



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

ASOCIACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS TINTORIALES POR GRAM Y
TINCIÓN DE FLUORESCENCIA MODIFICADA CON SÍNTESIS DE
ADN Y ARN EN LAS DISTINTAS ETAPAS DEL
CICLO CELULAR DE *Neisseria gonorrhoeae*
(Modalidad: Tesis de Grado)

SUSANNY DEL CARMEN CARABALLO SUNIAGA

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOANÁLISIS

CUMANÁ, 2013

ASOCIACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS TINTORIALES POR GRAM Y
TINCIÓN DE FLUORESCENCIA MODIFICADA CON SÍNTESIS DE
ADN Y ARN EN LAS DISTINTAS ETAPAS DEL
CICLO CELULAR DE *Neisseria gonorrhoeae*

APROBADO POR:

Prof. Evelin Flores
Asesora

ÍNDICE

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTO	II
LISTA DE TABLAS	III
LISTA DE FIGURAS.....	V
RESUMEN	VII
INTRODUCCIÓN	- 1 -
METODOLOGÍA	- 6 -
Muestreo	- 6 -
Cultivo, aislamiento e identificación	- 6 -
Identificación macroscópica de las colonias.....	- 7 -
Prueba de la oxidasa	- 7 -
Prueba de superoxol.....	- 7 -
Oxidación de carbohidratos	- 7 -
Identificación microscópica de las colonias	- 8 -
Coloración de Gram.....	- 8 -
Tinción diferencial de fluorescencia modificada.....	- 8 -
Coloración de 4',6-diamidino-2'-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI).....	- 9 -
Coloración de Feulgen.....	- 9 -
Estudio del ciclo celular de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	- 10 -
Cultivo en fase exponencial.....	- 10 -
Ciclo celular.....	- 10 -
Tratamiento con las enzimas ADNasa y ARNasa	- 11 -
Controles.....	- 11 -
Análisis estadístico	- 12 -
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 13 -
Descripción morfotintorial por Gram de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> en los extendidos procedentes de colonias del agar GC	- 13 -
Descripción morfotintorial por Gram de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> en el ciclo celular - 15 - -Asociación entre la reactividad tintorial por la coloración de Gram con síntesis de ADN y ARN, en el ciclo celular de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	- 16 -
Descripción morfotintorial por la tinción de fluorescencia modificada de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> en los extendidos procedentes de colonias del agar GC	- 18 -

Descripción morfotintorial por la tinción diferencial de fluorescencia modificada de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> en el ciclo celular	- 21 -
Asociación entre la reactividad tintorial por la coloración de fluorescencia modificada con síntesis de ADN y ARN, en el ciclo celular de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	- 23 -
Descripción de las características morfológicas del nucleoide por las tinción de Feulgen y 4',6-diamidino-2'-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI) en el ciclo celular de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	- 27 -
Asociación entre el color morado presentado por las estructuras compactas y laxas en el citoplasma de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> por Gram con la reactividad tintorial por 4',6-diamidino-2'-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI), en el ciclo celular	- 28 -
Descripción morfotintorial por Gram de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 en los extendidos de colonias del medio manitol salado y ciclo celular	- 30 -
Asociación entre las característica tintorial por la coloración de Gram y fluorescencia modificada con síntesis de ADN y ARN, en el ciclo celular de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	- 31 -
Descripción morfotintorial por la coloración de fluorescencia modificada en colonias del medio manitol salado y ciclo celular de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	- 32 -
Asociación entre las características tintoriales por la coloración fluorescencia modificada con síntesis de ADN y ARN, en las distintas etapas del ciclo celular de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	- 34 -
Descripción de las características morfológicas del nucleoide por las tinciones diferencial de fluorescencia modificada, 4',6-diamidino-2'-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI) y Feulgen, en el ciclo celular de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	- 36 -
Descripción morfotintorial por Gram de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 en colonias del medio McConkey y ciclo celular	- 37 -
Asociación entre las características tintoriales por la coloración Gram con síntesis de ADN y ARN, en el ciclo celular de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	- 38 -
Descripción morfotintorial por la tinción diferencial de fluorescencia modificada de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 en colonias y ciclo celular	- 41 -
Asociación entre las características tintoriales por la coloración fluorescencia modificada con síntesis de ADN y ARN, en el ciclo celular de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	- 43 -
Descripción de las características morfológicas del nucleoide por las tinciones diferencial de fluorescencia modificada, 4',6-diamidino-2'-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI) y Feulgen, en el ciclo celular de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	- 45 -
CONCLUSIONES	- 47 -
BIBLIOGRAFÍA	- 48 -
HOJAS DE METADATOS	- 51 -

DEDICATORIA

A

Dios y mi virgencita del Valle, que siempre están conmigo, iluminando y guiando mis pasos. Lo más precioso que me ha regalado la vida, mi hija adorada Mia Isabella del Valle, a ti amor, Roger Mujica, que siempre estás llenando cada momento de mi vida de alegría, a mi madre y abuela Rosa, por su amor incondicional y dedicación constante, a mis hermanos Jesús, Victor, Rosanny, Francys y Anny, a mis sobrinos Steven, Jeisell, Francelvis y Daviannys, a mis tios en especial Luis Miguel y Francisco, a Rogelio, Marilyn, José R. e Isaura por cuidar de mi ángel.

Este logro está dedicado a todas aquellas personas que forman parte de mi vida y han dejado huellas en ella.

AGRADECIMIENTO

A

La casa más alta a la Universidad de Oriente.

Mi asesora, profesora Evelin Flores, por su apoyo, colaboración, dedicación, amor a lo que hace y por brindarme y compartir todo el conocimiento de manera abierta y desinteresada.

La Dra. Mireya Acuña, jefa del área de ITS-SIDA del ambulatorio “Dr. Arquímedes Fuentes Serrano”, y la enfermera Luz Marina quienes prestaron su colaboración en la atención al paciente y toma de muestras.

Al laboratorio de Microbiología e Histología de la Universidad de Oriente y, en especial, a la Profesora Luzmila Albarado.

Al personal del laboratorio clínico Santa Inés y, en especial, a Inés y Antonio.

Marina González, Marlyn Sabino, Eleymar Ramírez, Yuli, Edith, Uslany, Álvaro, que de alguna manera me ayudaron para llevar a cabo la realización de este proyecto.

Mis compañeras de clases Mariángeles Hurtado, Marlin Yegres e Inés Martínez. A todos mil gracias.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Frecuencia de tiempos del ciclo celular de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , que contienen cocos aislados y diplococos con tinción rosado intenso o claro, por el método de Gram, antes y después del tratamiento enzimático con ADNasa y ARNasa.....	- 17 -
Tabla 2. Frecuencia de tiempos del ciclo celular de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , que contienen cocos aislados y diplococos con material morado o no en el citoplasma, teñidos por Gram, antes y después del tratamiento enzimático con ADNasa y ARNasa...-	18 -
Tabla 3. Reacción tintorial en <i>Neisseria gonorrhoeae</i> por la coloración diferencial de fluorescencia modificada a diferentes tiempos.....	- 21 -
Tabla 4. Frecuencia de tiempos del ciclo celular de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , con cocos aislados y diplococos amarillo ligeramente fluorescente, antes y después del tratamiento con la enzima ADNasa y ARNasa.....	- 24 -
Tabla 5. Frecuencia de tiempos del ciclo celular de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , con cocos aislados y diplococos amarillo fluorescente, antes y después del tratamiento enzimático con ADNasa y ARNasa.....	- 24 -
Tabla 6. Frecuencia de tiempos del ciclo celular de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , con cocos aislados y diplococos anaranjado ligeramente fluorescente, antes y después del tratamiento enzimático con ADNasa y ARNasa.....	- 25 -
Tabla 7. Frecuencia de tiempos del ciclo celular de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , con cocos aislados y diplococos anaranjado fluorescente, antes y después del tratamiento enzimático con ADNasa y ARNasa.....	- 26 -
Tabla 8. Frecuencia de tiempos del ciclo celular de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , que contienen cocos aislados y diplococos con material morado o no en el citoplasma, teñidos por Gram, y reactividad tintorial con 4',6-diamidino-2'-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI).....	- 30 -
Tabla 9. Frecuencia de tiempos con cocos grampositivos, antes y después del tratamiento enzimático con ADNasa y ARNasa, en el ciclo celular de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	- 32 -
Tabla 10. Reacción tintorial en <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 por la coloración diferencial de fluorescencia modificada a diferentes tiempos.....	- 33 -
Tabla 11. Frecuencia de tiempos con cocos amarillo ligeramente fluorescente, antes y después del tratamiento enzimático con ADNasa y ARNasa, en el ciclo celular de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	- 35 -
Tabla 12. Frecuencia de tiempos con cocos anaranjado ligeramente fluorescente, antes y después del tratamiento enzimático con ADNasa y ARNasa, en el ciclo celular de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	- 35 -
Tabla 13. Frecuencia de tiempos con cocos anaranjado fluorescente, antes y después del tratamiento enzimático con ADNasa y ARNasa, en el ciclo celular de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	- 36 -

Tabla 14. Reacción tintorial en <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 por la coloración de Gram a diferentes tiempos.	- 38 -
Tabla 15. Reacción tintorial en <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 por la coloración de Gram post-tratamiento con ADNasa.	- 39 -
Tabla 16. Reacción tintorial en <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 por la coloración de Gram post-tratamiento con ARNasa.	- 39 -
Tabla 17. Frecuencia de tiempos con bacilos gramnegativos de intensidad variable, antes y después del tratamiento enzimático con ADNasa y ARNasa, en el ciclo celular de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	- 40 -
Tabla 18. Frecuencia de tiempos con bacilos gramnegativos que presentaron o no estructuras redondas y material morado difuso en el citoplasma, antes y después del tratamiento enzimático con ADNasa y ARNasa, en el ciclo celular de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	- 40 -
Tabla 19. Reacción tintorial en <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 por la coloración de fluorescencia modificada.	- 43 -
Tabla 20. Frecuencia de tiempos con bacilos amarillos fluorescentes, antes y después del tratamiento con la enzima ADNasa y ARNasa, en el ciclo celular de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	- 44 -
Tabla 21. Frecuencia de tiempos con bacilos anaranjados ligeramente fluorescentes, antes y después del tratamiento enzimático con ADNasa y ARNasa, en el ciclo celular de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	- 44 -
Tabla 22. Frecuencia de tiempos con bacilos anaranjados fluorescentes, antes y después del tratamiento enzimático con ADNasa y ARNasa, en el ciclo celular de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	- 45 -

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Fotomicrografías de extendidos de colonias del medio GC de *Neisseria gonorrhoeae*, coloreados por Gram. A) Diplococos gramnegativos donde se visualiza un material difuso en su citoplasma coloreado suavemente de morado (flechas). B) Diplococos grampositivos. C) Diplococos con un material redondo compacto morado en el citoplasma de la célula (flechas). 1000X. - 13 -
- Figura 2. Fotomicrografías del ciclo celular de *Neisseria gonorrhoeae*, por coloración de Gram. Cocos aislados 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 flecha muestran cocos aislados con material morado periférico. 1000X. - 16 -
- Figura 3., Fotomicrografías del ciclo celular de *Neisseria gonorrhoeae* antes y después del tratamiento enzimático por Gram. A) Antes del tratamiento enzimático, diplococos gramnegativos con material morado compacto (cabeza de flechas). B) Después del tratamiento enzimático con ADNasa, las células aclararon (flecha) C. Después del tratamiento enzimático con la enzima ARNasa, las células aclararon (flechas). 1000X. - 17 -
- Figura 4. Fotomicrografías de extendidos de colonias del medio GC de *Neisseria gonorrhoeae*, coloreados por tinción de fluorescencia modificada. A) Cocos aislados y diplococos anaranjados fluorescentes. B) Cocos aislados y diplococos anaranjados ligeramente fluorescentes. C) Cocos aislados y diplococos amarillos fluorescentes. D) Cocos aislados y diplococos amarillos ligeramente fluorescentes. E) Cocos aislados y diplococos verdes fluorescentes y ligeramente fluorescentes. 1000X. - 19 -
- Figura 5. Fotomicrografías de extendidos del ciclo celular de *Neisseria gonorrhoeae*, por tinción de fluorescencia modificada. 1000X. - 22 -
- Figura 6. Fotomicrografías de extendidos de *Neisseria gonorrhoeae*, teñidos por Feulgen. 1000X. - 27 -
- Figura 7. Fotomicrografías de extendidos del ciclo celular de *Neisseria gonorrhoeae*, coloreados con 4',6-diamidino-2'-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI). 1000X. - 28 -
- Figura 8. Fotomicrografías de cocos aislados y diplococos a partir del ciclo celular de *Neisseria gonorrhoeae*, coloreados con Gram y 4',6-diamidino-2'-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI). A-E) cocos aislados. F-J) Diplococos. Nótese que el material morado en cocos aislados y diplococos coloreados por Gram, tiene similar forma, aspecto, tamaño y distribución que el nucleoide, coloreado de azul fluorescente con DAPI. La figura J, muestra la forma del nucleoide más frecuente observada en el ciclo celular que fue de aspecto difuso. 1000x. - 29 -
- Figura 9. Fotomicrografías de extendidos de colonias y ciclo celular de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, por coloración de Gram. A) Cocos aislados y en pares grampositivos. B) cocos con doble tinción, una célula del par grampositivo y la otra gramnegativa (flechas). 1000X. - 31 -

Figura 10. Fotomicrografías de extendidos de colonias y ciclo de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, post-tratamiento ADNasa, coloreados por Gram. A) Antes del tratamiento enzimático los cocos fueron grampositivos. B) Luego del tratamiento los cocos de las colonias aparecieron gramnegativos. C) Después del tratamiento enzimático, en el ciclo celular se observaron cocos rosados muy claros. 1000X.....	- 31 -
Figura 11. Fotomicrografías de extendidos de colonias y ciclo de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, post-tratamiento ARNasa, coloreados por Gram. A) Antes del tratamiento: cocos grampositivos. B-C) Después del tratamiento enzimático, los cocos se observaron con doble tinción grampositivo-gramnegativo.1000X.....	- 32 -
Figura 12. Fotomicrografías de colonias de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, por tinción de fluorescencia modificada. A-B. Cocos en pares y racimos anaranjado fluorescente. 1000X.....	- 33 -
Figura 13. Fotomicrografías de extendidos del ciclo celular de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, por tinción de fluorescencia modificada. 1000X.	- 34 -
Figura 14. Fotomicrografías de las características tintoriales de extendidos de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, por diferentes coloraciones. A) Coloración de Gram. B) Coloración de fluorescencia modificada. C) Coloración de DAPI sin tratamiento. D). Coloración de DAPI con tratamiento enzimático con ADNasa. E) Coloración de Feulgen. 1000X.....	- 37 -
Figura 15. Fotomicrografías de extendidos de colonias del medio MacConkey de <i>Escherichia coli</i> 25922, coloreados por Gram. A) Bacilos gramnegativos con estructuras redondas moradas en su interior (flechas). B) Bacilos gramnegativos con material difuso en el citoplasma (flechas).1000X.....	- 37 -
Figura 16. Fotomicrografías de extendidos de los diferentes tiempos del ciclo celular de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, coloreados por Gram. Se muestran las estructuras redondas moradas en número de 1 y 2 en los extremos ó 4-5, y el material morado difuso en el citoplasma1000x.	- 38 -
Figura 17. Fotomicrografías de extendidos del ciclo celular de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 post-tratamiento enzimático con ADNasa, coloreados por Gram. 1000X.	- 39 -
Figura 18. Fotomicrografías de extendidos del ciclo celular de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 post-tratamiento con la enzima ARNasa, coloreados por Gram. 1000X.....	- 40 -
Figura 19. Fotomicrografías de extendidos de colonias de <i>Escherichia coli</i> 25922, teñidos por fluorescencia modificada. Bacilos verde y anaranjado ligeramente fluorescente. 1000X.....	- 41 -
Figura 20. Fotomicrografías de las características tintoriales por tinción de fluorescencia modificada del ciclo celular de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922. Las flechas señalan las estructuras redondas ubicadas en el centro o extremos de la bacteria en número de 1-4. 1000X.....	- 42 -

