycle times. Post-treatment with RNase, remained as Gram-positive cocci, Gram-negative or double staining showed, we found statistically significant association ($p=0.0001$) between the color purple Gram-positive cells with DNA and RNA synthesis. There were also statistically significant association ($p=0.0000$) between the purple of Gram staining and DAPI positive. These results demonstrate that the nucleic acids involved in the Gram-positive character of the *Staphylococcus* genus.

Keywords: Gram, ADN, ARN, Gram-positive, *Staphylococcus*.

INTRODUCCIÓN

La coloración de Gram, tiene su importancia, en la taxonomía bacteriana y diagnóstico clínico, y fue desarrollada por Hans Christian Gram en 1884. Esta coloración es una técnica de tinción diferencial de pasos secuenciales, que emplea un complejo colorante formado

por cristal violeta-yodo, decoloración con alcohol/acetona y un colorante de contraste, la safranina, que separa las bacterias en dos grupos: grampositivos, se tiñen de morado, y gramnegativos, se colorean de rosado [1-4]. Se ha observado otra forma de tinción llamada

gramvariable, donde la bacteria toma la doble coloración [5,6].

El mecanismo íntimo de la reacción de Gram, hasta hoy en día se desconoce; se han propuesto muchas teorías para explicar el mecanismo de la reacción de coloración de Gram, entre éstas se encuentran las suposiciones que asumen un mecanismo químico entre los componentes de la coloración de Gram y un sustrato específico de bacterias grampositivas, y la que propone la existencia de una diferencia de permeabilidad entre bacterias grampositivas y gramnegativas, basada en la estructura y composición de la pared celular. Evidencias apoyan la segunda de estas teorías, como lo prueba el hecho de que las bacterias grampositivas, pierden esta propiedad cuando se elimina toda su pared o parte de ella. Se piensa que cuando la bacteria se tiñe con el complejo colorante, éste queda atrapado en las bacterias grampositivas y no puede ser arrastrado por el decolorante a causa de la naturaleza química de su pared. Por el contrario, en las bacterias gramnegativas es arrastrado debido a su alto contenido de lípidos [7,8].

Las bacterias del género *Staphylococcus* son células esféricas grampositivas, aproximadamente, de 1 µm de diámetro, que pueden verse también como gramvariables, no obstante, una explicación precisa de esta reactividad no se ha establecido. El presente estudio plantea como hipótesis de la reacción de Gram, que los componentes bacterianos coloreados con cristal violeta-iodo son los ácidos nucleicos, por lo que, el objetivo fue evaluar la asociación entre las características tintoriales obtenidas por la coloración de Gram con el contenido de ADN y ARN en *Staphylococcus* spp, mediante la degradación enzimática del ADN y ARN bacteriano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó el estudio del ciclo celular a seis cepas de *Staphylococcus* spp., correspondiendo una a *S. aureus* ATCC 25923, tres a *S. epidermidis* y dos a *S.*

saprophyticus. El estudio del ciclo celular se realizó a intervalos de 5 min por 2 h, evaluándose un total de 150 tiempos dentro del ciclo celular de especies del género *Staphylococcus*: 25 tiempos correspondieron a *S. aureus* ATCC 25923, 75 a *S. epidermidis* y 50 a *S. saprophyticus*. Para establecer la asociación entre la reacción a la tinción de Gram con síntesis de ADN y ARN, los extendidos se trataron con las enzimas ADNasa y ARNasa, comparándose las características tintoriales por Gram antes y después del tratamiento enzimático, así como también, se estableció asociación entre la reactividad tintorial por Gram y DAPI.

Estudio del ciclo celular de las cepas de *Staphylococcus* spp. Previo al estudio del ciclo celular se realizaron cultivos en fase exponencial y sincronizados:

Cultivos en fase exponencial. Durante la fase exponencial los microorganismos se dividen y su número se duplica a intervalos regulares, lo que hace que la población sea muy uniforme en cuanto a sus propiedades físicas y fisiológicas [9]. Para lograr que las células de un cultivo alcanzaran la fase de crecimiento óptimo para desarrollar los experimentos, se inoculó una colonia del agar manitol salado en 2 mL de caldo triptosa fosfato (CTF), incubando a 37 °C entre 16-18 h.

Cultivos sincronizados. Para obtener información sobre el tipo de crecimiento de las distintas bacterias, debe recurrirse a los cultivos sincrónicos, es decir, a cultivos compuestos por células en donde todas se encuentran en la misma etapa del ciclo celular. Las mediciones llevadas a cabo en tales cultivos equivalen a las realizadas en las mismas células. El método excelente de selección para obtener cultivos sincrónicos es la técnica de Helmstetter-Cummings (HC), basado en el hecho de que algunas bacterias se adhieren fuertemente a las membranas de filtros de nitrato de celulosa [10]. En el presente trabajo, se colocaron 5 gotas del cultivo bacteriano en

crecimiento exponencial sobre una membrana de filtro de nitrato de celulosa con poros de 0,2 μm y diámetro de 47 mm; la membrana se colocó dentro de una placa de Petri estéril, se incubó a 37 °C por 1 h o hasta que el líquido fue absorbido. Inmediatamente, se procedió a lavar suavemente con 5 mL de cultivo fresco de CTF empleando pipeta Pasteur estéril, con el fin de separar aquellas células ligadas a la membrana débilmente, las cuales corresponden a las células recién formadas y que se encuentran en la misma etapa del ciclo celular, conservando la sincronía por 2 h, aproximadamente. El lavado se recogió en tubos secos estériles y correspondieron a los cultivos sincrónicos que se emplearon para realizar el estudio microscópico del ciclo celular.

