



GRAM Y NUCLEOIDE EN *NEISSERIA GONORRHOEAE*

Evelin Flores¹, Susanny Caraballo¹, Luzmila Albarado¹.

1. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre.

Correspondencia: Calle Bolívar, Edif. Enfermería, Dpto. Bioanálisis, 1er piso. Cumaná, Venezuela. 58 293-4166820.

Email: eve_linff@yahoo.com

RESUMEN

Han pasado más de cien años y el mecanismo íntimo de la reacción de Gram se desconoce; así pues, el objetivo fue evaluar la asociación entre las características morfotintoriales obtenidas por la coloración de Gram con síntesis de ADN y ARN en el ciclo celular de *Neisseria gonorrhoeae*. Se realizó el ciclo celular a *N. gonorrhoeae* con crecimiento exponencial en caldo BHI enriquecido con sangre, tomando alícuotas a intervalos de 5 min por 120 min y elaborando extendidos, que se colorearon con Gram y DAPI, pre y post-tratamiento con ADNasa y ARNasa; se aplicó la prueba de McNemar y Fischer, para

24

Recibido: 24/09/2013

Aceptado: 19/11/2013

asociar la reactividad tintorial por Gram antes y después del tratamiento enzimático y asociar la reactividad tintorial por Gram y DAPI. En el ciclo celular, morfotintorialmente, los mono y diplococos gramnegativos presentaron citoplasma intensamente rosado y un material morado de aspecto laxo o compacto. Al aplicar tratamiento enzimático, se apreciaron cambios en la reactividad de Gram, en el citoplasma y material morado, hallándose asociación estadística significativa ($p < 0,05$) entre la reactividad tintorial por Gram y la degradación de ADN y ARN, asimismo, hubo asociación entre la reacción positiva del colorante específico para ADN, DAPI, con el material morado de aspecto laxo o compacto de mono y diplococos teñidos por Gram. Se concluye, que en la tinción gramnegativa intensa y el carácter grampositivo de *N. gonorrhoeae*, participan el ADN y ARN, sugiriendo que el material grampositivo de aspecto laxo o compacto sea el nucleoide.

Palabras clave: Gram, nucleoide, *Neisseria gonorrhoeae*, ADN, ARN, DAPI.

GRAM AND NUCLEOID IN *NEISSERIA GONORRHOEAE*

ABSTRACT

It has been over one hundred years and the intimate mechanism of the Gram reaction is unknown, so we objective was to evaluate the association between the morphological and staining characteristics by Gram with DNA and RNA synthesis in the cell cycle of *Neisseria gonorrhoeae*. Cell cycle was made in *N. gonorrhoeae* with exponential growth

in BHI broth enriched with blood, taking aliquots at intervals of 5 min for 120 min and developed widespread for stained with Gram and DAPI, pre and post-treatment with DNase and RNase, we applied the McNemar test and Fischer, to associate Gram staining reactivity before and after enzyme treatment and associated staining reactivity between Gram and DAPI. In the cell cycle, mono and diplococci gram-negative showed cytoplasm intensely pink and violet material lax or compact appearance. By applying enzyme treatment, changes were noted in Gram reactivity in the cytoplasm and violet material, being statistically significant association ($p < 0.05$) between the reactive staining for Gram and degradation of DNA and RNA, also was association between the positive reaction of DNA-specific dye, DAPI, with the material violet aspect loose or compact stained by Gram. We conclude that the intense pink in Gram-negative and that the Gram-positive character of *N. gonorrhoeae* resides in the RNA and DNA, suggesting that the grampositive material of aspect lax or compact it is the nucleoid.

KEY WORDS: Gram, nucleoid, *Neisseria gonorrhoeae*, DNA, RNA, DAPI.

INTRODUCCIÓN

La coloración de Gram fue desarrollada por Hans Christian Gram en 1884, tiene su importancia, en la taxonomía

bacteriana y diagnóstico clínico. 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). Han pasado más de cien años y el mecanismo íntimo de la reacción de Gram 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 (5,6). El ciclo celular bacteriano es dividido, tradicionalmente, en tres estadios: el período comprendido entre la división (nacimiento celular) y la iniciación de la replicación del ADN cromosómico, conocido como período B; el período requerido para la replicación del ADN, conocido como período C; y el



tiempo entre la finalización de la replicación y terminación de la división, llamado período D. Durante la replicación el cromosoma bacteriano permanece en una estructura condensada, altamente ordenada que se conoce como nucleoide (7,8). Los modelos bacterianos, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, han proporcionado información sobre los procesos de replicación y división celular, sin embargo, poco se sabe acerca de la replicación de ADN en *N. gonorrhoeae* (9,10). El nucleoide fue visto por primera vez usando microscopía de luz y coloraciones específicas, para ADN, como Feulgen y Giemsa. Avances en la comprensión de la morfología del nucleoide bacteriano vinieron con el uso del microscopio electrónico y las investigaciones en esta área,

