

# Técnicas y métodos de tinción

## Técnicas:

### Tinción de Gram

También puede utilizarse a menudo un método que no tiñe igualmente todas las células, un proceso denominado tinción diferencial. La tinción de este tipo más extensamente utilizada es la tinción de Gram, denominada así por el bacteriólogo danés Hans Christian Gram, quien la desarrollo. Sobre la base de su reacción a la tinción de Gram, las bacterias pueden dividirse en dos grupos, grampositivas y gramnegativas.

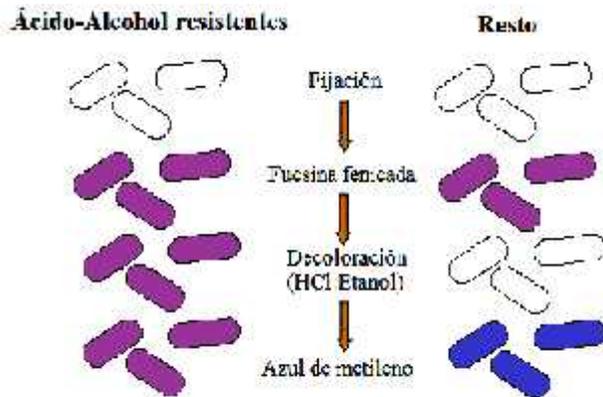
Debido a su importancia en taxonomía bacteriana y a que indica diferencias fundamentales de la pared celular de las distintas bacterias, describiremos aquí con cierto detalle la tinción de Gram. Las células fijadas al calor sobre un portaobjetos se tiñen primero con una solución de cristal violeta (otros colorantes básicos no son tan efectivos) y son lavadas después para quitar el exceso de colorante. En este estado todas las células, tanto las gramnegativas como las grampositivas, están teñidas de azul. El portaobjetos se cubre entonces con una solución de yodo (I<sub>2</sub>) – yoduro potásico (KI). El ingrediente activo es aquí el yodo, el yoduro potásico simplemente hace soluble el yodo en agua. El yodo entra en las células y forma un complejo insoluble en agua con el cristal violeta. De nuevo tanto las células grampositivas como las gramnegativas se encuentran en la misma situación. Se lleva a cabo después de la decoloración, usando bien alcohol o bien acetona, sustancias en las que es soluble el complejo yodo – cristal violeta. Algunos organismos (grampositivos) no se decoloran mientras que otros (gramnegativos) lo hacen. La diferencia esencial entre esos dos tipos de células está, por lo tanto, en la resistencia a la decoloración. Después de la decoloración las células grampositivas son todavía azules, pero las gramnegativas son incoloras. Para poner de manifiesto las células gramnegativas se utiliza una coloración de contraste. Habitualmente es un colorante de color rojo, como la safranina o la fucsina básica. Después de la coloración de contraste las células gramnegativas son rojas mientras que las

grampositivas permanecen azules.



### Tinción ácido – alcohol resistencia

Esta tinción sirve principalmente para clasificar micobacterias y actinomicetos, que tienen un alto contenido en lípidos y en ácidos micólicos y que no pueden ser calificadas por la tinción de Gram. Para empezar se hecha sobre el portaobjetos una mezcla de fucsina – fenol, en la que la fucsina hace de colorante rosa y el fenol de mordiente. Las células se tiñen de rosa, tanto las ácido – alcohol sensibles como las resistentes. Después se usa un decolorante orgánico que hace que las bacterias ácido – alcohol sensibles se decoloren mientras que las ácido – alcohol resistentes se quedan rosa. Como en la tinción de Gram se utiliza un colorante de contraste que en este caso es el azul de metileno que tiñe las células ácido – alcohol sensibles de color azul quedando las células ácido – alcohol resistentes de color rosa.



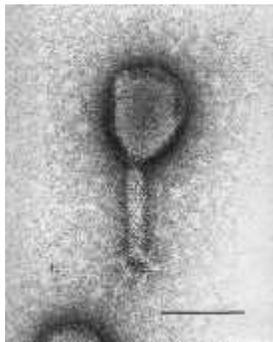
## Tinción de esporas

Se utiliza para teñir las estructuras de resistencia llamadas endosporas bacterianas. Sobre el portaobjetos con la preparación se echa verde malaquita que tiñe las células de verde. Luego se lava con agua destilada con lo que las células se quedan incoloras y las endosporas permanecen verde. Finalmente se usa la safranina para obtener bacterias de color rosa mientras que las endosporas continúan con su color verde del verde malaquita.



## Tinción negativa

Es el reverso del procedimiento de tinción usual: las células se dejan sin teñir pero se colorea un cambio el medio que las rodea. Lo que se ve, por tanto, es el perfil de las células. La sustancia utilizada para la tinción negativa es un material opaco que no tiene afinidad por los constituyentes celulares y que simplemente rodea las células, tal como la tinta china (que es una suspensión de partículas de carbono coloidal) o la nigrosina (un colorante negro insoluble en agua). La tinción negativa es un modo satisfactorio de aumentar el contraste de las células en microscopia óptica, pero su máxima utilidad está en revelar la presencia de cápsulas alrededor de las células bacterianas.