Estudio microscópico del ciclo celular de *Staphylococcus* spp. Los cultivos sincrónicos una vez obtenidos, se incubaron inmediatamente a 37 °C, tomando alícuotas de 1 μL del cultivo en el tiempo 0 y a intervalos de tiempo de 5 min por 2 h, colocándose en portaobjetos nuevos para la elaboración de los extendidos, éstos se fijaron por calor y se colorearon por Gram y DAPI.

Coloración de Gram. El procedimiento de coloración de Gram consistió en colorear por 1 min con cristal violeta, lavar con agua de grifo, colorear por 1 min con lugol, lavar con agua de grifo y decolorar con alcohol/acetona (1:1) hasta sacar el color violeta, y contrastar con safranina por 30 s [11].

Coloración de 4',6-diamidino-2'-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI). El colorante DAPI (Thermo Scientific, USA) emite fluorescencia azul cuando se une a la doble cadena de ADN. Este colorante se une, selectivamente, al surco menor de las regiones adenina-timina del ADN, donde su fluorescencia es 20 veces mayor que en el estado no unido. El procedimiento

consistió en preparar una solución stock DAPI, diluyendo 1 mg del colorante en 1 mL de agua bidestilada. A partir de ésta se preparó la solución de trabajo en una proporción de 1:1000 en buffer fosfato salino (PBS) pH 7,2 \pm 0,2, diluyendo 10 μL de la solución stock en 9,90 mL del buffer PBS. Se cubrieron los extendidos con la solución de trabajo de DAPI por 2 min en oscuridad y se lavaron con la solución PBS, se utilizó como líquido de montaje glicerol fosfato, para luego observarse con microscopio de fluorescencia.

Identificación microscópica. Las láminas se observaron con magnificación de 1000x, empleando un microscopio de epifluorescencia Olympus BX 60. Para la coloración DAPI se usó un filtro de excitación ultravioleta de banda amplia de 330-385 nm, espejo dicromático de 400 nm y un filtro de barrera de 420 nm. Las fotomicrografías se tomaron con una cámara digital marca Motic modelo Moticam Cooled 3000.

Digestión enzimática de ADN y ARN. La enzima ADNasa RQ1 libre de ARNasa (Promega, USA), degrada cadenas simples y dobles de ADN, produciendo oligonucleótidos 3'-OH. La enzima se diluyó en una proporción 1:1 con el tampón de reacción 10X (400 mmol.L^{-1} de Tris-HCl [pH 8,0 a 25 °C], 100 mmol.L^{-1} de MgSO_4 , 10 mmol.L^{-1} de CaCl_2). Se colocó 1 μL de la enzima ADNasa diluida sobre los extendidos del ciclo celular para la digestión de ADN, dejándose reaccionar por 48 h a 37 °C en cámara húmeda. La enzima ARNasa ONE ribonucleasa (Promega, USA), cataliza la degradación del ARN a nucleótidos de monofosfatos cíclicos. Para la degradación de ARN, se colocó sobre los extendidos del ciclo celular, 1 μL de la enzima ARNasa ONE ribonucleasa (Promega, USA), con una dilución previa de 1:10 con el tampón de reacción 10X (100 mmol.L^{-1} de Tris-HCl [pH 7,5 a 25 °C], 50 mmol.L^{-1} de EDTA, 2 mol.L^{-1} de acetato de sodio) por 48 h a 37 °C en cámara húmeda.

Análisis estadístico. Se construyeron tablas de 2 x 2, para expresar las frecuencias observadas. Asimismo, se aplicó la prueba de McNemar [12] para así asociar la reactividad tintorial por el método de coloración de Gram con el contenido de ADN y ARN, antes y después del tratamiento enzimático con ADNasa y ARNasa en las cepas de *Staphylococcus* spp. Por otro lado, se aplicó la prueba de Pearson para establecer asociación entre la reactividad tintorial por Gram y DAPI.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Asociación entre la reactividad tintorial del método de coloración de Gram con la síntesis de ADN y ARN, antes y después de la acción enzimática de ADNasa y ARNasa en el ciclo celular de *S. aureus* ATCC 25923

Antes del tratamiento enzimático, mediante el estudio microscópico empleando coloración de Gram, se observaron cocos aislados, en pares y racimos grampositivos, en el ciclo celular (Fig. 1A). Sólo, en el tiempo 20 min, además, aparecieron cocos donde una célula del par fue grampositivo y la otra gramnegativo.