prácticamente, han sido llevadas a cabo en *E.coli* (11). El nucleoide ocupa, predominantemente, una posición central en la célula y es de forma, frecuentemente irregular. El nucleoide contiene el ADN genómico, ARN y proteínas (12-14). El estudio del nucleoide se realiza por técnicas genéticas y físicas, su observación al microscopio óptico se puede realizar empleando el método histoquímico de Feulgen, microscopía electrónica, también por microscopía de contraste de fase y microscopía de fluorescencia, aplicando fluorocromos para ácidos nucleicos como el bromuro de etidio, 4',6'-diamidina-2-fenilindol (DAPI), naranja de acridina, entre otros (15). *Neisseria gonorrhoeae* es un agente causal de infecciones de transmisión sexual y las afecciones provocadas por



este microorganismo, por lo común, están localizadas en las superficies mucosas del área de exposición inicial y pueden ser agudas, con una respuesta purulenta pronunciada o ser asintomática (16,17). *N. gonorrhoeae* es un diplococo intracelular gramnegativo cuyo tamaño oscila entre 0,6 a 1 μm de diámetro, siendo su tamaño promedio de, aproximadamente, 0,8 μm . Los cocos individuales tienen aspecto de riñón o de grano de café, mientras que, cuando se encuentran en pares son adyacentes con sus lados planos o cóncavos y se caracterizan por ser inmóviles, no esporulados y no encapsulados (18-20). La literatura denomina bacterias Gram variables, a aquellas que se colorean de violeta y rosado, sin embargo, una explicación precisa de esta doble

reactividad en las bacterias no se ha establecido. Recientes investigaciones, han observado en el ciclo celular bacteriano de cocos Gram positivos, variaciones en la tinción bacteriana por Gram, infiriendo que estas variaciones en la reactividad por Gram están asociadas al contenido de los ácidos nucleicos en el ciclo celular bacteriano (7). Variaciones en las características tintoriales por Gram de especies del género *Neisseria*, igualmente, han sido observadas, se han reportado diplococos grampositivos en un frotis de líquido cefalorraquídeo, diagnosticándose por cultivo como *Neisseria meningitidis* (21). En observaciones personales previas, se han obtenido aislamientos de *N. gonorrhoeae* procedentes del medio GC, con tinción grampositiva. De modo que, para aportar



una evidencia sobre el mecanismo de reacción de la coloración de Gram, se plantea la hipótesis de la reacción de coloración de Gram sobre los principios químicos de coloración. Dado a la similitud entre las propiedades moleculares del ADN y ARN de células eucariotas y procariontes, la reacción de coloración por Gram, puede ser soportada con los estudios citoquímicos de Dutt (22), presentados en una investigación sobre el uso de colorantes sintéticos para la tinción de los cromosomas de células eucariotas, que siguió el procedimiento de colorante-yodo, los cuales indican que los componentes de los cromosomas, coloreados con cristal violeta son los ácidos nucleicos y que estas sustancias deben estar altamente polimerizadas y no deben estar ni siquiera en un estado

semidegradado, la eliminación del ADN y ARN produce que los cromosomas no se colorean con el cristal violeta-yodo. Así pues, el objetivo fue evaluar la asociación entre las características tintoriales obtenidas por la coloración de Gram con síntesis de ADN y ARN en el ciclo celular de *N. gonorrhoeae*.

METODOLOGÍA

Muestreo e identificación de *N. gonorrhoeae*. Se evaluaron un total de 18 hombres con sospecha clínica de infección por *N. gonorrhoeae*, de la consulta de Infecciones de Transmisión Sexual (ITS-SIDA) del ambulatorio “Dr. Arquímedes Fuentes Serrano” en Cumaná, estado Sucre, durante el periodo febrero-mayo 2011. Esta investigación se realizó cumpliendo las normas del Código



de Ética para la Vida (23) y las normas para investigaciones con humanos de la Declaración de Helsinki (24) y fue aprobada por la Comisión de Trabajos de Grados y Ética de la institución. A cada paciente, se le tomaron dos hisopados de secreciones uretrales, uno para frotis y otro para cultivo, utilizándose como medio de transporte Amies con carbón activado (Difco, USA). Las muestras se trasladaron inmediatamente a los laboratorios de Histología y Microbiología General del Departamento de Bioanálisis de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, para el estudio microscópico y bacteriológico. En el estudio bacteriológico se cultivó la muestra en medio GC, se incubó en jarra con vela para crear un ambiente de microerofilia (3-5% CO₂) a 37°C por 24 a

72 h y la identificación de *N. gonorrhoeae*, se basó en el estudio de las características macroscópica y microscópica de las colonias, las pruebas de oxidasa, superoxol y utilización de hidratos de carbonos (19). Las coloraciones empleadas, tanto para la identificación microscópica como estudio del ciclo celular fueron 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 etílico-acetona (1:1) hasta sacar el color violeta y contrastar con safranina por 30 s (19).