RESUMEN

Con el propósito de evaluar la asociación de las características tintoriales por Gram y tinción de fluorescencia modificada con la síntesis de ADN y ARN en las distintas etapas del ciclo celular de *Neisseria gonorrhoeae*, se evaluaron 10 aislamientos de *N. gonorrhoeae*, procedentes de muestras uretrales de pacientes del área de Infección de Trasmisión Sexual del ambulatorio “Dr. Arquímedes Fuentes Serrano”, Cumaná-Venezuela, en el periodo de febrero-mayo, 2011. El ciclo celular se realizó transfiriendo 5 gotas de un cultivo Infusión Cerebro Corazón (BHI) enriquecido con 5% de sangre, en fase exponencial (16-18 horas), a un caldo fresco del mismo medio de cultivo, incubándose por 1 hora a 37°C; a partir de éste, se tomaron alícuotas del cultivo en el tiempo 0 y luego cada 5 minutos hasta las 2 horas. Se realizaron extendidos de las colonias aisladas del medio GC y del caldo BHI enriquecido con sangre en los diferentes tiempos del ciclo celular, en láminas nuevas y estériles, se aplicó la técnica de coloración de Gram, la tinción diferencial de fluorescencia modificada, 4',6-diamidino-2'-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI) y Feulgen, antes y después del tratamiento enzimático con ADNasa y ARNasa; asimismo, se empleó el análisis estadístico de McNemar, para establecer asociación entre la reactividad tintorial por Gram y fluorescencia antes y después del tratamiento enzimático; así como también la prueba de Fischer para asociar la reactividad tintorial por los métodos de coloración Gram y DAPI. Se observaron en todos los tiempos cocos aislados y diplococos gramnegativos; con la tinción diferencial de fluorescencia las bacterias presentaron variaciones en la tinción e intensidad de fluorescencia en los diferentes tiempos del ciclo celular, con una secuencia de amarillo, anaranjado y verde; el color predominante fue el anaranjado ligeramente fluorescente. La coloración específica para ADN, DAPI, permitió la visualización del nucleóide, como estructuras redondas de aspecto laxo y compacto, observándose de 1 a 4 en una célula. El color rosado claro y oscuro observado por Gram en diplococos tuvo asociación significativa ($p < 0,05$) con la reacción de DAPI negativa y positiva, respectivamente. La coloración de Feulgen permitió la observación de las mismas características morfológicas observadas por la técnica de DAPI, pero en este caso, el ácido nucleico se coloreó de fucsia. Al aplicar tratamiento enzimático con ADNasa y ARNasa, se logró apreciar cambios en la reactividad de Gram y coloración de fluorescencia en las células bacterianas procedentes de las colonias aisladas del medio GC y del caldo BHI enriquecido con sangre en los diferentes tiempos del ciclo celular; por Gram se observó que las células que se coloreaban de rosado intenso, post-tratamiento con las enzimas ADNasa y ARNasa aclararon, existiendo asociación significativa ($p < 0,05$) entre la reactividad tintorial por Gram y la degradación de ADN y ARN; y con la tinción de fluorescencia, el color amarillo ligero o intensamente fluorescente y anaranjado ligeramente fluorescente observados, inicialmente, sin el tratamiento enzimático, no se visualizaron o se observaron en menor proporción. Se concluye que, las variaciones tintoriales con Gram y fluorescencia modificada en *Neisseria gonorrhoeae* están asociadas a la síntesis de ARN y ADN.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias son microorganismos con una extraordinaria capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales. Para comprender la esencia de esta capacidad es importante conocer la organización de la información genética y los mecanismos de variación y regulación de la expresión genética. La capacidad infecciosa de las bacterias patógenas radica en que poseen la información genética necesaria para colonizar los tejidos de un hospedero, invadirlos y producir sustancias tóxicas que en definitiva causarán la enfermedad (Schaechter *et al.*, 1994).

Los gonococos son bacterias de crecimiento lento y con requerimientos nutricionales muy estrictos. Dado que, con frecuencia deben ser aislados de áreas que contienen un gran número de microorganismos de la flora normal como lo es el tracto genitourinario, recto y garganta, nunca se consideran flora normal y siempre son de importancia clínica (Finegold, 1996; Prescott *et al.*, 2008). *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 (Scott *et al.*, 2002).

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 (German *et al.*, 2004; Lanz *et al.*, 2004; Prescott *et al.*, 2008; Koneman *et al.*, 2008).

La existencia de un nucleoide en las bacterias fue reconocido hace más de 70 años, como resultado de las observaciones microscópicas. El nucleoide ocupa una parte relativamente pequeña del citoplasma de la célula, contiene el ADN genómico,

moléculas de ARN y proteínas (Ryter, 1968; Gómez y Camacho, 1995; Kois *et al.*, 2007). Varias investigaciones se han desarrollado sobre el ciclo celular bacteriano, principalmente, en *Escherichia coli*. El ciclo celular involucra procesos que van desde la replicación del ADN hasta la división celular y comprende tres fases: la fase C, caracterizada por la replicación del ADN cromosómico y es equivalente a la fase S en eucariotas, una fase D, que comprende el tiempo entre el final de la replicación y la división celular y es conocido como G2 en eucariotas y la fase innominada, que es el período que transcurre desde que nace la célula hija hasta el inicio de la replicación, y es análoga con la fase G1 en eucariotas. Esta fase es la de mayor variabilidad, en la que ocurre la síntesis de ARN y de proteínas, además de otros componentes celulares (Flores y Albarado, 2009a).

Las técnicas de microscopía de fluorescencia han representado una herramienta complementaria válida para comprender la interrelación entre los componentes bioquímicos celulares y estructurales con los procesos fisiológicos llevados a cabo en el ciclo celular. Así pues, estos estudios han demostrado mediante el uso de bacterias mutantes, la influencia de ciertas proteínas del citoesqueleto (MreB) y asociadas al ADN, tal como la proteína tipo histona HU, en la configuración del nucleóide bacteriano, desplazamiento del origen de replicación y funciones de la ARN polimerasa, lo cual tiene impacto en la forma de la célula y transcripción, cambios que le sirven a la bacteria como un mecanismo efectivo para sincronizar la respuesta genética a condiciones externas, tal como ocurre en infecciones de tejidos del hospedero, o son cambios que la afectan hasta producir la muerte celular (Kar *et al.*, 2005; Srivastava *et al.*, 2007; Berger *et al.*, 2010). Por otra parte, debido al incremento de patógenos bacterianos resistentes a las antibióticos actualmente disponibles, ha surgido la necesidad de ensayar nuevos antimicrobianos cuyos mecanismos de acción aún son desconocidos, por lo que, investigadores se han dedicado a entender los efectos de estos antibióticos sobre las células, empleando dentro del estudio técnicas de microscopía de fluorescencia, a fin de percibir los daños causados por estas moléculas sobre la morfología y estructura de la membrana de la célula bacteriana (Marcellini *et al.*, 2010).

En 1884, Hans Christian Gram desarrolló 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: grampositivas y gramnegativas. La tinción de Gram todavía sigue siendo la piedra angular para la identificación bacteriana y la división taxonómica (Moyes *et al.*, 2009).

Se han propuesto muchas teorías para explicar el mecanismo de la reacción de coloración de Gram, dividiéndose éstas en dos categorías. Las suposiciones correspondientes al primer grupo asumen un mecanismo químico entre los componentes de la coloración de Gram y un sustrato específico de bacterias grampositivas. En el segundo grupo se propone la existencia de una diferencia de permeabilidad entre bacterias grampositivas y gramnegativas, basada en la estructura y composición de la pared celular. Existen evidencias que 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 (Freeman, 1986).

En el año 2002, Fazii *et al.*, diseñaron el método de coloración diferencial de fluorescencia, utilizando en un primer paso naranja de acridina, seguida de un proceso de decoloración con alcohol/acetona y, por último, fluoresceína de sodio, donde las bacterias grampositivas se tiñen de amarillo fluorescente y las gramnegativas de verde fluorescente. Más tarde, Flores *et al.* (2008), reportan una modificación en el pH de la solución de fluoresceína, que mejora la fluorescencia de las bacterias en frotis uretrales, endocervicales y perianales; los resultados fueron distintos a los de Fazii *et al.* (2002), sugiriendo que el color anaranjado fluorescente de los diplococos es consecuencia de una activa síntesis de ARN durante el ciclo celular bacteriano.

La literatura denomina bacterias gramvariables, a aquellas que se colorean de violeta y/o 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 grampositivos y gramnegativos, variaciones en la tinción bacteriana por Gram, así como también por la tinción diferencial de fluorescencia modificada, infiriendo que estas variaciones en la reactividad por Gram y fluorescencia están asociadas al contenido de los ácidos nucleicos en las distintas fases del ciclo celular (Albarado y Flores, 2008; Flores, 2008; Flores *et al.*, 2008; Flores y Albarado, 2009a; Flores y Albarado, 2009b).

La reacción de coloración de Gram y fluorescencia puede explicarse sobre los principios químicos de coloración. Dado a la similitud entre las propiedades moleculares del ADN y ARN de células eucariotas y procariontas, en el presente estudio se plantean dos hipótesis para explicar las reacciones de coloración por Gram y fluorescencia. La reacción de coloración por Gram puede ser soportada con los estudios citoquímicos 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 (Dutt, 1975). Mientras que, la hipótesis de las variaciones de color por la tinción diferencial de fluorescencia es apoyada con el trabajo de Darzynkiewicz (1990), el cual señala que el naranja de acridina es un colorante catiónico y metacromático, que emite fluorescencia cuando interactúa con los ácidos nucleicos, con el ADN donde se intercala produciendo una coloración verde fluorescente, y con el ARN interactúa expresando una tonalidad rojo fluorescente.

Las variaciones de color presentadas por la tinción diferencial de fluorescencia modificada se fundamentan en los procesos de síntesis de ADN y ARN en el ciclo

celular bacteriano, naturaleza química y mecanismo de acción del naranja de acridina sobre los ácidos nucleicos. El fluorocromo naranja de acridina doble sal hemi, ($C_{17}H_{20}ClN_3HCl \cdot 1/2ZnCl_2$), de carácter fuertemente básico, presenta mayor afinidad por estructuras de carga negativa, como los ácidos nucleicos de la célula, impidiéndose la remoción del colorante naranja de acridina con el alcohol/acetona en aquellas bacterias donde la síntesis de ARN sea mayor, la fluoresceína a baja concentración no ejercería el efecto diferencial, adquiriendo por lo tanto, una coloración anaranjado fluorescente. Por otro lado, las bacterias que no se encuentran en síntesis de ARN son decoloradas completamente tras la aplicación del alcohol/acetona, manifestando una tinción verde fluorescente o de baja fluorescencia, que puede estar asociada a síntesis de ADN. La tinción amarilla se produce dado que el naranja de acridina es removido parcialmente, pudiendo este hecho estar relacionado con una síntesis no tan activa de ARN, y al incorporar la fluoresceína de sodio se forma el sistema rojo/verde (Flores *et al.*, 2008).

En el estudio del ciclo celular de las bacterias, son pocas las técnicas de coloración de fluorescencia usadas y la de rutina es la específica para ADN, 4',6-diamidino-2'-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI). La importancia de la investigación es aportar una evidencia sobre el mecanismo de reacción de las coloraciones de Gram y fluorescencia modificada en *N. gonorrhoeae*; así como ofrecer la técnica de tinción diferencial de fluorescencia como una herramienta complementaria en los estudios del ciclo celular bacteriano. En la presente investigación, para dar evidencias sobre las hipótesis, se planteó como objetivo evaluar la asociación entre las características tintoriales obtenidas por la coloración de Gram y por la tinción de fluorescencia modificada, con síntesis de ADN y ARN en las distintas etapas del ciclo celular de *N. gonorrhoeae*.

METODOLOGÍA

Muestreo

Se seleccionaron un total de 18 pacientes con sospecha clínica de infección por *N. gonorrhoeae*, de la consulta de Infecciones de Transmisión Sexual (ITS) del ambulatorio “Dr. Arquímedes Fuentes Serrano” en Cumaná, estado Sucre, durante el periodo febrero-mayo 2011. A cada paciente se le tomaron dos hisopados de secreciones uretrales, el primero destinado a la elaboración de frotis y el segundo para el cultivo bacteriológico, el cual se colocó en medio de transporte Amies con carbón activado. 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.

La recolección de las muestras fue realizada por el médico especialista, jefe del área de ITS-SIDA, cumpliendo con las normas de bioéticas establecidas por la República Bolivariana de Venezuela, publicado en gaceta N° 39434, para trabajos de investigación en humanos (MPPS, 2010).

Cultivo, aislamiento e identificación

Los hisopos con las muestras se inocularon en forma de Z sobre el medio selectivo gonococo (GC); luego, con asa de platino estéril se realizó un estriado perpendicular sobre las líneas de siembra, con el fin de identificar colonias de *N. gonorrhoeae* en la zona periférica del medio, lejos del área de inoculación primaria de la muestra. Las placas sembradas se incubaron en atmósfera de microaerofilia (5-10% CO₂), húmeda y a una temperatura de 37°C, evaluando el crecimiento a las 24, 48 y 72 h (Germán *et al.*, 2004). La identificación de *N. gonorrhoeae* se basó en el estudio de las características macroscópica y microscópica de las colonias, las pruebas bioquímicas: oxidasa,

superoxol y oxidación de hidratos de carbono como glucosa, maltosa, sacarosa, lactosa y fructosa (Koneman *et al.*, 2008).

Identificación macroscópica de las colonias

El reconocimiento macroscópico de las colonias se basó en la evaluación del tamaño, forma, consistencia, color y elevación. Aquellas colonias redondas, pequeñas, traslúcidas, mucoides, convexas y elevadas se consideraron, presuntivamente, del género *Neisseria*.

Prueba de la oxidasa

El género *Neisseria* tiene la capacidad de producir la enzima citocromo oxidasa y para evidenciarla se realizó el método de Kovacs, para lo cual se impregnó un trozo de papel de filtro con solución de tetrametil-p-fenilendiamina al 1%. Posteriormente, se tomó una colonia con un palillo de madera y se frotó sobre el papel de filtro, para luego observar la aparición de un color morado oscuro que indica la positividad de la prueba.

Prueba de superoxol

Esta prueba permite la identificación presuntiva de la especie *N. gonorrhoeae*. Se realizó por el método en lámina, colocando una gota de peróxido de hidrógeno al 30% en una lámina estéril y con un palillo de madera se colocó una colonia sospechosa. Se consideró una reacción positiva al producirse un burbujeo inmediato y brusco.

Oxidación de carbohidratos

Esta prueba permite la identificación definitiva de *N. gonorrhoeae*. Se realizó utilizando tubos de ensayos con tapa de rosca que contenía un medio base de agar semisólido cisteína digerido triptico (CTA), a los cuales se le adicionó por separado 2% de glucosa, maltosa, sacarosa, lactosa y fructosa, además de rojo fenol como indicador de pH. Se utilizó un control CTA sin carbohidratos. Las colonias sospechosas fueron inoculadas

por punción en tubos que contenían los diferentes carbohidratos. La especie *N. gonorrhoeae* sólo oxida la glucosa, lo cual se evidenció por el cambio de viraje del indicador rojo fenol a amarillo.

Identificación microscópica de las colonias

Una vez desarrolladas las colonias entre 24-48 h, en el medio de cultivo GC, los extendidos se elaboraron, tomando de 2 a 12 colonias por cultivo positivo, evaluándose un total de 67 colonias por las técnicas de coloración de Gram, fluorescencia modificada, DAPI y Feulgen.

Coloración de Gram

El procedimiento de coloración de Gram fue realizado según la técnica de Hucker modificada del año 1923 (Koneman *et al.*, 2008).

Tinción diferencial de fluorescencia modificada

Se preparó el colorante naranja de acridina al 0,7% en buffer acetato pH 4,0. Para preparar un volumen de 100 ml de solución de naranja de acridina, se agregaron 700 mg de naranja de acridina doble sal hemi (Sigma-Aldrich, USA) en 100 ml de buffer acetato pH 4,0. El buffer acetato pH 4,0 se preparó mezclando 82 ml de ácido acético 0,2 mol l⁻¹ con 18 ml de acetato de sodio 0,2 mol l⁻¹. El decolorante alcohol/acetona se preparó en una proporción 1:1. La solución de fluoresceína de sodio se ajustó a un pH de 6,5 y se preparó al 0,002% en alcohol etílico. Un volumen de 100 ml de solución contenía 2 mg de fluoresceína de sodio (Sigma-Aldrich, USA), 1,5 ml de ácido acético 0,4 mol l⁻¹, 0,5 ml de buffer acetato pH 4,6 y 98 ml de alcohol etílico. El buffer acetato contenía 52 ml de ácido acético 0,2 mol l⁻¹ y 48 ml de acetato de sodio 0,2 mol l⁻¹ (Flores *et al.*, 2008).

