

TINCIÓN CON AZUL BRILLANTE DE CRESILO EN SECCIONES VEGETALES CON PARAFINA

ADRIANA N. PÉREZ¹ y VÍCTOR HUGO TOMASI²

Summary: Staining with Cresyl Brilliant Blue in paraffin-embedded plant tissues sections. The development of tissue-preparation methods for light microscopy, both for routine research and didactic purposes, still retains an important place among botanical microtechniques. We herein report a quick and efficient method for staining sections of paraffin-embedded plant tissues using Cresyl Brilliant Blue before dewaxing. The method results in a substantial saving in time and solvents, for it avoids steps such as hydration and dehydration of the sectioned specimen. The quality of the resulting preparations is very good.

Key words: Brilliant Cresyl Blue, plant anatomy, light microscopy, staining of undewaxed sections.

Resumen: El desarrollo de métodos para la realización de preparados histológicos para la observación con microscopio óptico, tanto destinados a la investigación como a la docencia, aún ocupa hoy un lugar importante en microtécnica botánica. Informamos aquí sobre un método rápido y eficiente para la coloración de cortes de tejidos vegetales incluidos en parafina, utilizando Azul Brillante de Cresilo en secciones sin desparafinar. El método da como resultado un ahorro substancial de tiempo y solventes, ya que evita la realización de algunos pasos durante el procedimiento de coloración, tales como la hidratación y deshidratación de los cortes. La calidad de los resultados de las preparaciones es muy buena.

Palabras clave: Azul Brillante de Cresilo, anatomía vegetal, microscopía óptica, tinción de cortes parafinados.

INTRODUCCIÓN

Muchos métodos de tinción han sido aplicados en cortes de muestras vegetales (Jensen, 1962; Gerlach, 1984; D'Ambrogio, 1986). La mayoría de estos métodos se realizan combinando dos o más colorantes en solución, tales como Azul de Astral, Pardo de Bismarck, Azul de Toluidina, Azur B, Verde rápido, Azul de Alciano, Safranina O, Fuscina básica, Auramina o Hematoxilina (Máác & Vágás, 1961; Sass, 1958; Woessner, 1970; Ma *et al.*, 1993; Graham & Joshi, 1995, 1996; Graham & Trentham, 1998; Kraus *et al.*, 1998). Estas técnicas, si bien ofrecen muy buenos resultados de tinción, requieren tiempos prolongados para su realización o precisan soluciones tamponadas a diferentes pH, tanto para la disolución de los colorantes, como para los lavados posteriores a la coloración.

Otros métodos emplean un solo colorante, a base de Azul de Toluidina, Azur B, Tionina o Violeta de Cresilo (Jensen, 1962; Sakai, 1973; Strittmatter, 1980). Estas técnicas reducen

significativamente los tiempos de coloración y producen tinciones pancromáticas muy adecuadas para el estudio de tejidos vegetales, debido al efecto bato-, orto-, y metacromático que estos colorantes desarrollan (Baker, 1958). Sin embargo, las preparaciones histológicas se decoloran en función del tiempo (Strittmatter, 1980, Ma *et al.*, 1993), pierden la tinción metacromática tras la deshidratación de las secciones histológicas coloreadas o necesitan ser observadas al microscopio de luz durante el procedimiento de coloración para alcanzar una tinción satisfactoria (Sakai, 1973; Prentø, 2001).

Durante la realización de un estudio comparativo preliminar con colorantes tiazínicos y oxazínicos para la tinción de cortes histológicos de muestras vegetales sin remover la parafina, observamos que, a diferencia del resto de los colorantes, el Azul Brillante de Cresilo produjo coloración pancromática de los componentes tisulares, muy estable en función del tiempo y con elevada definición tintórea.

El propósito del presente trabajo fue determinar la concentración óptima del Azul Brillante de Cresilo, a fin de obtener tinciones adecuadas de cortes vegetales sin desparafinar en tiempos reducidos y comparar, posteriormente, el método propuesto con otros citados en la bibliografía.

¹Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (UNC - CONICET) Av. Vélez Sársfield 299, C.C. 495. 5000 Córdoba. Email: adriana@imbiv.unc.edu.ar

²Cátedra de Anatomía Patológica, Fac. de Odontología, UBA - CONICET. Email: postmast@cap.odon.uba.ar

MATERIALES Y MÉTODO

Se tomaron muestras de distintas especies pertenecientes a diferentes familias botánicas.

Raíces: *Solanum argentinum* Bitter & Lillo (Solanaceae).