Coloración de 4',6-diamidino-2'-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI). El colorante DAPI (Thermo Scientific,

USA) fluoresce de 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±0,1, 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.

Ciclo celular de *Neisseria gonorrhoeae*.

Una vez aisladas e identificadas las bacterias de las muestras evaluadas se les realizó un estudio del ciclo celular, previo a ello se realizaron cultivos en fase exponencial.

Cultivo 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 (20).

Para lograr que las células de un cultivo alcancen la fase de crecimiento óptimo para desarrollar los experimentos, se inoculó una colonia del cultivo primario (GC) de la estirpe a trabajar, en 3 mL de caldo infusión cerebro corazón (BHI) enriquecido con sangre al 5%,

incubándolo a 37°C en microaerofilia entre 16 y 18 h.

Ciclo celular. Las células pueden conservarse en fase exponencial transfiriéndolas repetidamente a un medio fresco de composición idéntica cuando están aún en crecimiento exponencial (25). De manera que, para mantener esta fase de crecimiento y tener una población bacteriana más sincrónica, se transfirieron 5 gotas del cultivo BHI enriquecido con 5% de sangre, en fase exponencial (16-18 h), a un caldo fresco del mismo medio de cultivo, incubándose por 1 h a 37°C. A partir de este cultivo, se realizó el ciclo celular, tomando alícuotas para realizar los extendidos desde el tiempo 0 min hasta los 120 min, a intervalos de 5 min.

Elaboración de extendidos. Se realizaron extendidos para las

coloraciones Gram y DAPI, para el pre y post tratamiento enzimático, en portaobjetos nuevos y estériles, se fijaron por calor, se colorearon y se observaron al microscopio. La coloración DAPI sólo se aplicó antes y después del tratamiento con ADNasa, con el fin de evidenciar la actividad enzimática.

Tratamiento con las enzimas ADNasa y ARNasa. 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 MgSO₄, 10 mmol·L⁻¹ de CaCl₂). 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.

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 fueron tomadas con una cámara digital marca Motic modelo Moticam Cooled 3000.

Análisis estadístico. Se construyeron tablas de 2 x 2, para expresar las frecuencias observadas. Asimismo, se aplicó la prueba de McNemar, para asociar la reactividad tintorial por el método de coloración de Gram antes y después del tratamiento con ADNasa y ARNasa en los aislamientos de *N. gonorrhoeae*. Por otro lado, se empleó la prueba de Fischer para establecer asociación entre la reactividad tintorial por los métodos de coloración Gram y DAPI, con un nivel de confianza del 95% (26).

RESULTADOS

Recibido: 24/09/2013

Aceptado: 19/11/2013

Características morfotintoriales por Gram de *Neisseria gonorrhoeae* en colonias y ciclo celular

En el cultivo primario del agar GC, se desarrollaron entre las 24-48 h, colonias redondas, pequeñas, traslúcidas, mucoides, convexas, elevadas y con diámetro entre $<0,5-1,0$ mm, oxidasa, superoxol positivo, con oxidación de glucosa, identificándose como *N. gonorrhoeae* en siete de los casos sospechosos de gonorrea investigados. Se evaluaron microscópicamente con la coloración de Gram 67 colonias procedentes de los cultivos primarios del medio GC, obteniéndose que en 66 colonias se observaron cocos aislados y diplococos gramnegativos y una sólo presentó diplococos grampositivos, también se logró observar en el interior de

las células un material morado de aspecto laxo o compacto, frecuentemente de forma redonda con diámetro promedio de $0,45\pm 0,12$ μm ; en las bacterias gramnegativas el material laxo adquiere una coloración morado claro y el material compacto una coloración morado oscuro (figura 1).