## **Métodos:**

### **Tinción in vivo e in vitro**

Una tinción *in vivo* (tinción supravital) es el proceso de teñir tejidos vivos. Al provocar que determinadas células o estructuras adquieran los colores de contraste, se puede estudiar su ubicación y morfología mientras están desempeñando su función. El propósito más común es revelar detalles de la citoestructura que de otra manera no resultarían evidentes, sin embargo, la tinción supravital puede revelar además donde aparece un determinado producto químico o donde se lleva a cabo una determinada reacción química dentro de las células o tejidos.

A menudo estas tinciones son llamadas *tinciones vitales* o *supravitales*. Se introducen en el organismo mientras las células aún se encuentran vivas. Para conseguir el efecto deseado, el colorante usualmente se utiliza en soluciones muy diluidas que van entre 1:5.000 a 1:50.000. A pesar de esto las tinciones son eventualmente tóxicas para los organismos, algunas más que otras.

Una tinción *in vitro* involucra el coloreo de células o estructuras que han sido removidas de su contexto biológico. Se utiliza a menudo una combinación de varios colorantes para revelar más detalles y características de las que se obtendrían con la utilización de uno solo. Combinados con protocolos específicos de fijación y de preparación de muestras, los científicos y profesionales de la salud pueden utilizar estas técnicas estandarizadas como una herramienta diagnóstica repetible y consistente. Una contratinción es una tinción que consigue que las células o estructuras sean más visibles, cuando no se consigue que sean totalmente visibles con la tinción principal.

Por ejemplo, el cristal violeta tiñe únicamente a las bacterias Gram positivas en la tinción de Gram. Se utiliza una contratinción de safranina (que colorea todas las células), para permitir también la identificación de bacterias Gram negativas.

Es de notar que muchas tinciones pueden ser utilizadas tanto en células vivas como en células fijadas.

### **Métodos de tinción in vitro**

#### **Preparación**

Las etapas preparatorias involucradas en una tinción van a depender del tipo de análisis planeado; bajo estas premisas se puede considerar que algunos o todos de los siguientes pasos podrían requerirse.

**Fijación:** de por sí, esta etapa puede consistir en varios pasos. La fijación es una modificación de las propiedades fisicoquímicas de las proteínas que forman una célula o tejido y que tiene por finalidad preservar las formas de las células o tejidos tanto como sea posible. A veces se puede utilizar una fijación por calor para matar, adherir y alterar un espécimen de modo que acepte la tinción. La mayor parte de las veces se utiliza un fijador químico. Los fijadores

químicos en general causan la formación de enlaces cruzados entre proteínas, o entre proteínas y otras sustancias presentes en la muestra, incrementando su resistencia mecánica. Entre los fijadores químicos más comunes se encuentran el formaldehído, etanol, metanol, y/o el ácido pícrico. Pequeños bloques de tejido pueden ser embebidos en parafina o algún polímero, proceso conocido como inclusión, para incrementar su resistencia y estabilidad, y para hacer más fácil cortarlos en rodajas extremadamente delgadas, ya que cuanto más delgado es un corte histológico, más definición se obtiene en las imágenes microscópicas.

**Permeabilización:** este paso implica el tratamiento de las células con un surfactante suave. Este tipo de tratamiento tiene como finalidad disolver la membrana celular para permitir que las grandes moléculas de colorante puedan acceder a las estructuras del interior de las células.

**Montaje:** frecuentemente implica adherir los cortes histológicos a un portaobjetos de vidrio para su observación al microscopio o análisis. En algunos casos, se puede cultivar a las células directamente sobre el portaobjetos. En muestras de células sueltas, como las que se presentan en un extendido de sangre o de fluidos biológicos, la muestra puede ser aplicada directamente sobre el portaobjetos. Para piezas de tejido de mayor tamaño, se utiliza un micrótopo que corta la muestra en rodajas sumamente delgadas. Estas rodajas son luego adheridas al portaobjetos por medio de una sustancia que funciona como pegamento, ya sea una resina transparente, gelatina o clara de huevo. El montaje tiene por finalidad aumentar la resistencia mecánica de una muestra que de otra manera sería extremadamente frágil, para que soporte el proceso de teñido conservando lo más posible su estructura original.

### **Tinción adecuada**

En su forma más simple, el verdadero proceso de tinción puede implicar la inmersión de la muestra (antes o después de la fijación y el montaje) en la solución colorante, seguido del aclarado que es un lavado para eliminar el exceso de colorante y la observación. Muchos tintes, sin embargo, requieren del uso de un mordiente, esto es, un compuesto químico que reacciona con el colorante para formar un precipitado coloreado insoluble. Cuando la solución de colorante en exceso se elimina durante el aclarado, la tinción mordentada permanece.

La mayoría de los colorantes utilizados en microscopía se encuentran disponibles como **colorantes certificados**. Esto significa que los colorantes ofrecidos por el fabricante han sido evaluados por un organismo independiente, la Biological Stain Commission, y que este organismo ha determinado que el producto ofrecido cumple o excede ciertos estándares de pureza, concentración de sustancia colorante y desempeño en las técnicas de tinción empleadas. Estos estándares son publicados detalladamente en la revista *Biotechnic & Histochemistry*.<sup>1</sup> Muchos colorantes presentan una composición diferente

entre diferentes fabricantes. La utilización de colorantes certificados elimina una fuente de resultados inesperados.

### **Tinción directa**

Hablamos de tinción directa cuando el colorante interacciona directamente con el sustrato, sin otro tratamiento previo.

### **Tinción indirecta**

Se denomina de este modo a las tinciones que hacen uso de un mordiente. Un mordiente habitual es el ácidotánico.