Tallos: *Solanum argentinum* y *Ruscus hypoglossum* L. (Liliaceae)

Hojas: *Solanum argentinum* y *Crataegus* sp. (Rosaceae)

Flores: *Solanum argentinum*, *Mandevilla pentlandiana* (A. DC.) Woodson (Apocynaceae), *Capsicum tovarii* Eshbaugh, Smith et Nickrent (Solanaceae) y *Sisyrinchium* sp. (Iridaceae).

Los fragmentos correspondientes fueron fijados en FAA (formaldehído puro, etanol 96°, ácido acético 1:4:1) a temperatura ambiente durante 48 horas. Tras lavar con agua común a corriente continua durante 1 hora, las muestras se deshidrataron en una serie de etanol en graduación creciente (50°, 60°, 70°, 80°, 90°, 95° y 100°) durante 30 minutos en cada uno y se dejaron hasta el otro día en butanol puro (Merck). Posteriormente, las muestras se clarificaron con dos cambios de xilol puro (Merck) e incluyeron en Paramat (BDH). Se realizaron secciones seriadas de 10 µm de espesor con micrótopo de rotación tipo Minot las cuales se pegaron sobre portaobjetos limpios y sin adhesivo. Para ello, los cortes se colocaron sobre agua destilada en el portaobjetos y se estiraron, cuidadosamente, sobre Platina termostata a 35°-37°C. Los cortes así adheridos se dejaron durante toda la noche en estufa a 30°C.

Sin desparafinar y a temperatura ambiente, las secciones histológicas se colorearon por inmersión en solución acuosa de Azul Brillante de Cresilo (BDH, C.I. 51010) al 0,05% durante 2 minutos. Tras la tinción, los cortes se lavaron en agua común y se dejaron secar al aire toda la noche. Luego, las preparaciones se desparafinaron directamente con xilol puro (Merck) durante 10 minutos y se montaron con Bálsamo de Canadá artificial (Biopur) y Entellán (Merck). Paralelamente, se realizaron pruebas de tinción con la misma solución durante 5 y 10 minutos y, por otra parte, se utilizaron soluciones de Azul Brillante de Cresilo al 0,1%, 0,5% y 1%. Asimismo, se prepararon soluciones acuosas con los siguientes colorantes tiazínicos: Azul de Toluidina (Merck, C.I. 52040), Tionina (Mallinckrodt, C.I. 52000), Azul de Metileno (Baker, C.I. 52015), Azur B (Merck C.I. 52010) y, como

colorante oxazínico: Violeta de Cresilo (Mallinckrodt, C.I. sin N°), a fin de colorear secciones histológicas en iguales condiciones de temperatura, concentraciones y tiempos de exposición que las probadas para el Azul Brillante de Cresilo.

Las fotomicrografías fueron obtenidas con un fotomicroscopio Axiophot Zeiss.

RESULTADOS

Los preparados histológicos coloreados con Azul Brillante de Cresilo al 0,05% en solución acuosa durante 2 minutos, mostraron los mejores resultados de tinción (Fig. 1). En los materiales utilizados se observaron las siguientes coloraciones:

- La cutícula coloreada de celeste claro.
- En la epidermis, el contenido celular de amarillo pardo.
- En el colénquima las paredes celulares se colorean de violeta intenso.
- El floema y el parénquima cortical y medular, de rojo violáceo.
- Las paredes lignificadas de las fibras esclerenquimáticas, de azul intenso.
- El xilema, de celeste verdoso.
- Los nectarios y células secretoras, verde esmeralda.
- Núcleos y citoplasma de azul claro.
- Engrosamientos del endoteco de azul.

Estos mismos preparados fueron observados a los 6 meses, al año y a los 2 años y los diferentes tejidos no mostraron cambios tintóreos ni pérdida de color. A mayores tiempos de exposición y concentraciones del Azul Brillante de Cresilo se produjeron hipercoloraciones inespecíficas, inadecuadas para el estudio histológico.