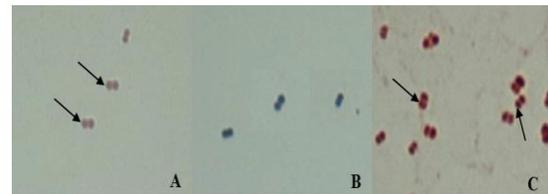


Figura 1. Fotomicrografías de extendidos de colonias del medio GC de *Neisseria gonorrhoeae*, coloreados por Gram. 1000x. A) Diplococos gramnegativos donde se visualiza un material difuso en su citoplasma coloreado ligeramente de morado (flechas). B) Diplococos grampositivos. C) Diplococos con un material redondo compacto morado oscuro en el citoplasma de la célula (flechas).

Del mismo modo, se obtuvo que en todos los tiempos del ciclo celular, morfológica y tintorialmente, se observaron mono y

diplococos gramnegativos, con citoplasma intensamente rosado y con un material morado de aspecto laxo o compacto, en su gran mayoría de forma redonda con diámetro promedio de $0,47\pm 0,11 \mu\text{m}$, asimismo, fue muy frecuente observar monococos con una zona periférica morada en forma de rueda (figura 2).

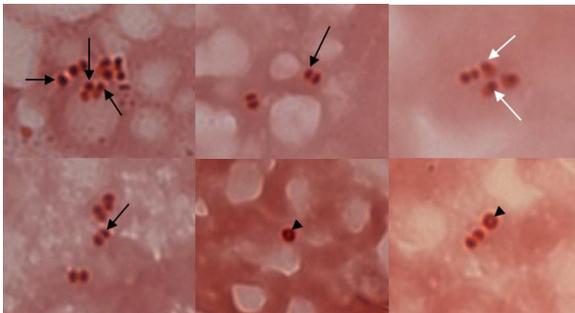


Figura 2. Fotomicrografías de extendidos del ciclo celular de *Neisseria gonorrhoeae*, por coloración de Gram. 1000x. Mono y diplococos gramnegativos. Las flechas negras indican la estructura morada compacta y las flechas blancas el material laxo en el interior de las células; las cabezas de flechas muestran

monococos con el material periférico morado, en forma de rueda.

Asociación entre la reactividad tintorial por la coloración de Gram con síntesis de ADN y ARN en el ciclo celular de *Neisseria gonorrhoeae*

Post-tratamiento ADNasa y ARNasa, el citoplasma de las células pasó a un color rosado claro. El material morado laxo o compacto después del tratamiento con ADNasa desapareció, no obstante, con ARNasa en algunos tiempos (19/175) el material morado no desapareció, obteniéndose asociación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el color rosado intenso y presencia del material morado con síntesis de ADN y ARN (tabla 1 y figura 3).

Tabla 1. Reactividad tintorial por Gram antes y después del tratamiento con ADNasa y ARNasa, en el ciclo celular de *N. gonorrhoeae*

Gram	ADNasa			Gram	ARNasa		
	Después				Después		
Antes	Rosado intenso	Rosado claro	Total	Antes	Rosado intenso	Rosado claro	Total
Rosado intenso	n 0	n 152	n 152	Rosado intenso	n 2	n 150	n 152
	% 0,00	% 86,86	% 86,86		% 1,14	% 85,71	% 86,86
Rosado claro	n 0	n 23	n 23	Rosado claro	n 0	n 23	n 23
	% 0,00	% 13,14	% 13,14		% 0,00	% 13,14	% 13,14
Total	n 0	n 175	n 175	Total	n 2	n 173	n 175
	% 0,00	% 100	% 100		% 1,14	% 98,86	% 100
Z= 12,25; p= 0,0001				Z= 12,18; p= 0,0001			

Gram: Material morado	ADNasa			Gram: Material morado	ARNasa		
	Después				Después		
Antes	Sí	No	Total	Antes	Sí	No	Total
Sí	n 1	n 161	n 162	Sí	n 19	n 143	n 162
	% 0,57	% 92,00	% 92,57		% 10,86	% 81,71	% 92,57
No	n 0	n 13	n 13	No	n 0	n 13	n 13
	% 0,00	% 7,43	% 7,43		% 0,00	% 7,43	% 7,43
Total	n 1	n 174	n 175	Total	n 19	n 156	n 175
	% 0,57	% 99,43	% 100		% 10,86	% 89,14	% 100
Z= 12,61; p= 0,0001				Z= 11,87; p= 0,0001			