Post-tratamiento con ADNasa, en el ciclo celular, en el 100% (25/25) de los tiempos, las células fueron rosado muy claro y casi imperceptibles (Fig. 1B). Post-tratamiento ARNasa, en el 100% (25/25) de los tiempos del ciclo celular, la gran mayoría de los cocos cambiaron a gramnegativo y se observaron escasos grampositivos (Fig. 1C), hallándose asociación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el color morado y la síntesis de ADN y ARN (Tabla 1).



Fig. 1. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Coloración de Gram. 1000x. A) Pre-tratamiento. B) Post-tratamiento ADNasa. C) Post-tratamiento ARNasa.

Tabla 1. Frecuencia de tiempos con cocos grampositivos, antes y después del tratamiento enzimático con ADNasa y ARNasa en el ciclo celular de *S. aureus* ATCC 25923.

Grampositivo		Grampositivo					
		ADNasa			ARNasa		
		Después			Después		
Antes		Sí	No	Total	Sí	No	Total
Sí	n	0	25	25	0	25	25
	%	0	100	100	0	100	100
No	n	0	0	0	0	0	0
	%	0	0	0	0	0	0
Total	n	0	25	25	0	25	25
	%	0	100	100	0	100	100
				Z= 4,80; p= 0,0001		Z= 4,80; p= 0,0001	

n: número de tiempos a intervalo de 5 min; %: porcentaje; Z: valor Z del estadístico de McNemar; p: valor probabilístico

Asociación entre la reactividad tintorial del método de coloración de Gram con síntesis de ADN y ARN, antes y después de la acción enzimática de ADNasa y ARNasa en el ciclo celular de *S. epidermidis*

En el ciclo celular, se observaron cocos aislados, en pares y pequeños racimos grampositivos (Fig 2A), sin embargo, en los tiempos 15 min, 45-60 min y 75-80 min, además, se observaron cocos con doble tinción y gramnegativos (Fig. 2B).

Post-tratamiento ADNasa (Fig. 2CD) y ARNasa (Fig. 2E y 2F), en el 71% (53/75) y 32% (24/75) de los tiempos, respectivamente, hubo cambio, el citoplasma de las células pasó a un color rosado; existiendo asociación estadísticamente significativa ($p < 0,05$), entre el color morado observado en los cocos grampositivos y síntesis de ADN y ARN (Tabla 2).

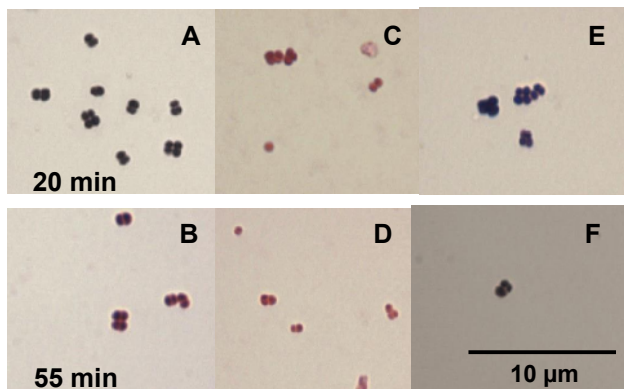


Fig. 2. *Staphylococcus epidermidis*, ciclo celular, 20 min (A,C,E) y 55 min (B,D,F) pre y post-tratamiento enzimático. Gram. 1000x. A-B) Antes del tratamiento enzimáticos se observaron cocos grampositivos y gramvariables. C-D) Post-tratamiento ADNasa cambiaron a gramnegativos. E-F) Post-tratamiento ARNasa, en la gran mayoría de los tiempos del ciclo celular fueron grampositivos.

Tabla 2. Frecuencia de tiempos del ciclo celular de *S. epidermidis*, que contienen cocos grampositivos teñidos por el método de Gram, antes y después del tratamiento enzimático con ADNasa y ARNasa.

Grampositivo		Grampositivo					
		ADNasa			ARNasa		
		Después			Después		
Antes	Sí	No	Total	Sí	No	Total	
Sí	n	22	53	75	51	24	75
	%	29	71	100	68	32	100
No	n	0	0	0	0	0	0
	%	0	0	0	0,00	0,0	0
Total	n	22	53	75	51	24	75
	%	29	71	100	68	32	100
				Z= 7,14; p= 0,0001		Z= 4,79; p= 0,0001	

n: número de tiempos a intervalo de 5 min; %: porcentaje; Z: valor Z del estadístico de McNemar; p: valor probabilístico

Asociación entre la reactividad tintorial del método de coloración de Gram con síntesis de ADN y ARN, antes y después de la acción enzimática de ADNasa y ARNasa en el ciclo celular de *S. saprophyticus*

Durante el ciclo celular por Gram, se observaron cocos grampositivos aislados, en pares y racimos; desde el tiempo 0 min hasta los 20 min, también, se visualizaron cocos con doble tinción (Fig. 3A y 3B). Post-tratamiento ADNasa, en el 52% (26/50) de los tiempos, el citoplasma de las células pasó a un color rosado (Fig. 3C y 3D);

existiendo asociación estadísticamente significativa ($p < 0,05$), entre el color morado observado en los cocos grampositivos y síntesis de ADN. Después del tratamiento con ARNasa, en el 58% (29/50) de los tiempos, hubo cambio, los cocos se observaron como gramnegativos o gramvariables (Fig. 3E y 3F), hallándose asociación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el color violeta dado por el colorante Gram y síntesis de ARN (Tabla 3).