La lámina preparada con el extendido de las colonias se cubrió con la solución de naranja de acridina durante 2 min, luego, se lavó con agua de chorro y se procedió a decolorar con alcohol/acetona, exactamente, por 10 s, inclinando la lámina en un ángulo de 45°, se enjuagó nuevamente; se aplicó la solución de fluoresceína de sodio por 2 min y se eliminó el colorante con agua. Se dejó secar para su observación con microscopio de fluorescencia (Flores *et al.*, 2008).

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±0,2, 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.

Coloración de Feulgen

La tinción de Feulgen está destinada para identificar ADN mediante microscopía óptica, coloreando de fucsia o púrpura al ácido nucleico. En la reacción de Feulgen hay proporcionalidad entre la intensidad del color y el contenido de ADN. Los extendidos se colocaron en HCl 1 mol.l⁻¹ precalentado a 60°C por 30 min, con el fin de hidrolizar el ADN, se lavó en HCl 1 mol.l⁻¹ a temperatura ambiente por 1 min, luego, se coloreó con el reactivo de Feulgen-Coleman (fucsina básica decolorada por HCl) por 60 min. Para eliminar el exceso de colorante, se lavaron los portaobjetos en tres pasos consecutivos con metabisulfito de sodio por 2 min cada uno y se lavó con agua destilada, se dejaron

secar y se observaron al microscopio de campo brillante con magnificación de 1000X (Junqueira y Carneiro, 1996; García, 2000).

Las láminas para microscopía de fluorescencia se observaron con magnificación de 1000X, empleando un microscopio de epifluorescencia Olympus BX 60; para la coloración de fluorescencia modificada se empleó un filtro de excitación azul de banda amplia de 450-480 nm, espejo dicromático de 500 nm y un filtro de barrera de 515 nm. 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 (Flores y Albarado, 2009b).

Estudio del 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 (Prescott *et al.*, 2008). 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 (Salguero, 2007).

Ciclo celular

Las células pueden conservarse en fase exponencial transfiriéndolas repetidamente a un medio fresco de composición idéntica cuando están aún en crecimiento exponencial (Brooks *et al.*, 2002). De manera que para mantener esta fase de crecimiento y tener una

población bacteriana más sincrónica, se transfirieron 5 gotas de un cultivo Infusión Cerebro Corazón (BHI) enriquecido con 5% de sangre, en fase exponencial (16-18 horas), a un caldo fresco del mismo medio de cultivo, incubándose por 1 hora a 37°C; a partir de éste, se tomaron alícuotas del cultivo en el tiempo 0 y luego cada 5 minutos hasta las 2 horas. Se realizaron extendidos de las colonias aisladas del medio GC y del caldo BHI enriquecido con sangre en los diferentes tiempos del ciclo celular, en láminas nuevas y estériles, se fijaron por calor y se aplicó la técnica de coloración de Gram, la tinción diferencial de fluorescencia modificada, DAPI y Feulgen, antes y después del tratamiento enzimático con ADNasa y ARNasa; posteriormente, se observaron al microscopio.

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, agregando 1000 µl de la enzima en 1 ml del 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 sobre los extendidos de las colonias aisladas del medio GC y del caldo BHI enriquecido con sangre de los diferentes tiempos del ciclo celular, para la degradación 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 de las colonias aisladas del medio GC y del caldo BHI, enriquecido con sangre de los diferentes tiempos 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.

Controles

Para el control de las diferentes tinciones se utilizaron las cepas *Staphylococcus aureus*

ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922; estas cepas se procesaron del mismo modo que los aislamientos de *N. gonorrhoeae* evaluados y, adicionalmente, se les realizaron cultivos sincronizados, los cuales están compuestos por células donde todas se encuentran en la misma etapa del ciclo celular, permitiendo estudiar la sucesión de eventos que se llevan a cabo en una sola célula. (Brooks *et al.*, 2002). 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 (Stainer *et al.*, 1991). En el presente trabajo para obtener un cultivo sincronizado de cada control, se colocaron 5 gotas del cultivo bacteriano en crecimiento exponencial sobre una membrana de filtro de nitrato de celulosa, la cual presenta 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 fuera absorbido. Inmediatamente, se procedió a lavar suavemente con 3 ml de cultivo fresco de caldo triptosa fosfato, 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 dos horas 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 de los controles.

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 y fluorescencia modificada 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% (Pértega y Pita, 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Descripción morfotintorial por Gram de *Neisseria gonorrhoeae* en los extendidos procedentes de colonias del agar GC

En el cultivo primario de las muestras, se observó entre las 24-48 h, el desarrollo en agar GC de colonias redondas, pequeñas, translúcidas, mucoides, convexas, elevadas y con diámetro entre $0,5-1,0\text{ mm}$, oxidasa, superoxol positivo, con oxidación de glucosa, identificándose como *N. gonorrhoeae*. La evaluación microscópica de las colonias desarrolladas en el cultivo primario del medio GC y coloreados por Gram, mostró que de un total de 67 colonias evaluadas se obtuvo que en 66 se observaron cocos aislados y diplococos gramnegativos y un sólo caso como diplococos grampositivos, también se logró observar en el citoplasma de las células un material morado de aspecto laxo o compacto, frecuentemente de forma redonda con diámetro promedio de $0,45\pm 0,12\text{ }\mu\text{m}</math>, en las bacterias gramnegativas el material laxo adquiere una coloración morada clara y el material compacto una coloración morada oscura (figura 1).$

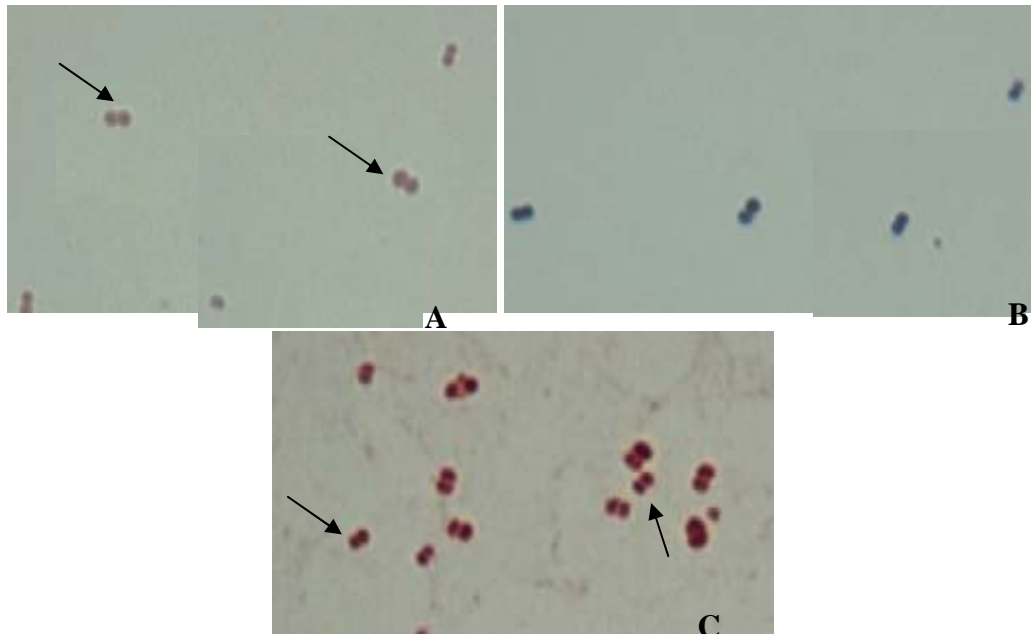


Figura 1. Fotomicrografías de extendidos de colonias del medio GC de *Neisseria gonorrhoeae*, coloreados por Gram. A) Diplococos gramnegativos donde se visualiza un material

difuso en su citoplasma coloreado suavemente de morado (flechas). B) Diplococos grampositivos. C) Diplococos con un material redondo compacto morado en el citoplasma de la célula (flechas).1000X. Los resultados de la presente investigación coinciden con los obtenidos por Flores (2008), quien reportó diplococos grampositivos en colonias con diámetro de 1 mm de *N. gonorrhoeae* y cocos en pares donde una de las células del par se mostraba grampositiva y la otra gramnegativa.

Mediante las bases químicas de coloración de los colorantes básicos, se puede soportar esta 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 (De Robertis y De Robertis, 2000), bajo este principio se sugiere que la coloración grampositiva observada en los cocos procedentes de las colonias de 1 mm de diámetro, así como, el material morado de distribución laxa o compacta, sea consecuencia de la interacción entre el complejo cristal violeta-iodo y los ácidos nucleicos (ADN y ARN), tal como se observa en células eucariotas (Dutt, 1975).

Por otra parte la observación de estructuras de tinción grampositivas laxas y compactas, sugiere que correspondan al nucleóide bacteriano y la distribución laxa y compacta puede estar asociada al modo de empaquetamiento de los nucleóides. En los nucleóides existen proteínas tipo histona, tales como HU e IHF. Las proteínas HU, son como las histonas del ADN en eucariotas, que forman homó o heterodímeros o heterooctámeros y juegan un rol crítico en la construcción del nucleóide, mediante la formación de estructuras tipo nucleosomas (Rouviere *et al.*, 1979). Joongbaek *et al.* (2004), empleando microscopía de fluorescencia y de fuerza atómica, esta última proporciona imágenes moleculares a la escala de nano, evaluaron la estructura de compactación del

nucleoide en células de *E. 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 correspondiente a la fibra de 30 nm en el cromosoma eucariótico y, probablemente, está compuesto de proteínas similares a histonas y otras proteínas relacionadas con el nucleoide; ellos presumieron que las fibras 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. Así pues, por medio de estas evidencias y por los resultados obtenidos 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.

Descripción morfotintorial por Gram de *Neisseria gonorrhoeae* en el ciclo celular

Mediante el estudio microscópico con Gram, se obtuvo que en todos los tiempos del ciclo celular, morfológica y tintorialmente, se observaron cocos aislados 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 $0,47 \pm 0,11 \mu\text{m}$, ubicada en el centro de la célula o excéntricamente, asimismo, fue frecuente la observación de cocos aislados con un material morado periférico en forma de rueda (figura 2).

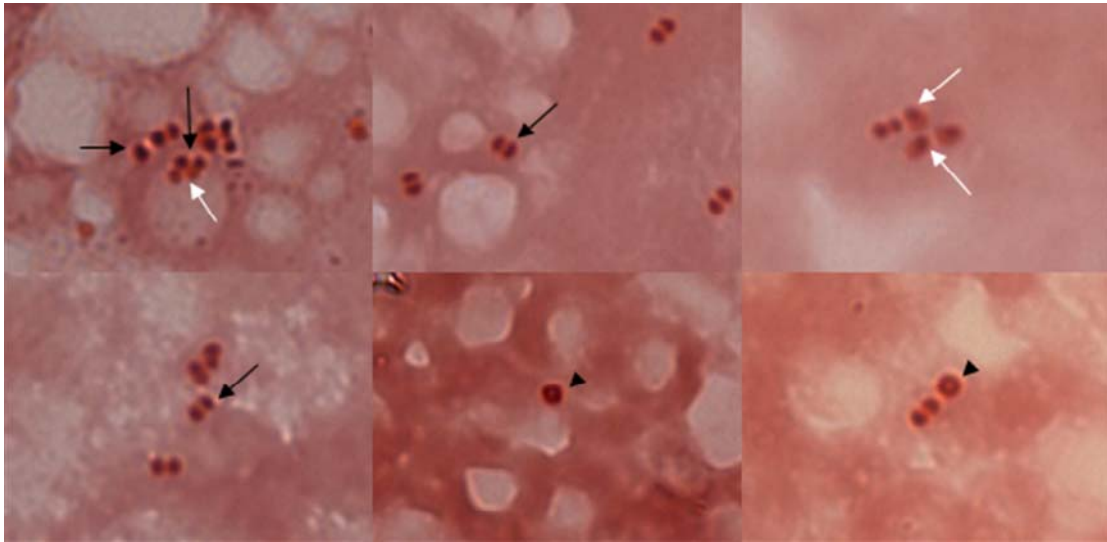


Figura 2. Fotomicrografías del ciclo celular de *Neisseria gonorrhoeae*, por coloración de Gram. Cocos aislados y diplococos gramnegativos. Las flechas negras indican la estructura morada compacta, y las flechas blancas el material laxo en el interior de las células, las cabezas de flecha muestran cocos aislados con material morado periférico. 1000X.

Al igual que en las colonias, las características morfológicas y tintoriales durante el ciclo celular de *N. gonorrhoeae* fueron iguales, sólo que durante el ciclo celular el citoplasma fue intensamente rosado y fue frecuente la observación del material morado de aspecto laxo y compacto. Estas observaciones en el ciclo celular, permiten mantener la idea de que estas estructuras correspondan al nucleóide bacteriano 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. Así pues el color morado presentado, sea a consecuencia de la interacción del complejo cristal violeta-yodo con ADN y ARN.

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, en el caso con ARNasa en algunos tiempos (19/175) el material morado no desapareció (figura 3). Se obtuvo asociación estadísticamente significativa ($p < 0,05$),

entre el color rosado intenso y la presencia del material morado con síntesis de ADN y ARN (tablas 1, 2).

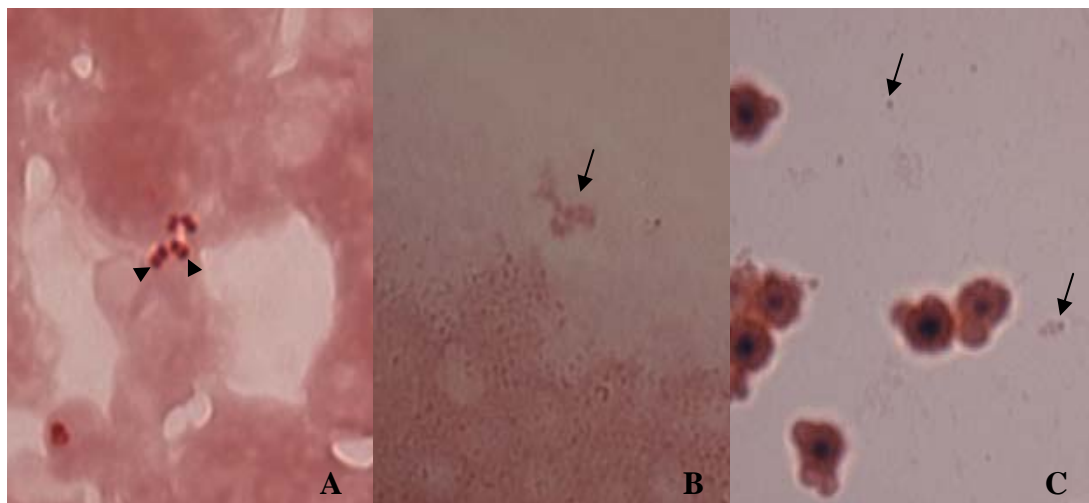


Figura 3., Fotomicrografías del ciclo celular de *Neisseria gonorrhoeae* antes y después del tratamiento enzimático por Gram. A) Antes del tratamiento enzimático, diplococos gramnegativos con material morado compacto (cabeza de flechas). B) Después del tratamiento enzimático con ADNasa, las células aclararon (flecha) C. Después del tratamiento enzimático con la enzima ARNasa, las células aclararon (flechas).1000X.

Tabla 1. Frecuencia de tiempos del ciclo celular de *Neisseria gonorrhoeae*, que contienen cocos aislados y diplococos con tinción rosado intenso o claro, por el método de Gram, antes y después del tratamiento enzimático con ADNasa y ARNasa.

Gram	Tratamiento							
	Antes	ADNasa Después			Antes	ARNasa Después		
		Sí	No	Total		Sí	No	Total
Rosado intenso	n 0 % 0,00	152 86,86	152 86,86	Sí n 2 % 1,14	150 85,71	152 86,86		
Rosado claro	n 0 % 0,00	23 13,14	23 13,14	No n 0 % 0,00	23 13,14	23 13,14		
Total	n 0 % 0,00	175 100	175 100	Total n 2 % 1,14	173 98,86	175 100		

Z= 12,25; p= 0,0001

Z= 12,18; 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

Tabla 2. Frecuencia de tiempos del ciclo celular de *Neisseria gonorrhoeae*, que contienen cocos aislados y diplococos con material morado o no en el citoplasma, teñidos por Gram, antes y después del tratamiento enzimático con ADNasa y ARNasa.