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

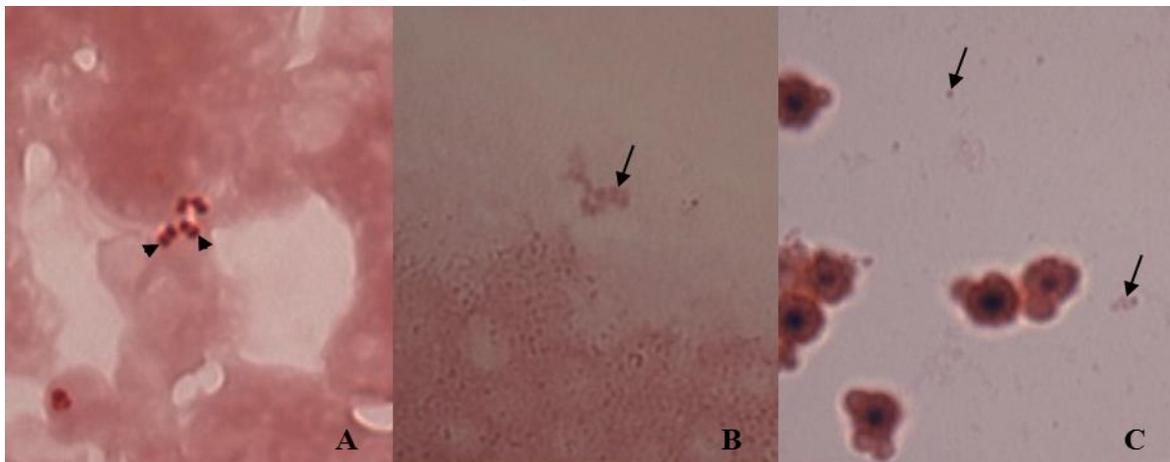


Figura 3. Fotomicrografías de extendidos del ciclo celular de *Neisseria gonorrhoeae*, teñidos por Gram, antes y después de tratamiento enzimático. 1000x. A) Antes del tratamiento enzimático, se distinguen diplococos gramnegativos, el rosado es intenso y se observan las estructuras compactas grampositivas (cabezas de flecha). B) Después del tratamiento enzimático con ADNasa, las células aclararon y desaparecen las estructuras redondas grampositivas (flecha). C) Luego del tratamiento enzimático con la enzima ARNasa, igualmente, las células aclararon y desaparecen las estructuras redondas grampositivas (flechas).

Características morfológicas del nucleóide por 4',6-diamidino-2'-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI) en el ciclo celular de *Neisseria gonorrhoeae*

En el ciclo celular de *N. gonorrhoeae*, en todos los tiempos, mediante la coloración de DAPI, se observó una constante síntesis de ADN; el material genético se observó, frecuentemente, con aspecto difuso o laxo, y se logró visualizar, escasamente, células completamente llenas de ADN y en otras, se apreciaron estructuras de forma redonda y compacta, ubicadas en el centro de la célula o excéntricamente, aproximadamente de $0,45 \pm 0,12 \mu\text{m}$ de diámetro, en número de

1 a 4 en monococos, no obstante, a partir de las colonias del medio GC con desarrollo entre las 32-48 h, se observaron mejor los nucleóides, los cuales se visualizaron como una estructura redonda de aspecto laxo o compacto, con un diámetro promedio de $0,44 \pm 0,11 \mu\text{m}$, ocupando parcial o totalmente el interior de la célula y en números de 1 a 4 en monococos y de 2 a 6 en diplococos (figura 4).

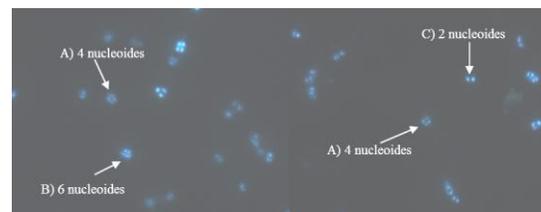


Figura 4. Fotomicrografías de extendidos de colonias de *Neisseria gonorrhoeae*, coloreados de DAPI.

con 4',6-diamidino-2'-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI). 1000x. A) Monococos con 4 nucleoides. B) Diplococo con 6 nucleoides. C) Diplococos con 2 nucleoides.

Asociación entre el color morado presentado por las estructuras compactas y laxas en el citoplasma de *Neisseria gonorrhoeae* por Gram con la reactividad tintorial por 4',6-diamidino-2'-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI) en el ciclo celular

Por la coloración de Gram en el ciclo celular de *N. gonorrhoeae*, se observaron mono y diplococos con una zona morada de aspecto laxo o compacto, en su gran mayoría de forma redonda con diámetro promedio de $0,47 \pm 0,11 \mu\text{m}$; muy frecuente fue la observación en monococos de un material morado distribuido periféricamente, que semeja una rueda. Al comparar

morfológicamente el material morado visto por Gram con el nucleóide coloreado por DAPI en monococos y diplococos, se distingue similitud en forma, tamaño y distribución (figura 5).