Las preparaciones teñidas con colorantes tiazínicos produjeron tinción pancromática adecuada, aunque difusa y de tonalidad violácea que hizo disminuir la definición tintórea entre los distintos tejidos vegetales. En el caso de la coloración con Azur B fue necesario aumentar el tiempo de tinción a 10 minutos o incrementar la concentración del colorante al 1% para obtener una correcta coloración. Sin embargo, en todos los casos que se utilizaron colorantes tiazínicos, las coloraciones perdieron su potencial tintóreo con el transcurso del tiempo. El empleo de Violeta de Cresilo mostró intensa coloración rosa púrpura, haciendo dificultosa la diferenciación de los distintos tejidos. Además, durante la deshidratación

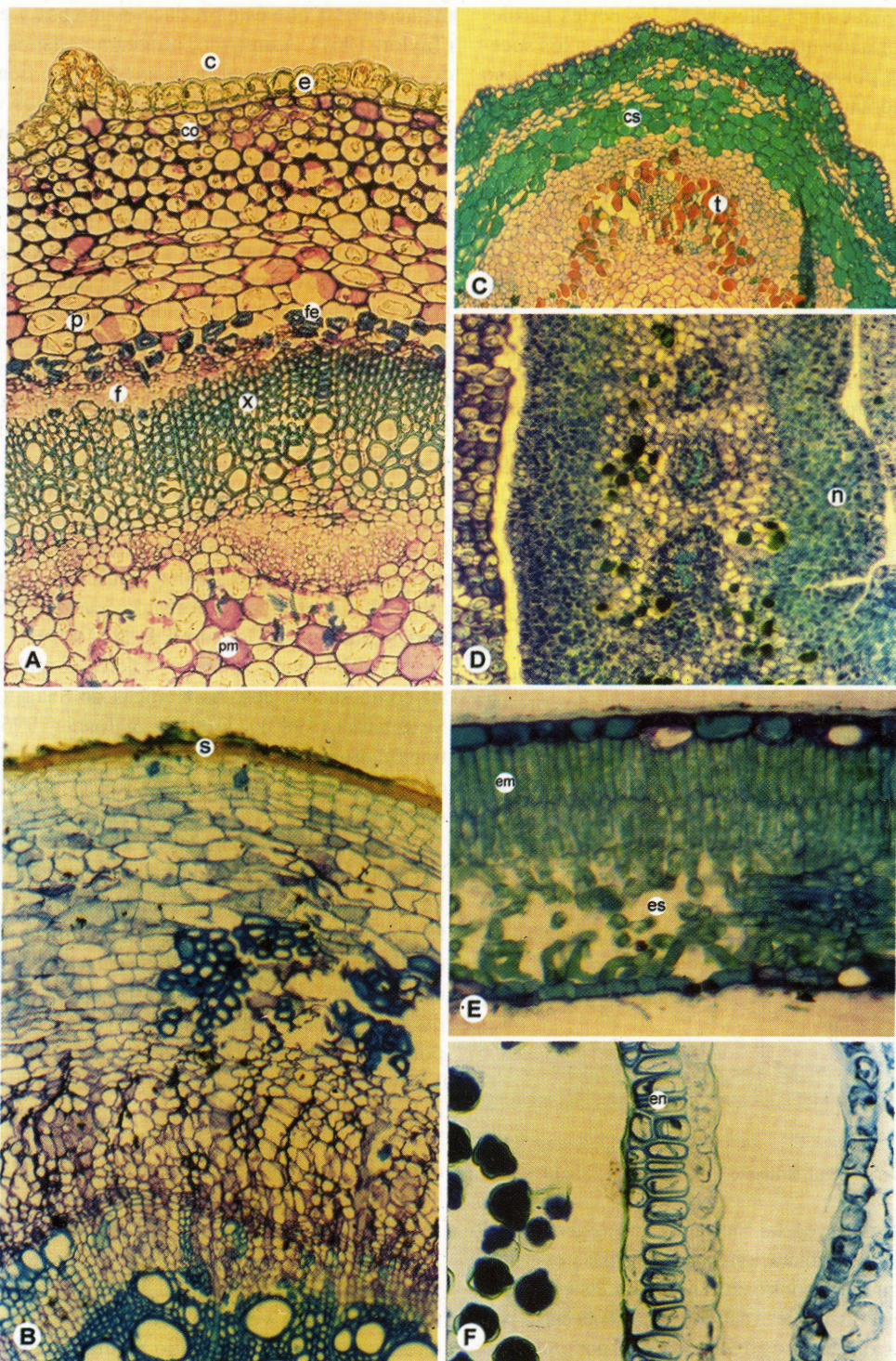


Fig. 1. A-B *Solanum argentinum*. A: corte transversal por tallo, x 160. B: corte transversal de una raíz gemífera, x 125. C: *Sisyrinchium* sp. corte transversal del pedúnculo floral, x 160. D: *Mandevilla pentlandiana* corte transversal por nectario y células secretoras, x 200. E: *Crataegus* sp. corte transversal de una hoja, x 100. F: *Capsicum tovarii* corte transversal de una antera, x 500. Abreviaturas: c: cutícula; e: epidermis; co: colénquima; p: parénquima; fe: fibras del esclerénquima; f: floema; x: xilema; pm: parénquima medular; s: súber; cs: células secretoras; t: taniños; n: nectario; em: clorénquima en empalizada; es: clorénquima esponjoso; en: endotecio.