Material morado o no	Tratamiento								
	Antes	ADNasa			Antes	ARNasa			
		Después	Sí	No		Total	Después	Sí	No
Sí	n	1	161	162	Sí	n	19	143	162
	%	0,57	92,00	92,57		%	10,86	81,71	92,57
No	n	0	13	13	No	n	0	13	13
	%	0,00	7,43	7,43		%	0,00	7,43	7,43
Total	n	1	174	175	Total	n	19	156	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

Estos resultados permiten confirmar que el color morado está asociado a síntesis de ADN y ARN, cuyo mecanismo de tinción ya se ha mencionado. La tinción de Gram emplea la safranina como colorante de contraste y al igual que el cristal violeta tiene carga positiva, de modo que, puede interactuar con los ácidos nucleicos; esto explica la asociación de la coloración intensamente rosada entre el ADN y el ARN durante el ciclo celular. Se ha descrito que este aspecto tintorial se presenta en bacterias que se encuentran en crecimiento activo, en donde el protoplasma se tiñe más intensamente con los colorantes básicos (Brooks *et al.*, 2002).

Descripción morfotintorial por la tinción de fluorescencia modificada de *Neisseria gonorrhoeae* en los extendidos procedentes de colonias del agar GC

En los extendidos de las colonias de *N. gonorrhoeae* del medio GC teñidos por el método de fluorescencia modificada, se apreciaron cocos aislados y diplococos de diferentes tonalidades como anaranjado, amarillo y verde, en colonias menores a 0,5 hasta 1,0 mm de diámetro; siendo el color anaranjado el predominante, seguido del amarillo y escasamente el verde. La intensidad de fluorescencia para cada color fue variable (figura 4).

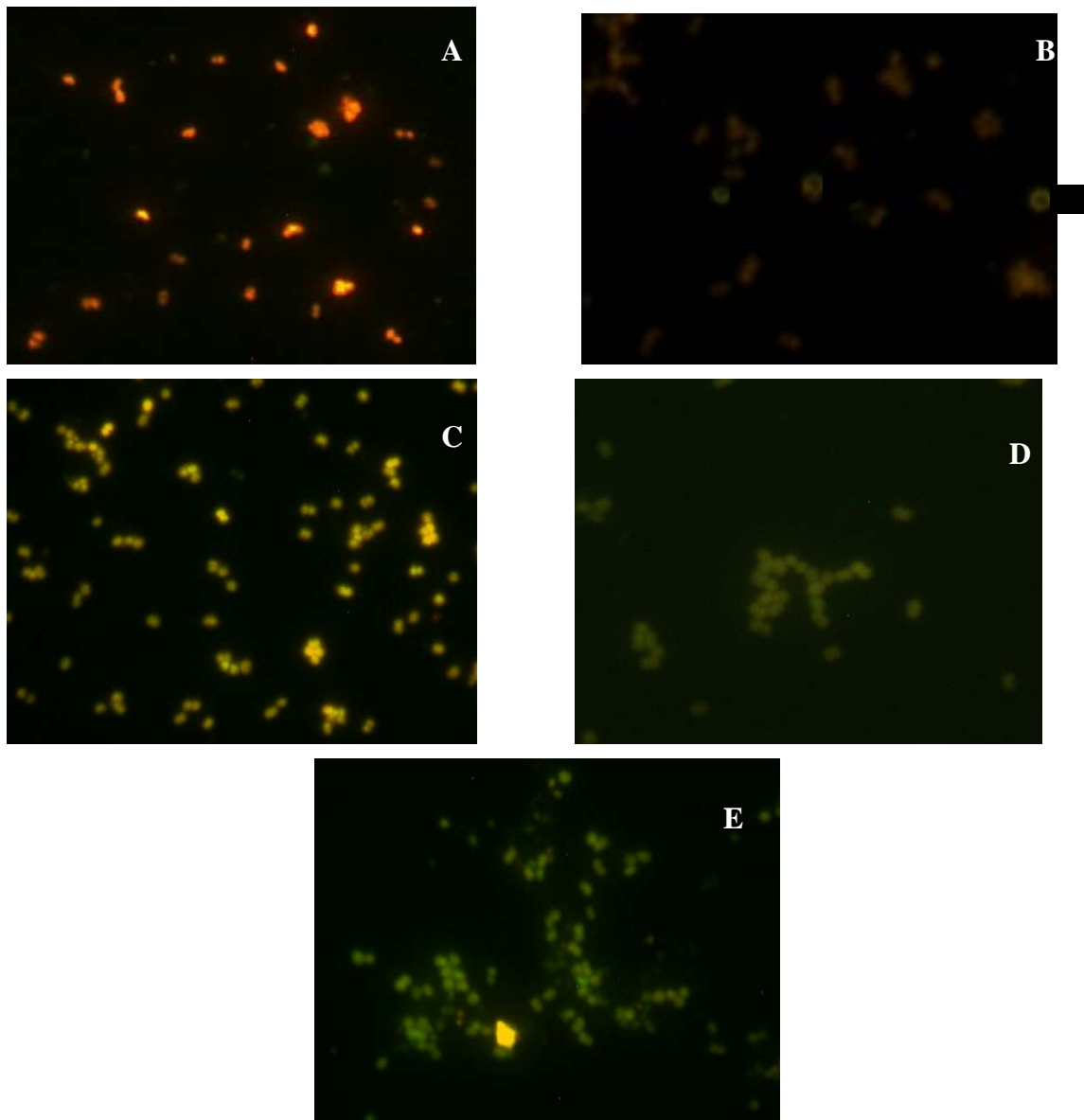


Figura 4. Fotomicrografías de extendidos de colonias del medio GC de *Neisseria gonorrhoeae*, coloreados por tinción de fluorescencia modificada. A) Cocos aislados y diplococos anaranjados fluorescentes. B) Cocos aislados y diplococos anaranjados ligeramente fluorescentes. C) Cocos aislados y diplococos amarillos fluorescentes. D) Cocos aislados y diplococos amarillos ligeramente fluorescentes. E) Cocos aislados y diplococos verdes fluorescentes y ligeramente fluorescentes. 1000X.

Estos resultados son similares a los obtenidos por Flores (2008), quien en un estudio, en el cual evaluó la tinción diferencial de fluorescencia modificada en el diagnóstico de gonorrea, en muestras perianales y uretrales, observó esta variación de tinción en las células de *N. gonorrhoeae* procedentes de colonias del medio GC, sólo que el aspecto

tintorial predominante fue el verde, y de forma moderada se visualizaron células anaranjadas y amarilla. Se sugiere que estas características tintoriales por fluorescencia representan estadios del ciclo celular bacteriano, asociada a las actividades de replicación y transcripción del ADN.

Está misma sugerencia fue dada por Flores *et al.* (2008), en el trabajo sobre comparación de la tinción de fluorescencia modificada y Gram, ellos explican que la emisión de fluorescencia anaranjada de los diplococos se puede explicar sobre la base de la naturaleza química del colorante naranja de acridina y mecanismo de tinción.

El naranja de acridina es un colorante catiónico y metacromático, que colorea ortocromáticamente al ADN, y le imparte color verde. Al ARN lo tiñe metacromáticamente de rojo. La coloración del ARN, probablemente, siga el principio general del mecanismo de metacromasia; cuando el naranja de acridina interactúa con una cadena simple en espiral aleatoria, como lo es el ARN, se une a casi todos los nucleótidos por su grupo fosfato de carga negativa, permitiendo el acercamiento entre las moléculas del colorante, de modo que, éstas interactúan y forman un polímero, produciendo una fluorescencia metacromática roja; la coloración del ADN, sin embargo, es más complicada; está bien establecido que hay dos procesos por los cuales el naranja de acridina se une al ADN: un proceso de unión fuerte, en el cual predomina un alto radio molar de fosfato del ADN al colorante; y un proceso de unión débil con menor radio molar; cuando los cationes del naranja de acridina se unen en la doble cadena de ADN, se intercala cada tercer par de bases púricas o pirimídicas y forman un complejo estable gracias a uniones iónicas y uniones dipolo-dipolo. En estas condiciones la distancia entre las moléculas es lo suficientemente grande para prevenir la interacción colorante-colorante, de forma que la fluorescencia que se obtiene es la de un monómero de naranja de acridina, con emisión de color verde (Rost, 1995).

En base a este mecanismo de tinción, Flores *et al.* (2008) propusieron que la coloración anaranjado fluorescente, probablemente, se deba a una síntesis activa de ARN, mientras

que el color amarillo puede estar relacionado con una síntesis no tan activa de ARN. Por otro lado, Albarado y Flores (2008), en el estudio sobre la evaluación diferencial de fluorescencia modificada en *Pseudomonas* spp. aisladas del suelo, sugirieron que el color verde fluorescente se deba a una síntesis activa de ADN.

Descripción morfotintorial por la tinción diferencial de fluorescencia modificada de *Neisseria gonorrhoeae* en el ciclo celular

Por fluorescencia durante el ciclo celular, el color predominante fue el anaranjado ligeramente fluorescente. La secuencia de color fue amarillo, anaranjado y verde (tabla 3 y figura 5).

Tabla 3. Reacción tintorial en *Neisseria gonorrhoeae* por la coloración diferencial de fluorescencia modificada a diferentes tiempos.

Tiempo (min)	Reacción tintorial por la coloración diferencial de fluorescencia modificada
0	Amarillo ligeramente fluorescente.
5	Anaranjado ligeramente fluorescente.
10	Anaranjado ligeramente fluorescente y anaranjado fluorescente.
15	Amarillo ligeramente fluorescente.
20-35	Anaranjado ligeramente e intensamente fluorescente, verde fluorescente (escaso).
40-50	Anaranjado ligeramente fluorescente.
55	Anaranjado fluorescente.
60	Verde ligeramente fluorescente (predominó), amarillo y anaranjado ligeramente fluorescente.
65-70	Amarillo y anaranjado ligeramente fluorescente.
75	Anaranjado ligeramente e intensamente fluorescente.
80-90	Verde, amarillo y anaranjado ligeramente fluorescente.
95	Anaranjado fluorescente.
100	Amarillo y anaranjado ligeramente fluorescente.
105-120	Anaranjado fluorescente.

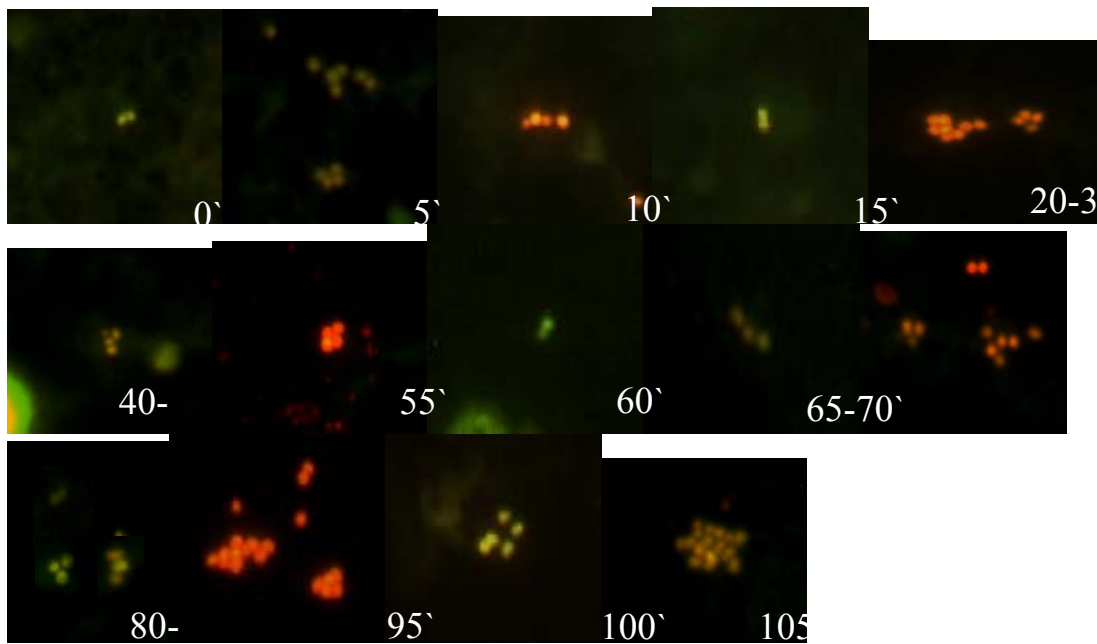


Figura 5. Fotomicrografías de extendidos del ciclo celular de *Neisseria gonorrhoeae*, por tinción de fluorescencia modificada. 1000X.

Del mismo modo que en las colonias, en el ciclo celular por tinción diferencial de fluorescencia modificada, se observó variación en color e intensidad de fluorescencia, confirmando, a través, de estas observaciones en el ciclo celular, que las variaciones de tinción representan fases del ciclo celular bacteriano, quizás asociadas a los mecanismo de replicación y transcripción del ADN; así las diferentes tonalidades encontradas se explican por el mecanismo de tinción del colorante naranja de acridina sobre el ADN y ARN como se explico en párrafos anteriores. Estas observaciones también se han reportado en otros géneros bacterianos como *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus* (Albarado y Flores, 2008; Flores *et al.*, 2008; Flores y Albarado, 2009a). Albarado y Flores (2008) proponen por primera vez un patrón de tinción por fluorescencia asociado a fases del ciclo celular bacteriano, sobre la base de que dicho ciclo comprende una secuencia de acontecimientos interconectados, como una fase C, caracterizada por la replicación del ADN cromosómico, una fase D determinada por el crecimiento celular, y por el control del ADN duplicado, que garantiza la seguridad del material cromosómico para comenzar el proceso de división, esta fase finaliza con la división celular; y la fase innominada, que es el período en el que ocurre

una activa síntesis de ARN y proteínas, además de otros componentes celulares. Ellos sugirieron, que el color verde correspondía a la fase C, y que dicho color se presentaba como producto de la intercalación del naranja de acridina al ADN. La tonalidad amarilla de baja fluorescencia, posiblemente, representara a la fase D e innominada, ya que observaron un incremento paulatino de la tonalidad amarilla a medida que transcurría el tiempo en el ciclo celular, así como también la presencia de estructuras redondas amarillas, las cuales sugirieron que se trataban de nucleoides donde se inicia el proceso de síntesis de ARN, y la tonalidad amarilla de baja fluorescencia se debe a una menor cantidad de ARN; por último la tonalidad anaranjada fluorescente, corresponda a la fase innominada en donde pueda existir un alto contenido de ARN y que al interactuar con el naranja de acridina se produzca dicho color.

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

En cuanto a la coloración de fluorescencia modificada, las células que se tiñeron de anaranjado o amarillo, después del tratamiento con ADNasa y ARNasa, aparecieron verdes ligeramente fluorescentes o fueron verdes casi imperceptibles.

Para determinar la asociación entre la reactividad tintorial por fluorescencia con síntesis de ADN y ARN, mediante la degradación con las enzimas ADNasa y ARNasa, se seleccionaron aquellos tiempos donde los cocos aislados y diplococos presentaron, exclusivamente, una intensidad de fluorescencia pre-tratamiento: amarillo ligera o intensamente fluorescente, y anaranjado ligera o intensamente fluorescente. En relación a la determinación de la asociación entre el color verde y la degradación enzimática de ADN y ARN, no pudo realizarse, como consecuencia de que no hubo un tiempo durante el ciclo celular, donde el color verde se presentara exclusivamente, también porque la observación de cocos aislados y diplococos verdes fluorescentes fue escasa. No obstante, los cocos aislados y diplococos amarillos y anaranjados, se observaron de color verde ligeramente fluorescente post-tratamiento enzimático, interfiriendo en el resultado real del análisis estadístico citado en Pértega y Pita (2004).

La poca frecuencia de tiempos con células verdes dentro del ciclo celular, pudo ser consecuencia de una superposición entre las fases, como producto del crecimiento bacteriano acelerado en el caldo BHI enriquecido con sangre, que le brinda mayor cantidad de nutrientes a la bacteria.

En el ciclo celular se obtuvo que un 72,04% (67/93) de los tiempos contenían células que se coloreaban de amarillo ligeramente fluorescente y post-tratamiento con ADNasa, en el 55,91% (52/93) de los tiempos, no se observaron células amarillo ligeramente fluorescente. Post-tratamiento ARNasa, en el 47,31% (44/93) de los tiempos, no se visualizaron células amarilla ligeramente fluorescente, existiendo asociación ($p < 0,05$) entre el color amarillo ligeramente fluorescente y síntesis de ADN y ARN (tabla 4).

Tabla 4. Frecuencia de tiempos del ciclo celular de *Neisseria gonorrhoeae*, con cocos aislados y diplococos amarillo ligeramente fluorescente, antes y después del tratamiento con la enzima ADNasa y ARNasa.