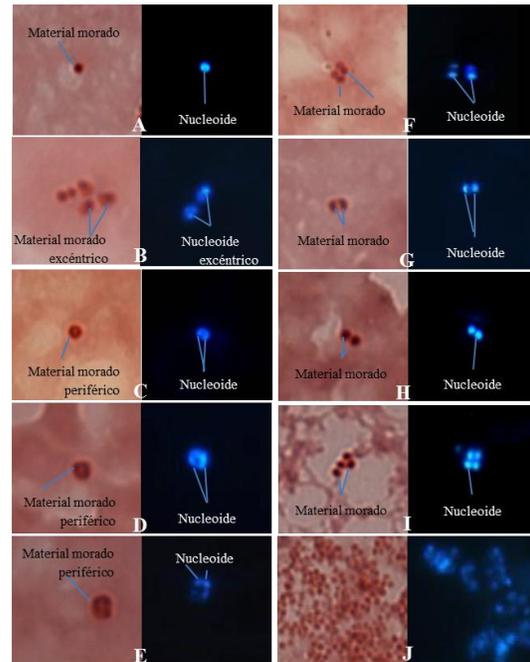


Figura 5. Fotomicrografías de mono y diplococos a partir del ciclo celular de *Neisseria gonorrhoeae*, coloreados con Gram y 4',6-diamidino-2'-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI). 1000x. A-E) Monococos. F-J) Diplococos. Nótese que el material morado en mono y diplococos coloreados por Gram, tiene similar forma, tamaño y distribución que el nucleóide coloreado de azul fluorescente con DAPI. La figura J, muestra la forma del nucleóide más

frecuente observada en el ciclo celular que fue de aspecto difuso.

El valor-p de la prueba de Fischer fue menor que 0,05, determinando que la presencia del material morado de aspecto

laxo o compacto, con forma redonda o distribución periférica en el citoplasma de cocos aislados y diplococos, teñidos por Gram, está asociado con la reacción positiva del colorante específico para ADN, DAPI (tabla 2).

Tabla 2. Frecuencia de tiempos del ciclo celular de *Neisseria gonorrhoeae*, que contienen mono y diplococos con zonas moradas o no en el citoplasma, teñidos por Gram, y reactividad tintorial con 4',6-diamidino-2'-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI).

Gram	Material morado	DAPI		Total
		Positivo	Negativo	
Sí	n	161	1	162
	%	92,00	0,57	92,57
No	n	1	12	13
	%	0,57	6,86	7,43
Total	n	162	13	175
	%	92,57	7,43	100
p = 0,0000				

n: número de tiempos del ciclo celular a intervalos de 5 min; %: porcentaje; p: valor probabilístico de la prueba exacta de Fisher

DISCUSIÓN

Han surgido muchas hipótesis para explicar la coloración de Gram, y la más

aceptada se basa, principalmente, en la composición de la pared celular. Otros investigadores atribuyen el carácter

grampositivo, a una reacción química entre el colorante y las proteínas de las bacterias; las proteínas y los aminoácidos son cuerpos que tienen la facultad de reaccionar con ácidos y bases, debido a los grupos aminos y carboxilo (6). Mediante las bases químicas de tinción de los colorantes básicos, se puede explicar la reacción grampositiva en *N. gonorrhoeae*. Los colorantes básicos están formados por la asociación de un cromógeno (es el 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 (27), bajo este principio se sugiere que la reacción grampositiva observada en los cocos procedentes de las colonias del medio GC, así como también, el material morado de aspecto laxo o compacto, sea por la interacción entre el complejo cristal violeta-iodo y los ácidos nucleicos, ADN y ARN, tal como lo reportado en células eucariotas (22). Por otra parte, la observación de estructuras de tinción grampositiva de aspecto laxo y compacto, sugiere que correspondan al nucleóide, y el aspecto laxo y compacto pueda estar asociado a diferentes modos de empaquetamiento del nucleóide, necesario para la actividad de

replicación y transcripción del genoma. En los nucleoides existen proteínas tipo histonas, tales como HU e IHF. Las proteínas HU, son como las histonas del ADN en eucariotas, que forman homo o heterodímeros o heterooctámeros y juegan un rol crítico en la construcción del nucleoide, mediante la formación de estructuras tipo nucleosomas (28). Kim *et al.* (29), empleando microscopía de fluorescencia y de fuerza atómica, está última proporciona imágenes moleculares a la escala de nano, evaluaron la estructura de compactación del nucleoide en células de *Escherichia coli* sometidas a una lisis suave con detergentes y, observaron la existencia de finas fibras con espesor entre 30-40 nm y fibras de estructura granulosa entre 70-80 nm de grosor, sugiriendo que son las unidades