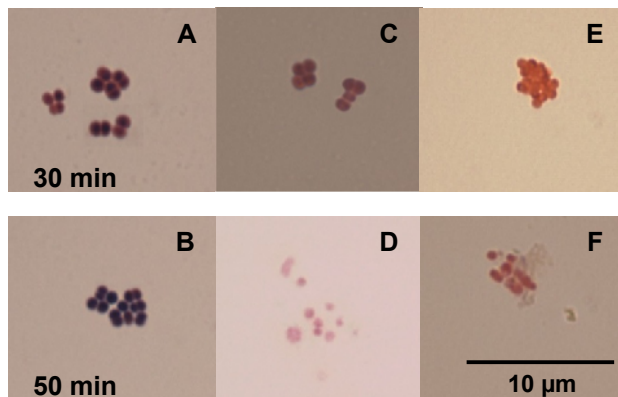


Fig. 3. *Staphylococcus saprophyticus*, ciclo celular 30 min (A,C,E) y 50 min (B,D,F) pre y post-tratamiento enzimático. Gram. 1000x. A-B) Durante el ciclo celular se observaron cocos grampositivos y gramvariables. C-D) Post-tratamiento ADNasa, los cocos se colorearon como gramnegativos. E-F) Post-tratamiento ARNasa, los cocos cambiaron a gramnegativos.

Tabla 3. Frecuencia de tiempos del ciclo celular de *S. saprophyticus*, que contienen cocos grampositivos, teñidos por Gram, antes y después del tratamiento enzimático con ADNasa y ARNasa.

Grampositivo		Grampositivo					
		ADNasa			ARNasa		
		Después			Después		
Antes	Sí	No	Total	Sí	No	Total	
Sí	n	24	26	50	21	29	50
	%	48	52	100	38	58	100
No	n	0	0	0	0	0	0
	%	0	0	0	0	0,00	0
Total	n	24	26	50	21	29	50
	%	48	52	100	42	58	100
				Z= 4,90; p= 0,0001		Z= 5,19; p= 0,0001	

n: número de tiempos a intervalo de 5 min; %: porcentaje; Z: valor Z del estadístico de McNemar; p: valor probabilístico

A partir de diversas investigaciones derivaron tres teorías que explican el mecanismo de coloración del método de

Gram, éstas atribuyen la reacción grampositiva a la existencia de una capa externa, llamada ectoplasma, presente sólo en grampositivos; a la permeabilidad de la pared y membrana celular, y al punto isoeléctrico del protoplasma celular y su afinidad por el colorante básico que se utiliza [13], no obstante, el mecanismo íntimo de la reacción de Gram, hasta hoy en día se desconoce.

El presente estudio plantea como hipótesis que en la coloración de Gram, la reacción grampositiva se debe a que los componentes bacterianos coloreados con el complejo cristal violeta-iodo son los ácidos nucleicos, explicándose sobre los principios químicos de coloración. Dado a la similitud entre las propiedades moleculares del ADN y ARN de células eucariotas y procariotas, la hipótesis planteada de la reacción de la tinción de Gram es soportada por los estudios citoquímicos sobre el uso de los colorantes sintéticos para la tinción de los cromosomas de células eucariotas, realizados por Dut [14], quien siguió el procedimiento de colorante-yodo; en este estudio se demuestra que los componentes de los cromosomas, coloreados con cristal violeta-iodo son los ácidos nucleicos y que estas sustancias deben permanecer altamente polimerizadas y no deben estar ni siquiera en un estado semidegradado. La eliminación del ADN y ARN ocasiona que los cromosomas no se colorean con el cristal violeta-yodo.

Mediante las bases químicas de tinción de los colorantes básicos, se puede explicar la reacción grampositiva en *Staphylococcus* spp.; la reacción de Gram, se puede dar por un mecanismo químico de atracción de cargas opuestas. Los colorantes empleados en esta tinción: cristal violeta y safranina, son moléculas cargadas positivamente, que se van a combinar con los constituyentes celulares cargados negativamente, como los ácidos nucleicos.