Amarillo (lf)	Tratamiento								
	ADNasa			ARNasa					
	Después			Después					
Antes	Sí	No	Total	Antes	Sí	No	Total		
Sí	n 15	52	67	Sí	n 23	44	67		
	% 16,13	55,91	72,04		% 24,73	47,31	72,04		
No	n 1	25	26	No	n 1	25	26		
	% 1,08	26,88	27,96		% 1,08	26,88	27,96		
Total	n 13	77	93	Total	n 24	69	93		
	% 13,98	82,80	100		% 25,81	74,19	100		
	Z= 6,87; p= 0,0001			Z= 6,26; p= 0,0001					

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

En 25,00% (8/32) se observaron células que se coloreaban de amarillo fluorescente y después del tratamiento con ADNasa y ARNasa, no se observaron células amarillo fluorescente, existiendo asociación ($p < 0,05$) entre el color amarillo fluorescente y síntesis de ADN y ARN (tabla 5).

Tabla 5. Frecuencia de tiempos del ciclo celular de *Neisseria gonorrhoeae*, con cocos

aislados y diplococos amarillo fluorescente, antes y después del tratamiento enzimático con ADNasa y ARNasa.

Amarillo (f)	Tratamiento							
	ADNasa				ARNasa			
	Antes	Después		Total	Antes	Después		Total
	Sí	No			Sí	No		
Sí	n 0	8	8	Sí	n 0	8	8	
	% 0,00	25,00	25,00		% 0,00	25,00	25,00	
No	n 0	24	24	No	n 0	24	24	
	% 0,00	92,31	92,31		% 0,00	92,31	92,31	
Total	n 0	32	32	Total	n 0	32	32	
	% 0,00	100	100		0,00	100	100	

Z= 2,47; p= 0,0133

Z= 2,47; p= 0,0133

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

En el 88,14% (52/59) de los tiempos, las células se colorearon anaranjado ligeramente fluorescente y después del tratamiento con ADNasa, en el 42,37% (25/59) de los tiempos no se visualizaron células anaranjada ligeramente fluorescente y post-tratamiento ARNasa, en el 66,10% (39/59) de los tiempos, no se observaron células anaranjada ligeramente fluorescente, existiendo asociación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el color anaranjado ligeramente fluorescente y síntesis de ADN y ARN (tabla 6).

Tabla 6. Frecuencia de tiempos del ciclo celular de *Neisseria gonorrhoeae*, con cocos aislados y diplococos anaranjado ligeramente fluorescente, antes y después del tratamiento enzimático con ADNasa y ARNasa.

Anaranjado (lf)	Tratamiento							
	ADNasa				ARNasa			
	Antes	Después		Total	Antes	Después		Total
	Sí	No			Sí	No		
Sí	n 27	25	52	Sí	n 13	39	52	
	% 45,76	42,37	88,14%		% 22,03	66,10	88,14	
No	n 2	5	7	No	n 0	7	7	
	% 3,39	8,47	11,86%		% 0,00	11,86	11,86	
Total	n 29	30	59	Total	n 13	46	59	
	% 47,46	50,85	100		22,03	77,97	100	

Z= 4,23; p= 0,0001

Z= 6,09; p= 0,0001

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

El 64,71% (11/17) de los tiempos contenían células que se coloreaban de anaranjado fluorescente y después del tratamiento con ADNasa y ARNasa, en el 58,82% (10/17) de los tiempos con las enzimas no se visualizaron células anaranjada fluorescente, existiendo asociación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el color anaranjado fluorescente y síntesis de ADN y ARN (tabla 7).

Tabla 7. Frecuencia de tiempos del ciclo celular de *Neisseria gonorrhoeae*, con cocos aislados y diplococos anaranjado fluorescente, antes y después del tratamiento enzimático con ADNasa y ARNasa.

Anaranjado (f)	Tratamiento							
	Antes	ADNasa Después			Total	Antes	ARNasa Después	
	n	Sí	No		n	Sí	No	Total
Sí	11	1	10	11	11	1	10	11
	%	5,88	58,82	64,71	%	5,88	58,82	64,71
No	6	0	6	6	6	0	6	6
	%	0,00	35,29	35,29	%	0,00	35,29	35,29
Total	17	1	16	17	17	1	16	17
	%	5,88	94,12	100	%	5,88	94,12	100

Z= 3,00; p= 0,0044

Z= 3,00; p= 0,0044

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

En relación a la coloración de fluorescencia, se ha sugerido que los cambios de color representan fases del ciclo celular bacteriano, asociando, principalmente, el color anaranjado a una síntesis activa de ARN (Flores *et al.*, 2008). En esta investigación se obtuvo que en un alto número de tiempos (49) se observaron células anaranjadas con intensidad de fluorescencia variable, asociado a la síntesis de ARN, aunque, también en un menor número de tiempos (35), se observó que desapareció el color anaranjado después del tratamiento con ADNasa, encontrándose igualmente, asociación con síntesis de ADN.

El ADN induce metacromasia, cuando el polímero de doble cadena cambia a cadena simple (Pal y Ghosh, 1973). En los procesos de síntesis de ADN y ARN, hay tres momentos en donde el ADN puede estar en la configuración de cadena simple. En la

replicación a nivel del origen de replicación, el ADN de doble cadena se convierte en ADN de cadena simple, al romperse los enlaces de hidrógeno por la acción de proteínas y enzimas. En la transcripción, en la etapa de iniciación se forma la burbuja de transcripción, en la cual se produce un desenrollamiento de la molécula de ADN en aproximadamente 20 pares de base, y en la terminación de la transcripción, se produce el desenrollamiento del complejo ARNm-ADN por el factor rho (ρ) (Prescott *et al.*, 2008). Es posible que, cuando el naranja de acridina interactúa con el ADN, lo esté haciendo con cadenas simples de ADN, de allí la asociación, entre el color anaranjado con la degradación enzimática del ADN.

Descripción de las características morfológicas del nucleoide por las tinción de Feulgen y 4',6-diamidino-2'-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI) en el ciclo celular de *Neisseria gonorrhoeae*

Por la coloración de Feulgen, el material genético se observó de color púrpura de forma redonda, pero estas se encontraron ocupando parcial o totalmente el citoplasma de los cocos aislados y diplococos (figura 6).

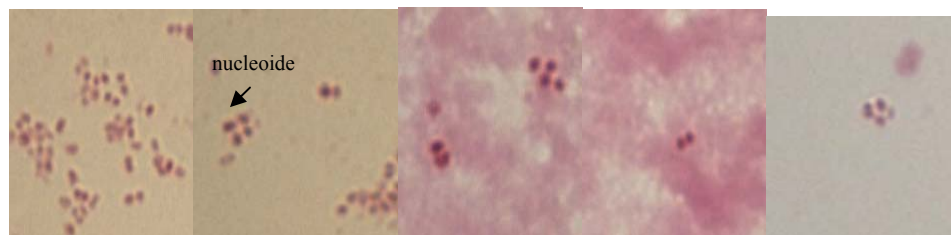


Figura 6. Fotomicrografías de extendidos de *Neisseria gonorrhoeae*, teñidos por Feulgen. 1000X.

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 material genético 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 células aisladas

(figura 7).

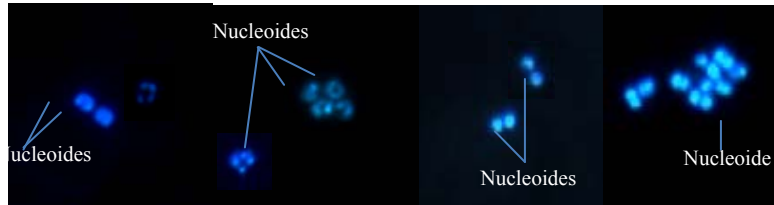


Figura 7. Fotomicrografías de extendidos del ciclo celular de *Neisseria gonorrhoeae*, coloreados con 4',6-diamidino-2'-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI). 1000X.

La observación de más de un nucleoide en la célula cocal es el reflejo de la rapidez del proceso de síntesis de ADN. Tobiasson y Seifert (2006), 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. 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.

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

Al comparar morfológicamente el material morado visto por Gram con el ADN coloreado por DAPI en cocos aislados y diplococos, se distingue similitud en forma, aspecto, tamaño y distribución (figura 8).

Al establecer relación entre la reactividad tintorial por los métodos de coloración Gram y DAPI, 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, estuvo asociado con la reacción positiva del colorante específico para ADN, DAPI (tabla 8). Demostrando, morfológicamente, que corresponden al nucleóide bacteriano.

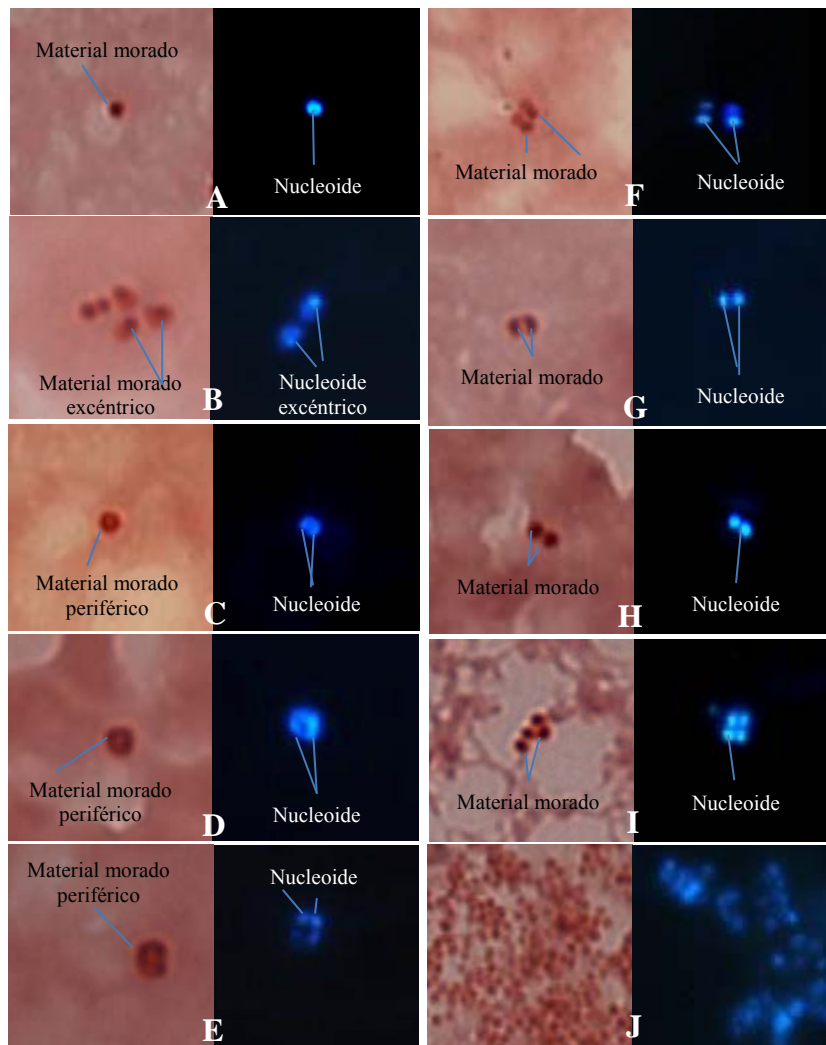


Figura 8. Fotomicrografías de cocos aislados y diplococos a partir del ciclo celular de *Neisseria gonorrhoeae*, coloreados con Gram y 4',6-diamidino-2'-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI). A-E) cocos aislados. F-J) Diplococos. Nótese que el material morado en cocos aislados y diplococos coloreados por Gram, tiene similar forma, aspecto, 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. 1000x.

Tabla 8. Frecuencia de tiempos del ciclo celular de *Neisseria gonorrhoeae*, que contienen cocos aislados y diplococos con material morado o no en el citoplasma, teñidos por Gram, y reactividad tintorial con 4',6-diamidino-2'-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI).

Gram		DAPI		Total
Material morado		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

El control grampositivo *S. aureus* ATCC 25923 y el gramnegativo *E. coli* ATCC 25922, mostraron el mismo patrón tintorial de fluorescencia, que los desarrollados en *N. gonorrhoeae*, durante el ciclo celular. Se halló asociación estadísticamente significativa entre la reacción grampositiva y gramnegativa, así como la tonalidad amarilla y anaranjada con síntesis de ADN y ARN; a continuación se detallan los aspectos morfotintoriales para cada control en las coloraciones empleadas y sus asociaciones.

Descripción morfotintorial por Gram de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en los extendidos de colonias del medio manitol salado y ciclo celular

Por la coloración de Gram se observaron cocos aislados, en pares y racimos grampositivos, tanto en las colonias como en el ciclo celular. Sólo a los 20 min del ciclo, aparte de observarse cocos aislados y en pares grampositivos, se presentaron cocos en pares con doble tinción, una célula del par grampositivo y la otra gramnegativa (figura 9).

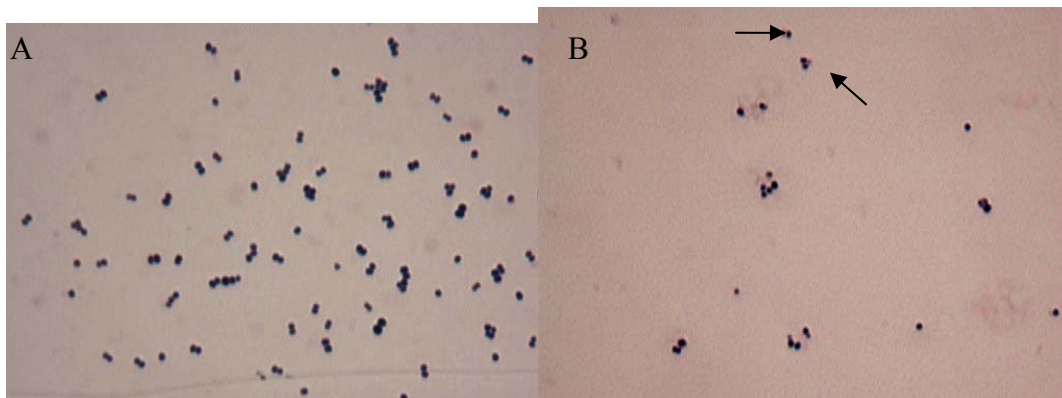


Figura 9. Fotomicrografías de extendidos de colonias y ciclo celular de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, por coloración de Gram. A) Cocos aislados y en pares grampositivos. B) cocos con doble tinción, una célula del par grampositivo y la otra gramnegativa (flechas). 1000X.

Asociación entre las característica tintorial por la coloración de Gram y fluorescencia modificada con síntesis de ADN y ARN, en el ciclo celular de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Post-tratamiento de ADNasa en las colonias, desaparece la tinción morada, observándose cocos aislados, en pares y racimos gramnegativos; en el ciclo celular, las células fueron rosado muy claro y casi imperceptibles (figura 10). Post-tratamiento ARNasa en las colonias, así como en todos los tiempos del ciclo celular prevalecieron cocos aislados, en pares y racimos, con doble tinción (figura 11), hallándose asociación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el color morado observado en los cocos grampositivos y síntesis de ADN y ARN (tabla 9).

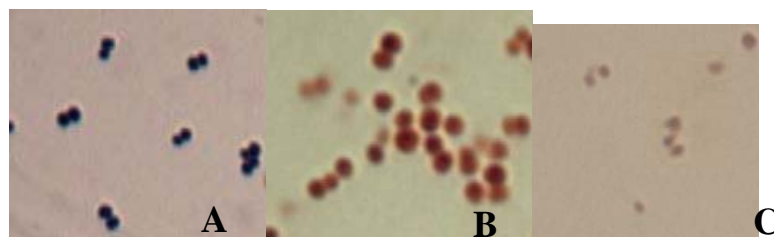


Figura 10. Fotomicrografías de extendidos de colonias y ciclo de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, post-tratamiento ADNasa, coloreados por Gram. A) Antes del tratamiento enzimático los cocos fueron grampositivos. B) Luego del tratamiento los cocos de las colonias aparecieron gramnegativos. C) Después del tratamiento enzimático, en el ciclo celular se observaron cocos rosados muy claros. 1000X.

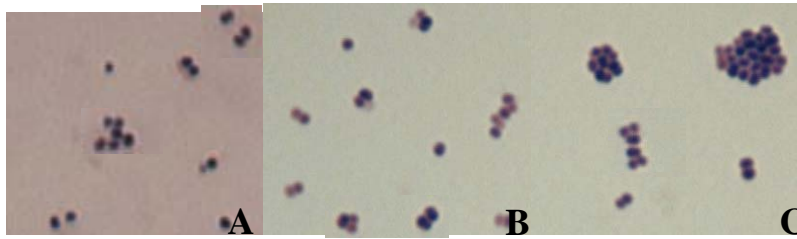


Figura 11. Fotomicrografías de extendidos de colonias y ciclo de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, post-tratamiento ARNasa, coloreados por Gram. A) Antes del tratamiento: cocos grampositivos. B-C) Después del tratamiento enzimático, los cocos se observaron con doble tinción grampositivo-gramnegativo.1000X.