estructurales fundamentales del nucleoide, además, en base a sus observaciones dedujeron un modelo de empaquetamiento del nucleoide, en donde las fibras de 40 nm forman las fibras de 80 nm por plegamiento helicoidal y la fibra de 80 nm forma el bucle, así pues, sugieren que la fibra de 40 nm podría ser una estructura equivalente a la fibra de 30 nm en el cromosoma eucariótico y, probablemente, está compuesta de proteínas similares a histonas y otras proteínas relacionadas con el nucleoide; ellos supusieron que la fibra de 40 nm podría ser la unidad estructural funcionalmente activa (transcripcionalmente activa), porque aparecieron con frecuencias en células de crecimiento rápido (fase logarítmica) y la fibra de 80 nm podría estar relacionada



con inactivación transcripcional. Por otra parte, observaron que el modo de empaquetamiento de los nucleoides cambiaba durante el crecimiento celular, sugiriendo que en la fase logarítmica el nucleoide está más libremente empaquetado, mientras que, en la fase estacionaria está más firmemente empaquetado. De manera que, por medio de estas evidencias y por los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede sugerir que el material morado de aspecto laxo pueda tratarse de un nucleoide con un menor nivel de empaquetamiento, posiblemente, en donde el ADN se transcribe en ARN; y el material grampositivo más compacto pueda que sea el ADN del nucleoide que no se transcribe.

Los colorantes empleados en la tinción de Gram: cristal violeta y safranina, son moléculas cargadas positivamente, es decir, de carácter básico, que se van a combinar con los constituyentes celulares cargados negativamente, como los ácidos nucleicos. Como ya se ha mencionado, este mecanismo de tinción ha sido demostrado en células eucariotas, donde que los componentes de los cromosomas de los animales coloreados con cristal violeta son los ácidos nucleicos (22). De modo que, en la presente investigación al obtener asociación entre la reacción de coloración de Gram (morado y rosado) con la degradación enzimática de ADN y ARN, se confirma que el color morado del material de aspecto laxo o compacto, se debe a la interacción entre el complejo cristal violeta-iodo con ADN y ARN, y el

color rosado intenso en el citoplasma, es igualmente, debido a una interacción entre la safranina y el ADN y ARN del citoplasma bacteriano. Se ha señalado que cuando las bacterias se encuentran en crecimiento activo presentan ciertos cambios visibles, en donde el protoplasma se tiñe intensamente con los colorantes básicos (25), tal como se ha observado en el ciclo celular de la bacteria evaluada del presente estudio.

Tobiason y Seifert (10) quienes en un estudio sobre la poliploidía de *N. gonorrhoeae*, señalaron que a pesar de haber aplicado colorantes específicos de ADN (DAPI), no se discernieron los nucleoides, debido al tamaño diminuto de la bacteria, sugiriendo mediante técnica de PCR cuantitativo, que el contenido de ADN de los gonococos refleja múltiples

cromosomas replicados completamente, una célula cocal puede tener de dos a seis cromosomas y un diplococo de cuatro a diez. La observación de más de un nucleoide en la célula cocal es el reflejo de la rapidez del proceso de síntesis de ADN. Por otra parte, el material genético de aspecto difuso o laxo, y las estructuras redondas y compactas, durante el ciclo celular, muestran la organización del nucleoide para los procesos de duplicación y transcripción del ADN; sugiriendo que el material genético de aspecto laxo, el cual fue el más frecuente sea el necesario para que se desarrollen tales procesos. Al existir asociación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre la reactividad grampositiva de la coloración de Gram con DAPI positivo, se demuestra morfológica y



tintorialmente, que el material morado de aspecto laxo o compacto, con forma redonda o distribución periférica en el citoplasma de mono y diplococos, teñidos por Gram, corresponde al nucleoide bacteriano, que contiene el ADN. Nunca antes se ha documentado hallazgos similares.

CONCLUSION

En la tinción gramnegativa intensa y en el carácter grampositivo de *N. gonorrhoeae*, participan el ADN y ARN, sugiriendo que el material grampositivo de aspecto laxo o compacto sea el nucleoide.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Mireya Acuña, jefa del área de ITS-SIDA, las enfermeras Natalí, Luz Marina e Ingrid, quienes gratamente colaboraron en la atención al paciente y

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

REFERENCIAS

1. Beveridge TJ. Use of the gram stain in microbiology. *Biotech Histochem.* 2001;76(3):111-118.
2. Yamanaka K. Reviews for Gram stain. *Rinsho Byori.* 2002;50(5):449-454.
3. Coico R. Gram staining. *Curr Protoc Microbiol.* 2005;Appendix 3:Appendix 3C. doi: 10.1002/9780471729259.mca03cs00.