Los colorantes básicos están formados por la asociación de un cromógeno (radical químico llamado cromóforo,

responsable de la aparición del color, unido a un anillo aromático derivado del benceno) de carácter débilmente ácido, con grupos auxocromos catiónicos (potencia el color) fuertemente básico, que son los responsables de la carga positiva global del colorante. El cristal violeta es un colorante básico, cuyo cromóforo es un radical imino ($>C=N$) y el grupo auxocromo es un amino ($-NH_2$), que tiene afinidad con los grupos fosfatos libres presentes en los ácidos nucleicos [15], bajo este principio, se sugiere que la reacción grampositiva observada en *Staphylococcus* spp., sea por la interacción entre el complejo cristal violeta-iodo y los ácidos nucleicos: ADN y ARN.

Hasta el momento, la hipótesis mayormente apoyada de la coloración de Gram es la basada en la estructura y composición de la pared celular. Se cree que cuando la bacteria se tiñe con el complejo colorante cristal violeta-iodo, éste queda atrapado en las bacterias grampositivas y no puede ser arrastrado por el decolorante alcohol/acetona, a causa de la naturaleza química de la pared [8]. Por lo contrario, la hipótesis expuesta en la presente investigación sobre la reacción grampositiva, propone bajo el principio químico de coloración la atracción de cargas opuestas, en la cual ocurre una interacción entre el complejo y los ácidos nucleicos, impidiéndose la remoción del colorante por el alcohol/acetona, quedando la bacteria de color morado.

Los resultados obtenidos en la presente investigación, demuestran que el carácter grampositivo presentado por las células de *Staphylococcus* se pierde, una vez que ocurre la degradación del ADN y ARN por las enzimas ADNasa y ARNasa, respectivamente, durante el proceso de síntesis de los ácidos nucleicos en el ciclo celular bacteriano. De este modo, se comprueba que la reacción grampositiva en este género bacteriano se debe a la interacción entre el colorante cristal violeta-iodo y los ácidos nucleicos: ADN y ARN.

Dentro de las investigaciones del pasado, el trabajo de Bartholomew y Umbreit [13] se asemeja a la presente investigación, en el planteamiento de atribuir al ARN como uno de los componentes celulares responsables de la reacción grampositiva; observaron que el carácter grampositivo de los géneros *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Listeria* y *Clostridium* era removido una vez que fueron tratados con la enzima ribonucleasa y señalaron que en vista del carácter específico de la acción de la ribonucleasa, no había duda de que el ARN es el factor importante en el carácter grampositivo de estos organismos. Otros investigadores como Avery y Cullen [16], observaron que el filtrado de células autolisadas de neumococos, tenía una enzima que eliminaba el carácter grampositivo de ellos, y que tenía la misma acción sobre *Streptococcus* del grupo viridans. Sin embargo, se informó que esta preparación era inactiva frente a *Staphylococcus aureus* y los estreptococos hemolíticos. Hoy en día, se conoce que *Streptococcus pneumoniae* produce una nucleasa no específica, llamada endonucleasa A (EndA), la cual es utilizada por la bacteria como un mecanismo de evasión para los neutrófilos del hospedero al digerir la estructura de andamio del ADN de los neutrófilos [17]. Es posible, que esta enzima haya sido la responsable de la conversión de las bacterias grampositivas a gramnegativas. Por otra parte, Dubos y Thompson [18], así como Dubos y MacLeod [19], obtuvieron nucleasas de tejidos de varios animales, que eran capaces de cambiar a los neumococos de grampositivos en cocos gramnegativos.

Morfología del nucleoide en el ciclo celular de *Staphylococcus* spp.

El genoma bacteriano está contenido en una estructura celular llamada nucleoide [20], que ocupa, predominantemente, una posición central en la célula y es de forma, frecuentemente irregular, que además de contener el ADN genómico, contiene ARN y proteínas

[21-23]. El nucleoide fue visto por primera vez usando microscopía de luz y coloraciones específicas para ADN, como Feulgen y Giemsa; los avances en la comprensión de la morfología del nucleoide bacteriano vinieron con el uso del microscopio electrónico, sin embargo, las investigaciones en esta área, prácticamente, han sido llevadas a cabo en *E. coli* [24]. En las especies de *Staphylococcus*, a través del estudio microscópico del ciclo celular, se pudo observar que el nucleoide bacteriano se distinguió ocupando total o parcialmente el citoplasma celular, asimismo, se observaron de forma redonda en número de 1 a 8 y diámetro promedio de $0,38 \pm 11 \mu\text{m}$ (Fig. 4), también, en forma de filamento (Fig. 5) o irregular. La observación de más de un nucleoide en la célula coccal es el reflejo de la rapidez del proceso de síntesis de ADN.