Tabla 9. Frecuencia de tiempos con cocos grampositivos, antes y después del tratamiento enzimático con ADNasa y ARNasa, en el ciclo celular de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Cocos grampositivos	Tratamiento								
	ADNasa				ARNasa				
	Antes	Después		Total	Antes	Después		Total	
	Sí	No			Sí	No			
Sí	n	0	25	25	Sí	n	0	25	25
	%	0,00	100	100		%	0,00	100	100
No	n	0	0	0	No	n	0	0	0
	%	0,00	0,00	0,00		%	0,00	0,00	0,00
Total	n	0	25	25	Total	n	0	25	25
	%	0,00	100	100		%	0,00	100	100

Z= 4,80; p= 0,0001

Z= 4,80; 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

Descripción morfotintorial por la coloración de fluorescencia modificada en colonias del medio manitol salado y ciclo celular de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Por fluorescencia, en las colonias se observaron, frecuentemente, cocos en pares y racimos anaranjado fluorescente (figura 12).

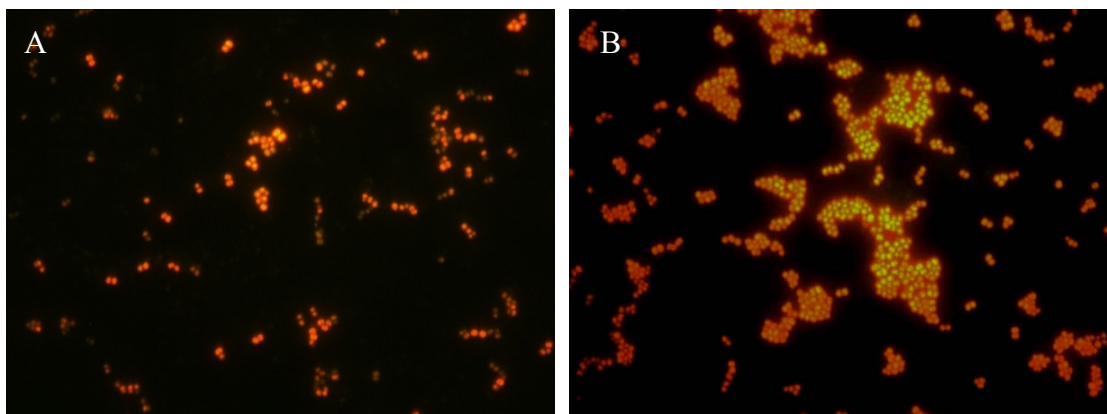


Figura 12. Fotomicrografías de colonias de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, por tinción de fluorescencia modificada. A-B. Cocos en pares y racimos anaranjado fluorescente. 1000X.

En el ciclo celular los colores presentados principalmente, fueron amarillo ligeramente fluorescente y anaranjado fluorescente (tabla 10 y figura 13).

Tabla 10. Reacción tintorial en *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 por la coloración diferencial de fluorescencia modificada a diferentes tiempos.

Tiempo (min)	Reacción tintorial por la coloración diferencial de fluorescencia modificada
0-5	Verde y anaranjado ligeramente fluorescente.
10	Anaranjado fluorescente.
15-25	Amarillo ligeramente fluorescente.
30	Anaranjado fluorescente.
35	Verde ligeramente fluorescente.
40-45	Amarillo ligeramente e intensamente fluorescente.
50-65	Anaranjado fluorescente.
70	Amarillo ligeramente fluorescente.
75	Anaranjado fluorescente.
80	Amarillo ligeramente fluorescente.
85-90	Anaranjado ligeramente fluorescente.
95-100	Amarillo ligeramente fluorescente.
105	Anaranjado fluorescente.
110-120	Amarillo ligeramente fluorescente.

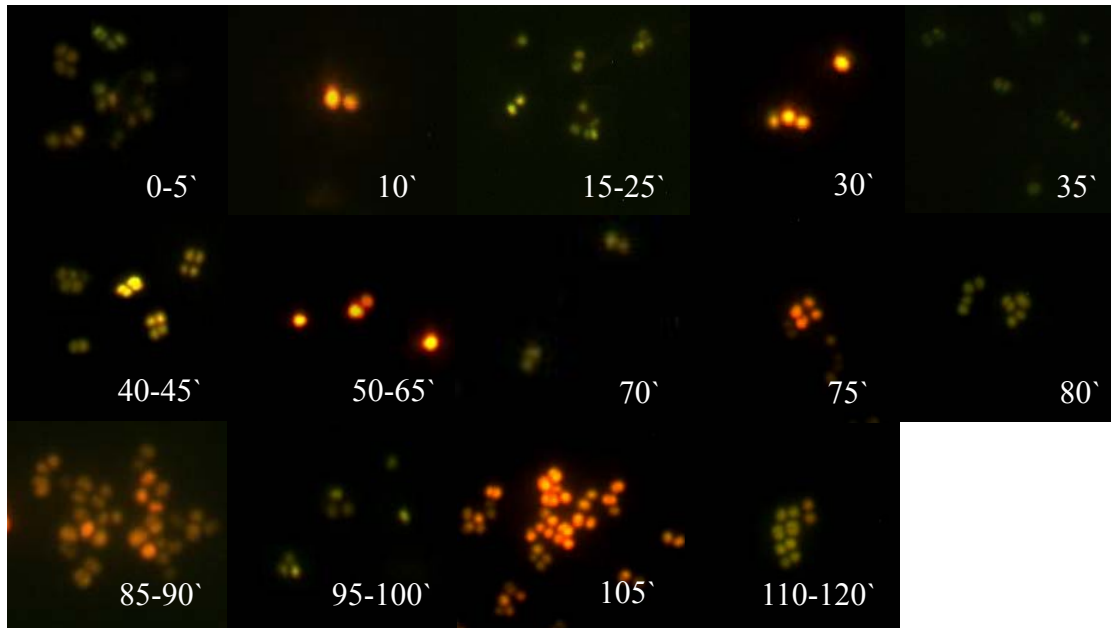


Figura 13. Fotomicrografías de extendidos del ciclo celular de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, por tinción de fluorescencia modificada. 1000X.

Asociación entre las características tintoriales por la coloración fluorescencia modificada con síntesis de ADN y ARN, en las distintas etapas del ciclo celular de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Por fluorescencia, post-tratamiento con ADNasa, las bacterias de color inicialmente amarillo ligeramente fluorescente, cambiaron a anaranjado ligeramente fluorescente y las anaranjadas fluorescentes cambiaron a anaranjado ligeramente fluorescente. Post-tratamiento ARNasa, las bacterias amarillas ligeramente fluorescentes, no presentaron cambio y las anaranjadas fluorescentes cambiaron a anaranjado o verde ligeramente fluorescente. Se halló asociación estadísticamente significativa ($p < 0,05$), entre las tonalidades amarillo ligeramente fluorescente, anaranjado ligeramente fluorescente y fluorescente con síntesis de ADN. Asimismo, entre la tinción anaranjado fluorescente con síntesis de ARN, y no ($p > 0,05$), entre los colores amarillo y anaranjado ligeramente fluorescente con síntesis de ARN (tablas 11, 12 y 13).

Tabla 11. Frecuencia de tiempos con cocos amarillo ligeramente fluorescente, antes y después del tratamiento enzimático con ADNasa y ARNasa, en el ciclo celular de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Amarillo (lf)	Tratamiento								
	ADNasa				ARNasa				
	Antes	Después		Total	Antes	Después		Total	
	Sí	No			Sí	No			
Sí	n	5	15	20	Sí	n	18	2	20
	%	20,0	60,00	80,00		%	72,00	8,00	80,00
No	n	1	4	5	No	n	1	4	5
	%	4,00	16,00	20,00		%	4,00	16,00	20,00
Total	n	6	31	25	Total	n	19	6	25
	%	24,0	66,00	100		%	76,00	24,00	100
		0							

Z= 3,25; p= 0,0012

Z= 0,00; p= 1,0000

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

Tabla 12. Frecuencia de tiempos con cocos anaranjado ligeramente fluorescente, antes y después del tratamiento enzimático con ADNasa y ARNasa, en el ciclo celular de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Anaranjado (lf)	Tratamiento								
	ADNasa				ARNasa				
	Antes	Después		Total	Antes	Después		Total	
	Sí	No			Sí	No			
Sí	n	10	1	11	Sí	n	11	0	11
	%	40,00	4,00	44,00		%	44,00	0,00	44,00
No	n	12	2	14	No	n	4	10	14
	%	48,00	8,00	56,00		%	16,00	40,00	56,00
Total	n	22	3	25	Total	n	15	10,00	25
	%	88,00	12,00	100		%	60,00	40,00	100

Z= 2,77; p= 0,0055

Z= 1,50; p= 0,1336

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

Tabla 13. Frecuencia de tiempos con cocos anaranjado fluorescente, antes y después del tratamiento enzimático con ADNasa y ARNasa, en el ciclo celular de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Anaranjado (f)	Tratamiento								
	Antes	ADNasa Después		Total	Antes	ARNasa Después		Total	
Sí	n	2	12	14	Sí	n	1	13	14
	%	8,00	48,00	56,00		%	4,00	52,00	56,00
No	n	2	9	11	No	n	2	9	11
	%	8,00	36,00	44,00		%	8,00	36,00	44,00
Total	n	4	21	25	Total	n	3	22	25
	%	16,00	84,00	100		%	12,00	88,00	100

Z= 2,41; p= 0,0162

Z= 2,58; p= 0,0098

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

Descripción de las características morfológicas del nucleóide por las tinciones diferencial de fluorescencia modificada, 4',6-diamidino-2'-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI) y Feulgen, en el ciclo celular de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Por la coloración de Gram, los cocos se observaron grampositivos; mediante la coloración diferencial de fluorescencia modificada, se observaron mayormente anaranjado fluorescente y con abundantes células anaranjada completamente fluorescente (figuras 14A y 14B).

Las células, mediante la tinción de DAPI, se observaron teñidas completamente de azul fluorescente y post-tratamiento ADNasa, no se observaron bacterias o fueron de color blanco-grisáceo, es decir, DAPI negativo, significando que todo su citoplasma está ocupado por ADN (figuras 14C y 14D).

Por la coloración de Feulgen, los cocos se visualizaron parcial o completamente fucsia, mostrando que su citoplasma está ocupado por ADN (figura 14E).

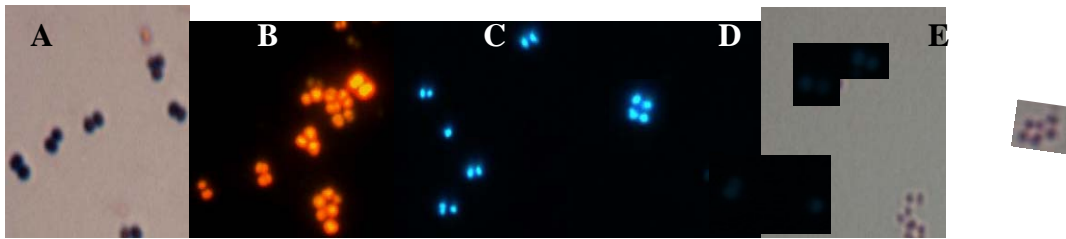


Figura 14. Fotomicrografías de las características tintoriales de extendidos de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, por diferentes coloraciones. A) Coloración de Gram. B) Coloración de fluorescencia modificada. C) Coloración de DAPI sin tratamiento. D). Coloración de DAPI con tratamiento enzimático con ADNasa. E) Coloración de Feulgen. 1000X.

Descripción morfotintorial por Gram de *Escherichia coli* ATCC 25922 en colonias del medio McConkey y ciclo celular

A partir de las colonias de *E. coli* ATCC 25922, se observaron bacilos gramnegativos con estructuras redondas moradas con diámetro promedio de $0,48 \pm 0,14 \mu\text{m}$, así como un material morado difuso a lo largo del citoplasma de la célula (figura 15).

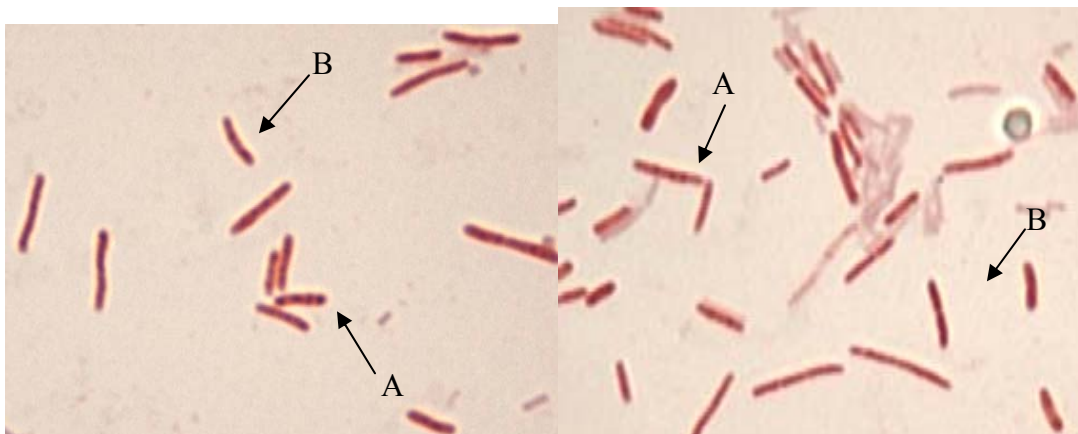


Figura 15. Fotomicrografías de extendidos de colonias del medio MacConkey de *Escherichia coli* 25922, coloreados por Gram. A) Bacilos gramnegativos con estructuras redondas moradas en su interior (flechas). B) Bacilos gramnegativos con material difuso en el citoplasma (flechas). 1000X.

Durante el ciclo celular los bacilos presentaron citoplasma de color rosado claro a rosado intenso, con la observación de estructuras redondas moradas de forma laxa o compacta, las cuales presentaron un diámetro promedio de $0,48 \pm 0,12 \mu\text{m}$. Por otra parte, cuando se

encontraban en número de uno, se ubicaban en la parte media del bacilo y cuando se observaron dos, se distribuían hacia los polos de la célula (figura 16 y tabla 14).

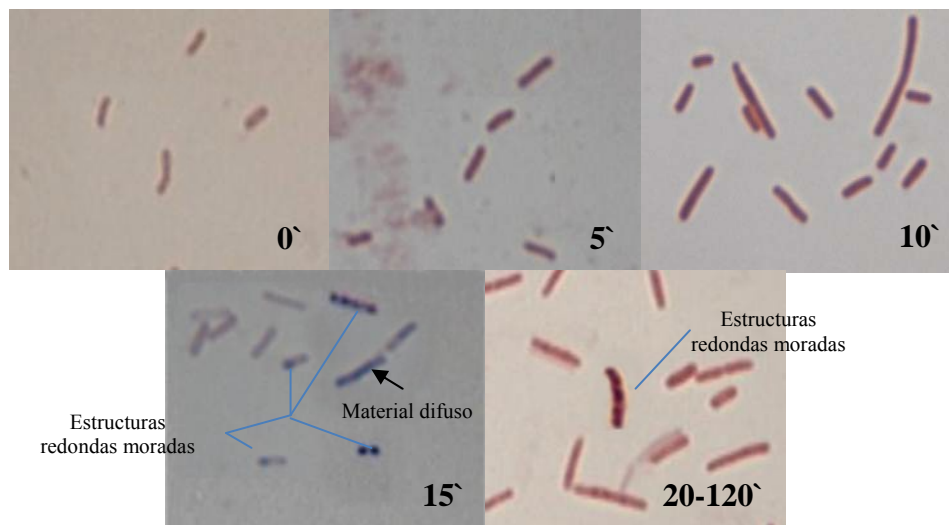


Figura 16. Fotomicrografías de extendidos de los diferentes tiempos del ciclo celular de *Escherichia coli* ATCC 25922, coloreados por Gram. Se muestran las estructuras redondas moradas en número de 1 y 2 en los extremos ó 4-5, y el material morado difuso en el citoplasma 1000x.

Tabla 14. Reacción tintorial en *Escherichia coli* ATCC 25922 por la coloración de Gram a diferentes tiempos.