4. Moyes RB, Reynolds J, Breakwell DP. Differential staining of bacteria: Gram stain. *Curr Protoc Microbiol.* 2009;Appendix 3:Appendix 3C. doi: 10.1002/9780471729259.mca03cs15.
5. Freeman BA. *Microbiología de Burrows*. 22^a ed. Madrid: Emalsa, S.A.; 1986.
6. Mazana J. Bacteria and their dyes: Hans Christian Joachim Gram. *Immunologia.* 1992;4(11):34-44.
7. Flores E, Albarado L. Ciclo celular por Gram y tinción de fluorescencia modificada en bacterias con aspecto morfotintorial semejante a *Neisseria gonorrhoeae* aisladas de muestras perianales y uretrales. *NOVA.* 2009;7(11):27-33.
8. Wang JD, Levin PA. Metabolism, cell growth and the bacterial cell cycle. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(11):822–827.
9. Angert ER. Alternatives to binary fission in bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(3):214-224.
10. Tobiason DM, Seifert HS. The obligate human pathogen, *Neisseria gonorrhoeae*, is polyploid. *PLoS Biol.* 2006;4(6):e185.
11. Toro E, Shapiro L. Bacterial chromosome organization and



- segregation. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010;2(2):a000349.
12. Ryter A. Association of the nucleus and the membrane of bacteria: a morphological study. Bacteriol Rev. 1968;32(1):39-54.
13. Gómez M, Camacho R. The bacterial nucleoid. Rev Latinoam Microbiol. 1995;37(3): 281-290.
14. Kois A, Swiatek M, Zakrzewska J. Structure of bacterial chromosome. Postepy Hig Med Dosw. 2007;61:534-540.
15. Flores E, Albarado L, Thomas D, Lobo A. Comparación de la tinción fluorescencia modificada y Gram, en muestras urogenitales y perianales de pacientes asistidos en el área de infecciones de transmisión sexual del ambulatorio Arquímedes Fuentes, Cumaná estado Sucre. Salus. 2008;12(2):29-35.
16. Liu Y, Liu W, Russell MW. Suppression of host adaptive immune responses by *Neisseria gonorrhoeae*: role of interleukin 10 and type 1 regulatory T cells. Mucosal Immunol. 2013;12. doi: 10.1038/mi.2013.36
17. Reinton N, Moi H, Olsen AO, Zarabyan N, Bjerner J, Tønseth TM, Moghaddam A. Anatomic distribution of *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma genitalium* infections in men who



- have sex with men. *Sex Health*. 2013;10(3):199-208.
18. Pardi G, Pérez MF, Pacheco A, Mata M. Algunas consideraciones sobre *Neisseria gonorrhoeae*. *Acta Odontol Venez*. 2004;42(2):57-63.
19. Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas color. 5^a ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1999.
20. Prescott LM, Harley JP, Klein DA. Microbiología. 5^a ed. Madrid: McGraw Hill-Interamericana de España; 2004.
21. Alter D, Josephson S. Gram positive *Neisseria meningitis*. *Arch Pathol Lab Med*. 1999;123(5):444.
22. Dutt MK. Selective staining of animal chromosomes with synthetic dyes following iodine-dye-procedure. *Acta Histochem*. 1975;53(2):211-216.
23. <http://www.coordinv.ciens.ucv.ve/investigacion/coordinv/index/CONCIENCIA/codigoe.pdf>
24. <http://www.healthscience.net/resources/declaration-of-helsinki/>
25. Brooks GF, Butel JS, Ornston LN, Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. Microbiología de Jawetz, Melnick y



- Adelberg. 17^a ed. México: El Manual Moderno, S.A. de C.V.; 1992.
26. Pértega S, Pita S. Asociación de variables cualitativas: El test exacto de Fisher y el test de McNemar. Metodología de la Investigación. 2004;1-7.
27. De Robertis EDP, De Robertis EMF. Biología celular y molecular. 10^a ed. Barcelona: Editorial El Ateneo S.A.; 1981.
28. Rouvière-Yaniv J, Yaniv M, Germond JE. *E.coli* DNA-binding protein HU forms nucleosome-like structure with circular double-stranded DNA. Cell. 1979;17(2):265-274.
29. Kim J, Yoshimura SH, Hizume K, Ohniwa RL, Ishihama A, Takeyasu K. Fundamental structural units of the *Escherichia coli* nucleoid revealed by atomic force microscopy. Nucleic Acids Res. 2004;32(6):1982-1992.