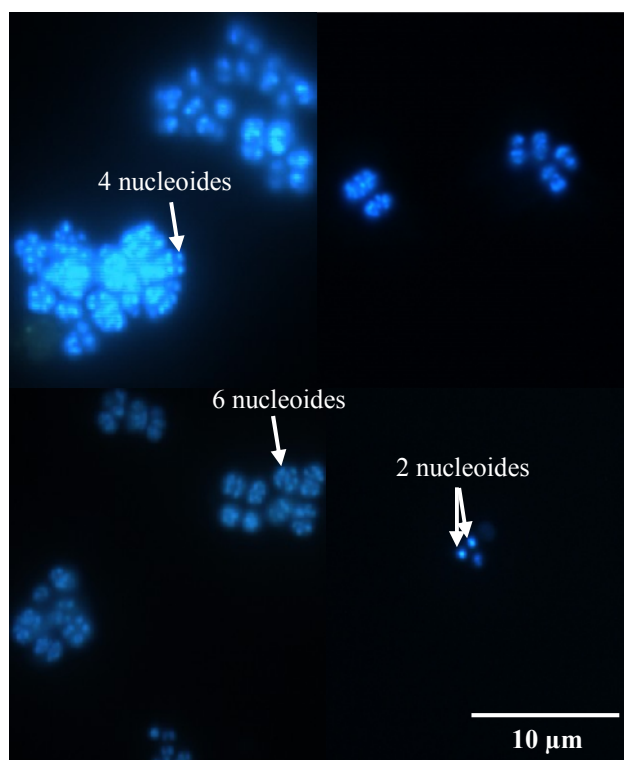


Fig. 4. Morfología del nucleoide en el ciclo celular de *Staphylococcus* spp. DAPI. 1000x. El nucleoide (flechas) se observa como estructuras pequeñas redondas compactas azul fluorescente, en número de 1-8.

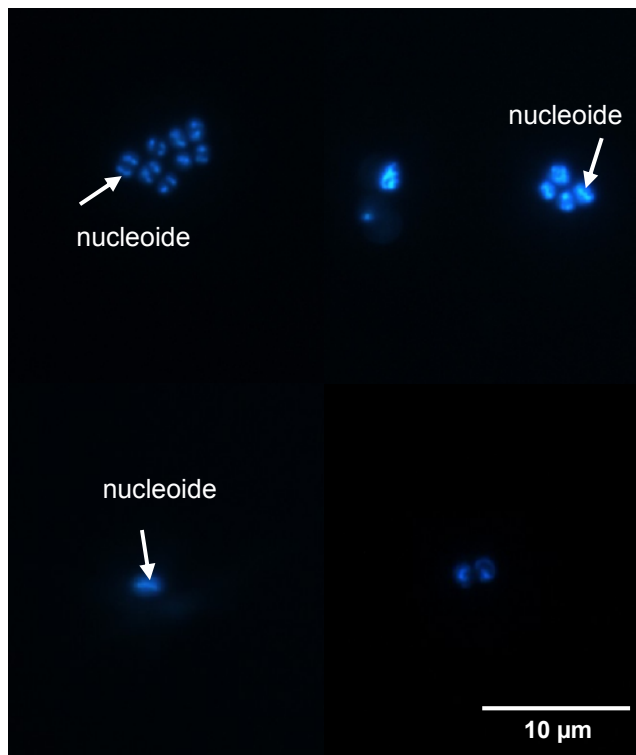


Fig. 5. Morfología del nucleoide en el ciclo celular de *Staphylococcus* spp. DAPI. 1000x. El nucleoide se distingue como un filamento azul fluorescente (flechas).

Está claro que el conocimiento de la organización espacial del genoma bacteriano y su relación con las funciones celulares es limitado. En la década de los setenta se describió la estructura por microscopía electrónica del nucleoide, el cual está formado por bucles superenrollados que se extienden desde el centro. Se conoce que la estructura del nucleoide bacteriano es dinámica y es afectada por condiciones de crecimiento y estrés, sugiriéndose una relación entre transcripción y organización del nucleoide [25,26]. Se ha descrito que en *E. coli* el nucleoide tiene una estructura compleja que emerge de la suma de los procesos celulares que ocurren dentro de la célula bacteriana [25]. Hasta ahora no se encuentran registros sobre la estructura del nucleoide en *Staphylococcus* spp.

Asociación entre la reactividad tintorial del método de coloración de Gram con la reacción de DAPI en *Staphylococcus* spp.

En la presente investigación, además, se asoció el carácter grampositivo de las bacterias, con la reacción DAPI positiva. Por la tinción de DAPI, se observaron, durante el ciclo celular de *Staphylococcus* spp., células cocales teñidas completa o parcialmente de azul y la fluorescencia fue ligera o intensa. Al comparar los tiempos del ciclo celular que contenían cocos grampositivos con la reacción de DAPI, se obtuvo que el 71% (80/112) de los tiempos, presentaron cocos con tinción morada y por DAPI, la fluorescencia emitida fue intensa (Fig. 6), mientras que en el 76% (29/38) de los tiempos que presentaban cocos gramnegativos o con doble tinción, la fluorescencia por DAPI fue, principalmente, ligera (Fig. 7), existiendo asociación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre la tinción morada y la intensidad de fluorescencia de la reacción de DAPI (Tabla 4).