Tiempo (min)	Reacción tintorial por la coloración de Gram
0	Bacilos gramnegativos de color rosado claro.
5	Bacilos gramnegativos de color rosado fuerte y se observó un material morado distribuido de forma difusa a lo largo del citoplasma celular.
10	Bacilos gramnegativos de color rosado intenso.
15	Bacilos grampositivos y gramnegativos, en éste último el rosado fue claro con estructuras moradas redondas en número de 1 a 4 en el citoplasma.
20-120	Bacilos gramnegativos de color rosado intenso y observación de estructuras redonda morada en número de 1 a 6 y material morado difuso a lo largo del citoplasma.

Asociación entre las características tintoriales por la coloración Gram con síntesis de ADN y ARN, en el ciclo celular de *Escherichia coli* ATCC 25922

Post-tratamiento enzimático con ADNasa, los bacilos se presentaron, principalmente, rosado claro y no se observaron las estructuras moradas en el citoplasma (tabla 15 y

figura 17). Post-tratamiento con ARNasa durante el ciclo celular los bacilos fueron rosado claro, con o sin material morado difuso en el citoplasma (tabla 16 y figura 18).

Tabla 15. Reacción tintorial en *Escherichia coli* ATCC 25922 por la coloración de Gram post-tratamiento con ADNasa.

Tiempo (min)	Reacción tintorial por la coloración de Gram post-tratamiento con ADNasa
0-15	Bacilos intensamente rosados, sin apreciación de las estructuras moradas redondas y del material difuso morado en el citoplasma.
20-35	Bacilos rosado claro, desapareció el color rosado intenso antes del tratamiento y no se observaron las estructuras moradas en el citoplasma.
40-50	Bacilo rosado claro, desapareció el color morado de las estructuras redondas.
55-120	Bacilos rosados muy claro, sin estructuras redondas ni material morado difuso en el citoplasma.



Figura 17. Fotomicrografías de extendidos del ciclo celular de *Escherichia coli* ATCC 25922 post-tratamiento enzimático con ADNasa, coloreados por Gram. 1000X.

Tabla 16. Reacción tintorial en *Escherichia coli* ATCC 25922 por la coloración de Gram post-tratamiento con ARNasa.

Tiempo (min)	Reacción tintorial por la coloración de Gram post-tratamiento con ARNasa
0-15	Bacilos con citoplasma rosado claro, y estructuras redondas moradas.
20-30	Bacilos rosados muy claros, sin estructuras redondas, ni material difuso morado en el citoplasma.
35	Bacilos grampositivos, gran parte del citoplasma morado y borde rosado.
40-45	Bacilos rosados claros, sin estructuras redondas, ni material morado difuso en el citoplasma.
50-70	Bacilos con citoplasma parcialmente morado.
75-95	Bacilos rosados claros, sin estructuras y material morado.
100-120	Bacilos rosados claros con estructuras redondas y material morado difuso en el citoplasma.

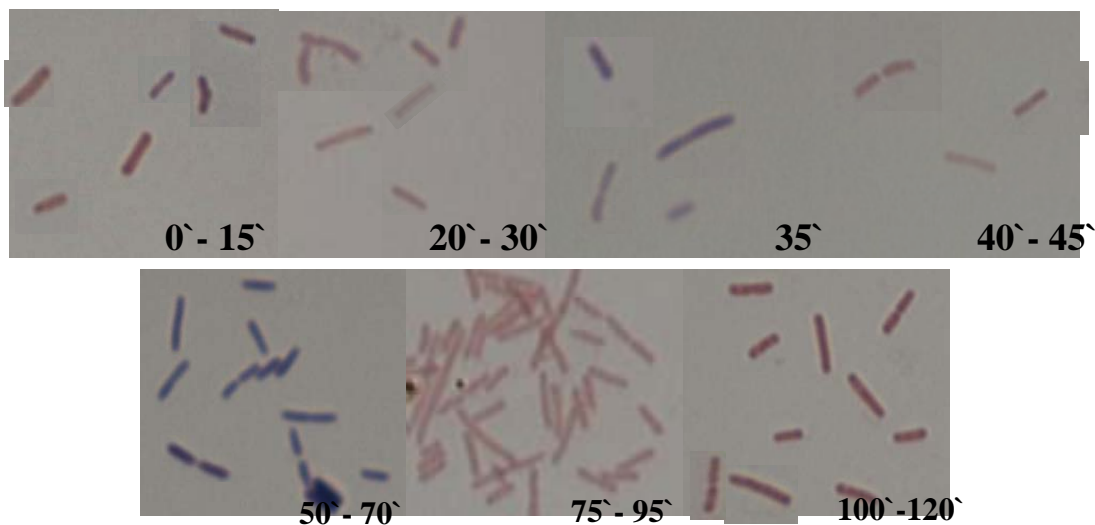


Figura 18. Fotomicrografías de extendidos del ciclo celular de *Escherichia coli* ATCC 25922 post-tratamiento con la enzima ARNasa, coloreados por Gram. 1000X.

Al determinar la asociación entre la variación de la intensidad del color rosado, se obtuvo que el color rosado oscuro estuvo asociado significativamente ($p < 0,05$) a la síntesis de ADN y ARN. Del mismo modo, hubo asociación entre el color morado presentado por las estructuras redondas y material difuso en el citoplasma de los bacilos, con contenido de ADN y ARN (tablas 17 y 18).

Tabla 17. Frecuencia de tiempos con bacilos gramnegativos de intensidad variable, antes y después del tratamiento enzimático con ADNasa y ARNasa, en el ciclo celular de *Escherichia coli* ATCC 25922.

Bacilos gramnegativos	Tratamiento							
	ADNasa Después				ARNasa Después			
	Antes	Oscuro	Claro	Total	Antes	Oscuro	Claro	Total
Oscuro	n 5	18	23	92,00	Oscuro	n 2	21	23
	% 20,00	72,00				% 8,00	84,00	92,00
Claro	n 1	1	2	8,00	Claro	n 0	2	2
	% 4,00	4,00				% 0,00	8,00	8,00
Total	n 6	19	25	100	Total	n 2	23	25
	% 24,00	76,00				% 8,00	92,00	100

Z= 3,67; p= 0,0002

Z= 4,37; 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

Tabla 18. Frecuencia de tiempos con bacilos gramnegativos que presentaron o no

estructuras redondas y material morado difuso en el citoplasma, antes y después del tratamiento enzimático con ADNasa y ARNasa, en el ciclo celular de *Escherichia coli* ATCC 25922.

Estructuras y material morado	Tratamiento							
	ADNasa Después				ARNasa Después			
Antes	Presente	Ausente	Total	Antes	Presente	Ausente	Total	
Presente	n 4	20	24	Presente n 14	14	10	24	
	% 16,00	80,00	96,00	% 56,00	40,00	96,00		
Ausente	n 0	1	1	Ausente n 0	0	1	1	
	% 0,00	4,00	4,00	% 0,00	4,00	4,00		
Total	n 4	21	25	Total n 14	14	11	25	
	% 16,00	84,00	100	% 56,00	44,00	100		

Z= 4,25; p= 0,0001

Z= 2,85; p= 0,0044

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

Descripción morfotintorial por la tinción diferencial de fluorescencia modificada de *Escherichia coli* ATCC 25922 en colonias y ciclo celular

Por fluorescencia, a partir de las colonias del medio MacConkey los bacilos se observaron, anaranjado y verde ligeramente fluorescente, principalmente (figura 19).



Figura 19. Fotomicrografías de extendidos de colonias de *Escherichia coli* 25922, teñidos por fluorescencia modificada. Bacilos verde y anaranjado ligeramente fluorescente. 1000X.

Durante el ciclo celular por fluorescencia, la reactividad tintorial presentada, principalmente, fue amarillo fluorescente y anaranjado ligeramente fluorescente (figura 20 y tabla 19).

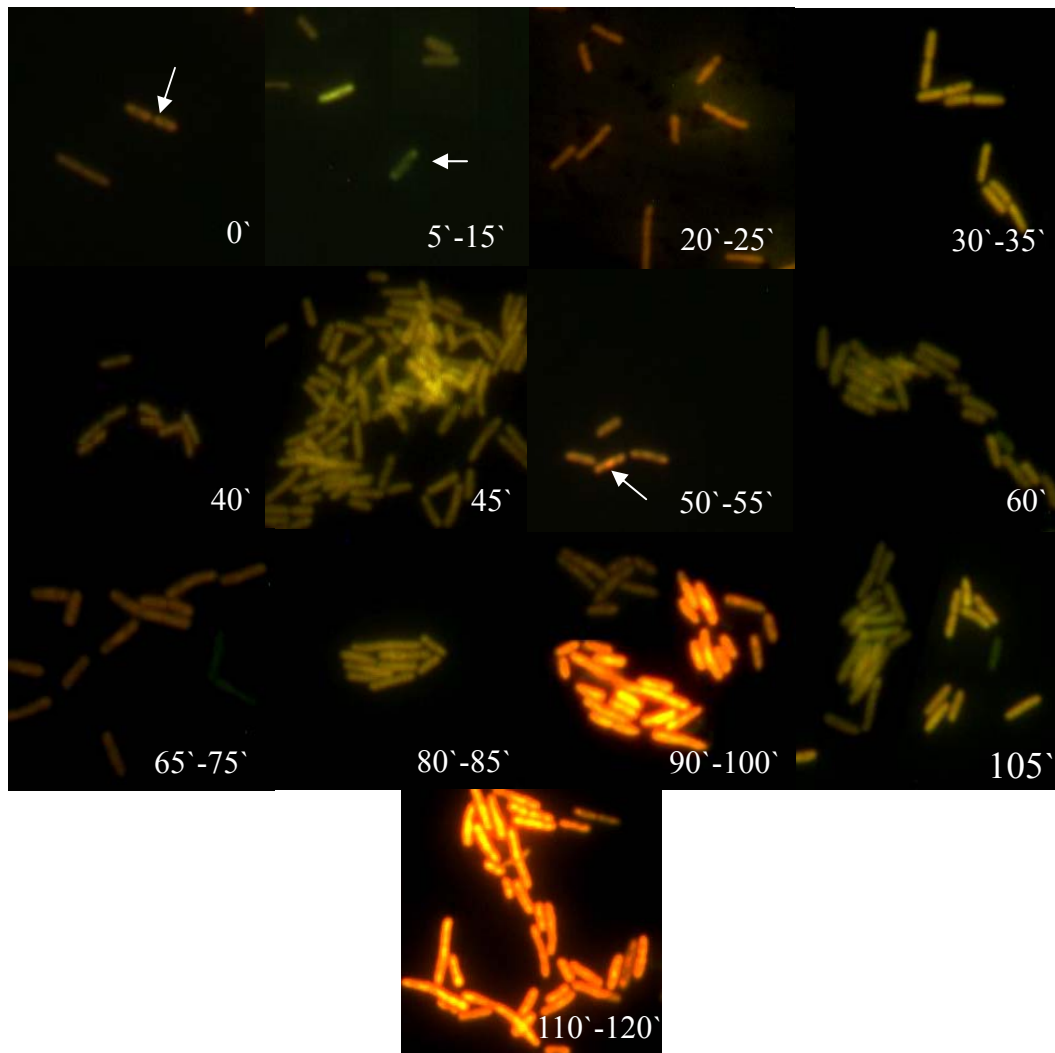


Figura 20. Fotomicrografías de las características tintoriales por tinción de fluorescencia modificada del ciclo celular de *Escherichia coli* ATCC 25922. Las flechas señalan las estructuras redondas ubicadas en el centro o extremos de la bacteria en número de 1-4. 1000X.

Tabla 19. Reacción tintorial en *Escherichia coli* ATCC 25922 por la coloración de fluorescencia modificada.

Tiempo (min)	Reacción tintorial por la coloración diferencial de fluorescencia modificada
0	Anaranjado ligeramente fluorescente.
5-15	Amarillo ligeramente fluorescente con estructuras redondas del mismo color en número de 1 a 4.
20-25	Bacilos anaranjado ligeramente fluorescente.
30-35	Bacilo amarillo fluorescente con estructuras redondas ubicadas en los extremos.
40	Bacilo anaranjado ligeramente fluorescente con estructuras redondas en número 1 a 2.
45	Bacilo amarillo fluorescente.
50-55	Bacilo anaranjado ligeramente fluorescente con estructuras redondas anaranjada fluorescente en número de 2 a 4.
60	Amarillo fluorescente con 2 a 4 estructuras redondas en el citoplasma.
65-75	Bacilo anaranjado ligeramente e intensamente fluorescente, con estructuras redondas.
80-85	Bacilo amarillo fluorescente.
90-100	Bacilo anaranjada ligeramente e intensamente fluorescente, con estructuras redondas.
105	Bacilo amarillo fluorescente.
110-120	Bacilo anaranjado fluorescente con 2 ó 4 estructuras redondas anaranjada fluorescente.

Asociación entre las características tintoriales por la coloración fluorescencia modificada con síntesis de ADN y ARN, en el ciclo celular de *Escherichia coli* ATCC 25922

Con respecto a la tinción de fluorescencia modificada, los bacilos inicialmente teñidos de anaranjado o amarillo ligeramente fluorescentes o fluorescentes en el ciclo celular, se observaron post-tratamiento con ADNasa anaranjado ligeramente fluorescente, mientras que con post-tratamiento ARNasa fueron verdes ligeramente fluorescentes. Se halló asociación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre los colores amarillo fluorescente y anaranjado ligeramente fluorescentes y fluorescentes con síntesis de ADN, mientras que sólo hubo asociación ($p < 0,05$) entre las tonalidades amarillo y anaranjado

fluorescentes con síntesis de ARN, y no ($p>0,05$), con la tinción anaranjado ligeramente fluorescente y síntesis de ARN (tablas 20, 21 y 22).

Tabla 20. Frecuencia de tiempos con bacilos amarillos fluorescentes, antes y después del tratamiento con la enzima ADNasa y ARNasa, en el ciclo celular de *Escherichia coli* ATTC 25922.

Amarillo (f)	Tratamiento								
	Antes	ADNasa Después			Total	Antes	ARNasa Después		
		Sí	No	Total			Sí	No	Total
Sí	n	0	11	11	Sí	n	0	11	11
	%	0,00	44,00	44,00		%	0,00	44,00	44,00
No	n	0	14	14	No	n	0	14	14
	%	0,00	56,00	56,00		%	0,00	56,00	56,00
Total	n	0	25	25	Total	n	0	25	25
	%	0,00	100	100		%	0,00	100	100

Z= 3,01; p= 0,0026

Z= 3,01; p= 0,0026

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

Tabla 21. Frecuencia de tiempos con bacilos anaranjados ligeramente fluorescentes, antes y después del tratamiento enzimático con ADNasa y ARNasa, en el ciclo celular de *Escherichia coli* ATTC 25922.

Anaranjado (lf)	Tratamiento								
	Antes	ADNasa Después			Total	Antes	ARNasa Después		
		Sí	No	Total			Sí	No	Total
Sí	n	10	3	13	Sí	n	0	13	13
	%	40,00	12,00	52,00		%	0,00	52,00	52,00
No	n	12	0	12	No	n	12	0	12
	%	48,00	0,00	48,00		%	48,00	0,00	48,00
Total	n	22	3	25	Total	n	12	13	25
	%	88,00	12,00	100		%	48,00	52,00	100

Z= 2,0,7; p= 0,0389

Z= 0,00; p=1,0000

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

Tabla 22. Frecuencia de tiempos con bacilos anaranjados fluorescentes, antes y después del tratamiento enzimático con ADNasa y ARNasa, en el ciclo celular de *Escherichia coli* ATTC 25922.

Anaranjado (f)	Tratamiento								
	Antes	ADNasa Después		Total	Antes	ARNasa Después		Total	
Sí	n	0	9	9	Sí	n	0	9	9
	%	0,00	36,00	36,00		%	0,00	36,00	36,00
No	n	1	15	16	No	n	0	16	16
	%	4,00	60,00	64,00		%	0,00	64,00	64,00
Total	n	1	24	25	Total	n	0	25	25
	%	4,00	96,00	100		%	0,00	100	100

Z= 2,22; p= 0,0269

Z= 2,67; p= 0,0077

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

Descripción de las características morfológicas del nucleoide por las tinciones diferencial de fluorescencia modificada, 4',6-diamidino-2'-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI) y Feulgen, en el ciclo celular de *Escherichia coli* ATCC 25922

Por la coloración de Gram los bacilos se observaron, frecuentemente, como gramnegativos con estructuras moradas compactas de forma redondas, en número de 1 a 6 y diámetro promedio de $0,48 \pm 0,12 \mu\text{m}$ y zonas con material morado difuso a largo de su citoplasma (figura 21A). Por la coloración de fluorescencia modificada, se visualizaron bacilos anaranjados con estructuras redondas anaranjadas ligera e intensamente fluorescentes (figura 21B).