Por otro lado, al comparar las características morfotintoriales vistas por Gram con las observadas por DAPI, se apreció similitud en la forma y distribución del material azul fluorescente teñido por DAPI con el material morado teñido por Gram. Cuando la bacteria grampositiva se observa completamente morada, por DAPI la fluorescencia es intensa y el material genético se aprecia ocupando toda la célula (Fig. 6). Mientras que, cuando los cocos toman la doble reacción por Gram, grampositivo/gramnegativo, el material morado se ubica en la parte central o excéntrica, correspondiendo, posiblemente, al nucleoide, y alrededor de éste, se aprecia el citoplasma coloreado de rosado; por DAPI, el nucleoide se aprecia con la misma forma y distribución con una ligera fluorescencia (Fig. 7).

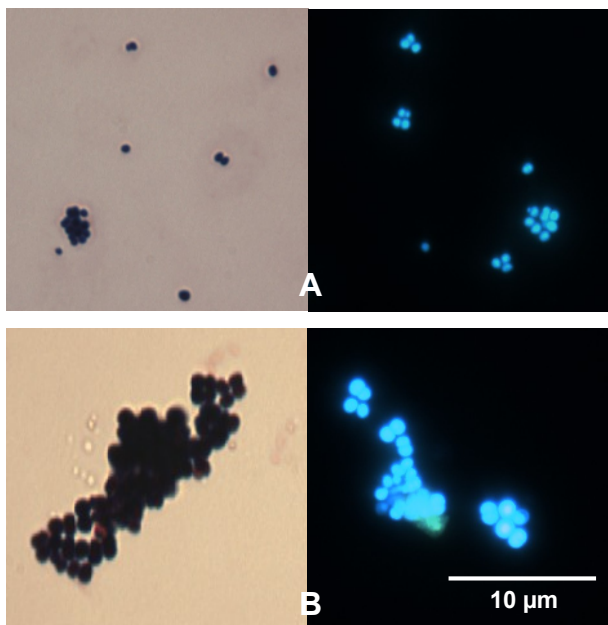


Fig. 6. DAPI. 1000x. A) *S. aureus* ATCC 2592, 40 min. B) *S. saprophyticus*, 115 min. Izquierda: Gram, cocos grampositivos puros. Derecha: DAPI, el colorante cubre completamente a la célula y la fluorescencia es intensa.

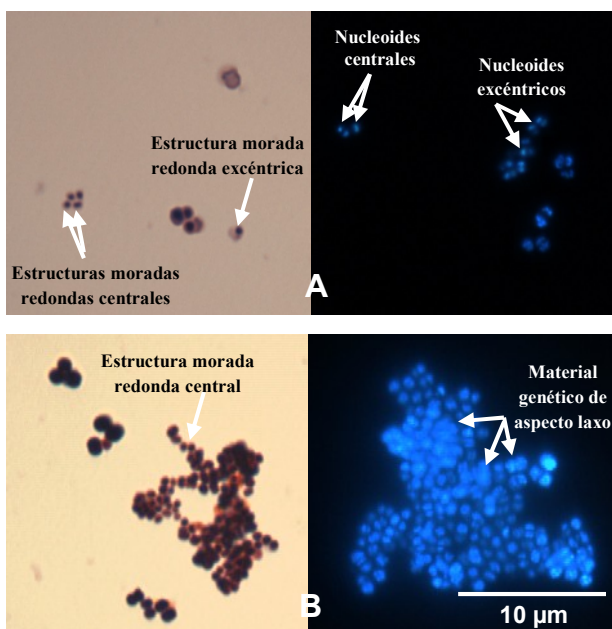


Fig. 7. Comparación de Gram y DAPI. 1000x. A) *S. epidermidis*, 20 min. B) *S. saprophyticus*, 10 min. Izquierda: Gram, cocos con doble tinción, estructuras moradas redondas (flechas) correspondiéndose con nucleoides (A-B). Derecha: DAPI, nucleoides (flechas) redondos en posición central o excéntricos (A). Material genético de aspecto laxo (flechas) con ligera fluorescencia azul ocupando la célula parcial o totalmente.

Tabla 4. Frecuencia de tiempos del ciclo celular de *Staphylococcus* spp., con cocos grampositivos puros o no y reactividad tintorial con DAPI.

Gram	DAPI			Total	
	Positivo	Negativo			
Grampositivo puro	Intenso	Ligero			
Sí	n	80	28	4	112
	%	71	25	4	75
No	n	8	29	1	38
	%	21	76	4	25
Total	n	88	57	5	150
	%	59	38	3	100

$r=-0,4221$; $p=0,0000$

Estos resultados revelan que, el color morado presentado por las bacterias en la coloración de Gram, está dado por el contenido de ADN bacteriano.

CONCLUSIONES

Estos resultados demuestran que los ácidos nucleicos, ADN y ARN, son elementos que participan en la reacción grampositiva en cocos del género *Staphylococcus*.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente, por el aporte financiero del proyecto CI-2-040102-1677/10.