Mediante la coloración de Feulgen, se observaron los nucleoides de color púrpura de forma redonda, en número de 1 a 6 en el citoplasma bacteriano (figura 21C).

Al aplicar la coloración de DAPI, en las bacterias se observaron estructuras redondas azul fluorescente, en número de 1-6, con diámetro promedio de $0,46 \pm 0,14 \mu\text{m}$ en el ciclo celular, así como también estructuras irregulares o un citoplasma parcialmente coloreado

de azul fluorescente. En el post-tratamiento ADNasa, no se observaron las estructuras ni el citoplasma azul fluorescente, es decir, la reacción fue DAPI negativo. Esto indica, que las estructuras y el material distribuido a lo largo del citoplasma, es el ADN o nucleoides de la bacteria (figuras 21D, 21E y 21F).

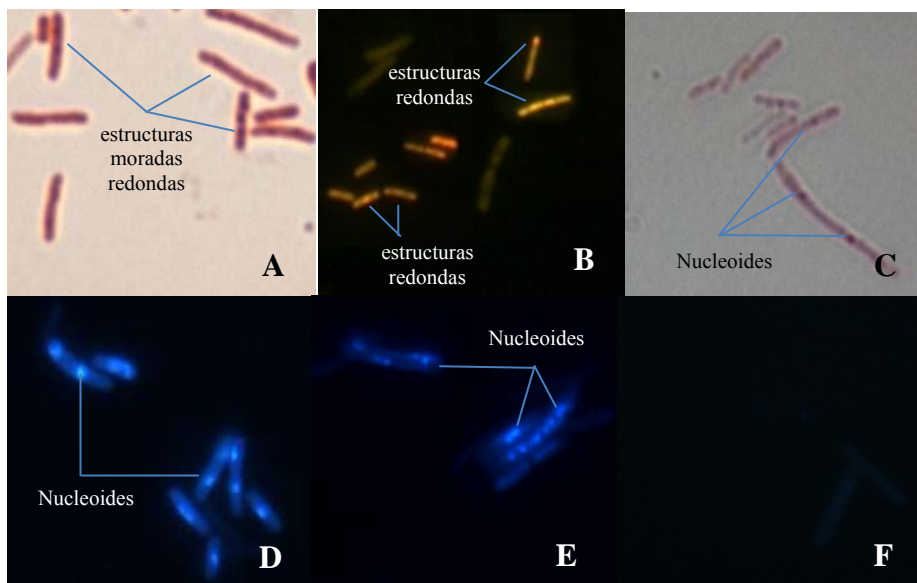


Figura 20. Fotomicrografías de las características tintoriales de extendidos de *Escherichia coli* ATCC 25922, por diferentes coloraciones. A. Coloración de Gram. B. Coloración de fluorescencia modificada. C. Coloración de Feulgen. D. y E. Coloración de DAPI sin tratamiento. F. Con tratamiento con ADNasa. Se señalan las estructuras redondas por Gram y fluorescencia, siendo morfológicamente similares a los nucleoides observados por DAPI. 1000x.

CONCLUSIONES

La bacteria *N. gonorrhoeae* se observó como cocos aislados y diplococos gramnegativos en las distintas etapas del ciclo celular con estructuras intensamente moradas en su interior.

La tinción de fluorescencia modificada en el ciclo celular de *N. gonorrhoeae* mostró que el color predominante fue el anaranjado ligeramente fluorescente.

La secuencia de color en el ciclo celular de *N. gonorrhoeae*, por la tinción de fluorescencia modificada fue amarillo, anaranjado y verde.

El material laxo y compacto redondo de color morado por Gram, posiblemente, correspondan al nucleoide de *N. gonorrhoeae*.

N. gonorrhoeae puede presentar de 1 a 4 nucleoides en cocos aislados, cuando se colorea con DAPI.

La tinción rosada intensa y morada producida por la coloración de Gram depende de la síntesis de ADN y ARN en el ciclo celular de *N. gonorrhoeae*.

La tinción anaranjada y amarilla, se produce a consecuencia de la síntesis de ADN y de ARN, en el ciclo celular de *N. gonorrhoeae*.

BIBLIOGRAFÍA

- Albarado, L. y Flores, E. 2008. Evaluación de la coloración diferencial de fluorescencia modificada en *Pseudomonas* spp. aisladas de suelo. *Kasmera*, 36(1): 17-27.
- Berger, M.; Farcas, A.; Geertz, M.; Zhelyazkova, P.; Brix, K.; Travers, A. y Muskhelishvili, G. 2010. Coordination of genomic structure and transcription by the main bacterial nucleoid-associated protein HU. *EMBO Rep.*, 11(1): 59-64.
- Brooks, G.; Butel, J. y Morse, S. 2002. *Microbiología de Jawetz, Melnick y Adelberg*. Decimoséptima edición. Manual Moderno. México.
- Darzynkiewicz, Z. 1990. Differential staining of DNA and RNA in intact cells and isolated cell nuclei with acridine orange. *Meth. Cell Biol.*, 33: 285-298.
- Dutt, M. 1975. Selective staining of animal chromosomes with synthetic dyes following iodine-dye-procedure. *Acta Histochem.*, 53(2): 211-216.
- Fazii, P.; Ciancaglini, E. y Sforza, R. 2002. Differential fluorescent staining method for detection of bacteria in blood cultures, cerebrospinal fluid and other clinical specimens. *Eur. J. Clin. Microb. Inf. Dis.*, 21: 373-378.
- Finegold, B. 1996. *Diagnóstico Microbiológico*. Editorial Médica Panamericana. Séptima edición. México.
- Flores, E. 2008. Evaluación de la coloración diferencial de fluorescencia en el diagnóstico de *Neisseria gonorrhoeae* en muestras perianales y uretrales. Trabajo para ascender a la categoría de Profesor Agregado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Venezuela.
- Flores, E. y Albarado, L. 2009(a). Ciclo celular por Gram y tinción de fluorescencia modificada en bacterias con aspecto morfológico semejante a *Neisseria gonorrhoeae* aisladas de muestras perianales y uretrales. *NOVA*, 7(11): 27-33.
- Flores, E. y Albarado, L. 2009(b). Tinción diferencial de fluorescencia modificada en el diagnóstico de *N. gonorrhoeae* y correlación clínico-tintorial del diplococo. *Salus*, 13(3): 39-50.
- Flores, E.; Albarado, L.; Thomas, D. y Lobo, A. 2008. 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*, 12(2): 29-35.

Freeman, B. 1986. *Microbiología de Burrows*. Vigésima segunda edición. Editorial Médica Panamericana. España.

García, R. 2000. *Manual de Laboratorio Clínico*. Diagnóstico Anatomía Patológica. Segunda edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Colombia.

Germán, P.; Pérez, M. y Pacheco, A. 2004. Algunas consideraciones sobre *Neisseria gonorrhoeae*. *Acta Odon. Vzlan.*, 42: 11.

Gómez, M. y Camacho, R. 1995. The bacterial nucleoid. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, 37(3): 281-290.

Joongbaek, K.; Shige, H.; Yoshimura, K.; Ryosuke, L.; Ohniwa, A. y Kunio, T. 2004. Fundamental structural units of the *Escherichia coli* nucleoid revealed by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Res.* 32(6): 1982–1992.

Junqueira, L. y Carneiro, J. 1996. *Histología Básica*. Cuarta edición. Masson, S.A. España.

Kar, S.; Edgar, R. y Adhya, S. 2005. Nucleoid remodeling by an altered HU protein: reorganization of the transcription program. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 102(45): 16397-16402.

Kois, A.; Swiatek, M. y Zakrzewska, J. 2007. Structure of bacterial chromosome. *Postepy. Hig. Med. Dosw.*, 61: 534-540.

Koneman, E.; Allen, S.; Janda, W.; Schreckenberger, P. y Winn, W. 2008. *Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas color*. Sexta edición. Editorial Panamericana. Argentina.

Lanz, J.; De Freitas, H.; Betancourt, J.; Nuñez, N. y Velásquez, W. 2004. Susceptibilidad antimicrobiana y producción de β -lactamasas en cepas de *Neisseria gonorrhoeae* aisladas en pacientes del Hospital Universitario “Dr. Manuel Nuñez Tovar”, estado Monagas, Venezuela. *Kasmera*, 32(1): 27-35.

Marcellini, L.; Giammatteo, M.; Aimola, P. y Mangoni, M. 2010. Fluorescence and electron microscopy methods for exploring antimicrobial peptides mode(s) of action. *Methods Mol. Biol.*, 618: 249-266.

Moyes, R.; Reynolds, J. y Breakwell, D. 2009. Differential staining of bacteria: Gram stain. *Curr. Protoc. Microbiol.*, 3: Appendix 3C.

MPPS: Ministerio del Poder Popular para la Salud. 2010. Normas de Bioética, publicado en gaceta oficial N° 39.434, de la República Bolivariana de Venezuela.

Pal, M. y Ghosh, A. 1973. Stoichiometry of metachromatic dye binding by

- deoxyribonucleic acid. *Histochem.*, 36:29-33.
- Pértega, S. y Pita, S. 2004. Asociación de variables cualitativas: El test exacto de Fisher y el test de McNemar. *Metodología de la Investigación*.
- Prescott, L.; Harley, J. y Klein, D. 2008. Microbiología. Séptima edición. Editorial Mc Graw Hill. España.
- Ryter, A. 1968. Association of the nucleus and the membrane of bacteria: a morphological study. *Bacteriol. Rev.*, 32(1): 39-54.
- De Robertis, P. y De Robertis, F. 1981. *Biología celular y molecular*. Décima edición. Editorial el Ateneo. España.
- Rost, F. 1995. *Fluorescence microscopy*. Volumen II. Cambridge University Press. Gran Bretaña.
- Rouviere, J.; Yaniv, M. y Germond, J. 1979. *E.coli* DNAbinding protein HU forms nucleosomelike structure with circular double-stranded DNA. *Cell.*, 17: 265-274
- Salguero, I. 2007. Replicación cromosómica en presencia de una nucleósido difosfato reductasa codificada por el alelo nrdA101 de *Escherichia coli*. Tesis Doctoral. Badajoz: Servicio de publicaciones, Universidad de Extremadura. España.
- Schaechter, M.; Medoff, G.; Eisenstein, B. y Guerra, H. 1994. *Microbiología. Mecanismos de las enfermedades infecciosas*. Segunda edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina.
- Scott, B.; Forbes, B.; Sahm, D. y Weissfeld. A. 2002. *Diagnóstico Microbiológico*. Editorial Médica Panamericana. Décima primera edición. Argentina.
- Srivastava, P.; Demarre, G.; Karpova, T.; McNally, J. y Chatteraj, D. 2007. Changes in nucleoid morphology and origin localization upon inhibition or alteration of the actin homolog, MreB, of *Vibrio cholerae* *J. Bacteriol.*, 189(20): 7450-7463.
- Stainer, R.; Igraham, J.; Wheelis, M. y Painter, P. 1991. *Microbiología*. Segunda edición. Editorial Reverté S.A. España.
- Tobiason, D. y Seifert, H. 2006. The obligate human pathogen, *Neisseria gonorrhoeae*, is polyploid. *PLoS Biol.*, 4: 1069-1078.

HOJAS DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

Título	Asociación de las Características Tintoriales por Gram y Tinción de Fluorescencia Modificada con Síntesis de ADN y ARN en las Distintas Etapas del Ciclo Celular de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (Modalidad: Tesis de Grado)
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Caraballo S, Susanny del C.	CVLAC	18114565
	e-mail	susannycaraballo@hotmail.com
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Ciclo celular, fluorescencia, tinción, síntesis

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Departamento de Bioanálisis

Resumen (abstract):

Con el propósito de evaluar la asociación de las características tintoriales por Gram y tinción de fluorescencia modificada con la síntesis de ADN y ARN en las distintas etapas del ciclo celular de *Neisseria gonorrhoeae*, se evaluaron 10 aislamientos de *N. gonorrhoeae*, procedentes de muestras uretrales de pacientes del área de Infección de Trasmisión Sexual del ambulatorio “Dr. Arquímedes Fuentes Serrano”, Cumaná-Venezuela, en el periodo de febrero-mayo, 2011. El ciclo celular se realizó transfiriendo 5 gotas de un cultivo Infusión Cerebro Corazón (BHI) enriquecido con 5% de sangre, en fase exponencial (16-18 horas), a un caldo fresco del mismo medio de cultivo, incubándose por 1 hora a 37°C; a partir de éste, se tomaron alícuotas del cultivo en el tiempo 0 y luego cada 5 minutos hasta las 2 horas. Se realizaron extendidos de las colonias aisladas del medio GC y del caldo BHI enriquecido con sangre en los diferentes tiempos del ciclo celular, en láminas nuevas y estériles, se aplicó la técnica de coloración de Gram, la tinción diferencial de fluorescencia modificada, 4',6-diamidino-2'-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI) y Feulgen, antes y después del tratamiento enzimático con ADNasa y ARNasa; asimismo, se empleó el análisis estadístico de McNemar, para establecer asociación entre la reactividad tintorial por Gram y fluorescencia antes y después del tratamiento enzimático; así como también la prueba de Fischer para asociar la reactividad tintorial por los métodos de coloración Gram y DAPI. Se observaron en todos los tiempos cocos aislados y diplococos gramnegativos; con la tinción diferencial de fluorescencia las bacterias presentaron variaciones en la tinción e intensidad de fluorescencia en los diferentes tiempos del ciclo celular, con una secuencia de amarillo, anaranjado y verde; el color predominante fue el anaranjado ligeramente fluorescente. La coloración específica para ADN, DAPI, permitió la visualización del nucleóide, como estructuras redondas de aspecto laxo y compacto, observándose de 1 a 4 en una célula. El color rosado claro y oscuro observado por Gram en diplococos tuvo asociación significativa ($p < 0,05$) con la reacción de DAPI negativa y positiva, respectivamente. La coloración de Feulgen permitió la observación de las mismas características morfológicas observadas por la técnica de DAPI, pero en este caso, el ácido nucleico se coloreó de fucsia. Al aplicar tratamiento enzimático con ADNasa y ARNasa, se logró apreciar cambios en la reactividad de Gram y coloración de fluorescencia en las células bacterianas procedentes de las colonias aisladas del medio GC y del caldo BHI enriquecido con sangre en los diferentes tiempos del ciclo celular; por Gram se observó que las células que se coloreaban de rosado intenso, post-tratamiento con las enzimas ADNasa y ARNasa aclararon, existiendo asociación significativa ($p < 0,05$) entre la reactividad tintorial por Gram y la degradación de ADN y ARN; y con la tinción de fluorescencia, el color amarillo ligera o intensamente fluorescente y anaranjado ligeramente fluorescente observados, inicialmente, sin el tratamiento enzimático, no se visualizaron o se observaron en menor proporción. Se concluye que, las variaciones tintoriales con Gram y fluorescencia modificada en *Neisseria gonorrhoeae* están asociadas a la síntesis de ARN y ADN.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail				
Evelin Flores Fernandez	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/>	A <input type="checkbox"/> S <input checked="" type="checkbox"/>	T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>	J <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	11.825.759			
	e-mail	eve_linff@yahoo.com			
	e-mail				
Militza Guzman	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/>	A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/>	T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>	J <input type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	8.954.225			
	e-mail	militzaguz@yahoo.com			
	e-mail				
Yazmina Araque	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/>	A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/>	T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>	J <input type="checkbox"/> U <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	8.000.717			
	e-mail	Yamasi40@hotmail.com			
	e-mail				

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2013	02	25

Lenguaje: SPA

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-caraballos.doc	Aplication/word

Alcance:

Espacial:

Temporal:

Título o Grado asociado con el trabajo: Licenciada en Bioanálisis

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciada

Área de Estudio: Bioanálisis

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado: Universidad de Oriente

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CU N° 0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
SISTEMA DE BIBLIOTECA
RECIBIDO POR *[Firma]*
FECHA 5/8/09 HORA 5:30

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

[Firma]
JUAN A. BOLAÑOS CUNDELO
Secretario



C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/maruja

Apartado Correos 094 / Telfs: 4008042 - 4008044 / 8008045 Telefax: 4008043 / Cumaná - Venezuela

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso- 6/6

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009) : “los Trabajos de Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización”.



Susanny Caraballo



Evelin Flores
Asesor