REFERENCIAS

- [1] Beveridge T.J. (2001) "Use of the gram stain in microbiology" *Biotech. Histochem.* 76(3):111-118.
- [2] Yamanaka K. (2002) "Reviews for Gram stain" *Rinsho. Byori.* 50(5):449-454.
- [3] Coico R. (2005) "Gram staining" *Curr. Protoc. Microbiol.* Appendix 3:Appendix 3C.
- [4] Moyes R.B., Reynolds J., Breakwell D.P. (2009) "Differential staining of bacteria: Gram stain" *Curr. Protoc. Microbiol.* Appendix 3:Appendix 3C.
- [5] Nagata K., Mino H., Yoshida S. (2010) "Usefulness and limit of Gram staining smear examination" *Rinsho. Byori.* 58(5):490-497.

- [6] Tsukatani T., Suenaga H., Higuchi T., Shiga M., Noguchi K., Matsumoto K. (2011) "Distinction of Gram-positive and -negative bacteria using a colorimetric microbial viability assay based on the reduction of water-soluble tetrazolium salts with a selection medium" *J. Gen. Appl. Microbiol.* 57(6):331-339.
- [7] Freeman B.A. (1986) "Microbiología de Burrows" 22^a ed. Madrid, Emalsa, S.A., pp. 19-20.
- [8] Mazana J. (1992) "Bacteria and their dyes: Hans Christian Joachim Gram" *Immunología.* 4(11):34-44.
- [9] Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. (2004) "Microbiología". 5^a ed. Madrid, McGraw Hill-Interamericana de España, pp. 119-120.
- [10] Stainer R.Y., Ingraham J.L., Wheelis M.L., Painter P.R. (1992) "Microbiología". 2^a ed. Barcelona, Editorial Reverté S.A., pp. 203-304.
- [11] Koneman E., Allen S., Janda W., Schreckenberger P., Winn W. (1999) "Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas color". 5^a ed. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana, pp. 85.
- [12] Pértega S., Pita S. (2004) "Asociación de variables cualitativas: El test exacto de Fisher y el test de McNemar". *Metodología de la Investigación.* 1-7.
- [13] Bartholomew, J.W., Umbreit, W.W. (1944) "Ribonucleic acid and the Gram stain". *J. Bacteriol.* 48(5):567-578.
- [14] Dutt M.K. (1975) "Selective staining of animal chromosomes with synthetic dyes following iodine-dye-procedure" *Acta Histochem.* 53(2):211-216.
- [15] García R. (2001) "Manual de laboratorio clínico diagnóstico. Anatomía patológica". Santa Fe de Bogotá, McGraw-Hill Interamericana, pp. 124-128.
- [16] Avery, O.T., Cullen, G.E. (1923) "Studies on the enzymes of pneumococcus: IV. Bacteriolytic enzyme" *J. Exp. Med.* 38(2):199-206.
- [17] Moon A.F., Midon M., Meiss G., Pingoud A., London R.E., Pedersen L.C. (2011) "Structural insights into catalytic and substrate binding mechanisms of the strategic EndA nuclease from *Streptococcus pneumoniae*" *Nucl. Acids Res.* 39(7):2943-2953.
- [18] Dubos R.J., Thompson R.H.S. (1938) "The decomposition of yeast nucleic acid by a heat-resistant enzyme. *J. Biol. Chem.* 124:501-510.
- [19] Dubos, R.J., Macleod, C.M. (1937) "Effect of a heat-resistant enzyme upon the antigenicity of pneumococci" *Exp. Biol. Med.* 36:696-697.
- [20] Jin D.J., Cabrera J.E. (2006) "Coupling the distribution of RNA polymerase to global gene regulation and the dynamic structure of the bacterial nucleoid in *Escherichia coli*" *J. Struct. Biol.* 156(2):284-291.
- [21] Ryter A. (1968) "Association of the nucleus and the membrane of bacteria: a morphological study" *Bacteriol. Rev.* 32(1):39-54.
- [22] Gómez M.C., Camacho R. (1995) "The bacterial nucleoid" *Rev. Latinoam. Microbiol.* 37(3):281-290.
- [23] Kois A., Swiatek M., Zakrzewska J. (2007) "Structure of bacterial chromosome" *Postepy. Hig. Med. Dosw.* 61:534-540.
- [24] Toro E., Shapiro L. (2010) "Bacterial chromosome organization and segregation" *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.* 2(2):a000349.
- [25] Cagliero C., Grand R.S., Jones M.B., Jin D.J., O'Sullivan J.M. (2013) "Genome conformation capture reveals that the *Escherichia coli* chromosome is organized by replication and transcription" *Nucl. Acids Res.* doi: 10.1093/nar/gkt325.
- [26] Ma Q., Yin Y., Schell M.A., Zhang H., Li G., Xu Y. (2013) "Computational analyses of transcriptomic

data reveal the dynamic organization of the
Escherichia coli chromosome under different
conditions” *Nucl. Acids Res.*
doi:10.1093/nar/gkt261.