de las preparaciones coloreadas, los cortes perdieron la coloración metacromática, debido a los sucesivos pasos por la serie de alcoholes etílicos y xileno para ser montados con Bálsamo de Canadá artificial.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El desarrollo de métodos de tinción para obtener preparados histológicos de buena calidad, destinados a la enseñanza e investigación, ocupa aún hoy un lugar importante en microtécnica vegetal (D'Ambrogio, 1986). De esta manera, cualquier mejoramiento de la técnica de coloración de cortes parafinados aventaja tanto la eficiencia como la calidad de los resultados de tinción (Ma *et al.*, 1993; Horobin, 2002). En este sentido y de acuerdo a los resultados obtenidos, concluimos que el Azul Brillante de Cresilo en solución acuosa al 0,05% presenta importantes ventajas para la coloración de muestras vegetales respecto a los colorantes tiazínicos citados en bibliografía, ya que produce una tinción pancromática estable que permite diferenciar, con elevada definición; los distintos tejidos presentes en las muestras analizadas. Es un método sencillo: emplea un solo colorante sin remoción del medio de inclusión, no precisa de soluciones tamponadas y consume muy poco tiempo.

El Azul Brillante de Cresilo (Fig. 2) presenta una importante aplicación en histología animal (Conn, 1991).

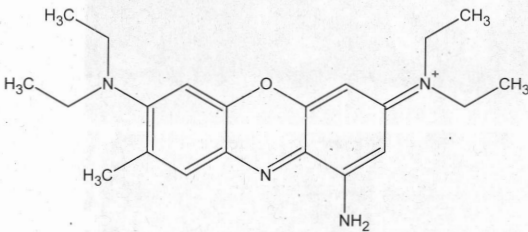


Fig. 2. Azul Brillante de Cresilo C.I. 51010

En microtécnica vegetal, Stewart & Schertiger (1949) lo utilizaron para la coloración de cromosomas y es el único informe que se encontró en la literatura. Este colorante oxazínico, de naturaleza catiónica, presenta carga positiva deslocalizada, la cual tiene afinidad por grupos ácidos del tejido (Prentø, 2001; Kiernan, 2001).

Por otra parte, se sabe que los colorantes tiazínicos son mejores colorantes metacromáticos que sus análogos oxazínicos; sin embargo, el Azul Brillante de Cresilo es una excepción, ya que la

metacromasia que éste produce es intensa y estable (Taylor, 1961). Asimismo, otra característica de todos estos colorantes es la propiedad que tienen de producir diferentes gamas de color en tonos verdes por efecto de batocromasia, azul por ortocromasia y violeta o rojo por metacromasia (Baker, 1958); sin embargo, los fenómenos físico-químicos por los cuales se producen estas tinciones son aún poco entendidos, ya que dependen no sólo de las propiedades inherentes a los componentes del tejido y de la cantidad de grupos químicos ácidos o fenólicos presentes en dichos componentes (Horobin, 2002), sino también, del comportamiento de la molécula colorante y los rearrreglos de los pares electrónicos que en ella se producen (Prentø, 2001; Kiernan, 2001), tras su unión con el tejido.

De esta manera, y teniendo en cuenta la complejidad estructural de las paredes celulares, compuestas por diversos polisacáridos neutros o ácidos y proteínas estructurales, se hace difícil la interpretación sobre la afinidad tintórea de éstas con los colorantes empleados (Graham & Joshi, 1995).

El Azul Brillante de Cresilo colorea de azul el ADN, tal como sucede con las técnicas de Sakai (1973), Strittmatter (1980) y Graham & Joshi (1996). Esta tinción ortocromática se produciría a través de enlaces iónicos entre el colorante y los grupos fosfatos de los ácidos nucleicos (Prentø, 2001).

Los grupos carboxilados de las pectinas ácidas y la carboximetilcelulosa de las paredes celulares no lignificadas presentarían afinidad por el Azul Brillante de Cresilo, como con las ftalocianinas cúpricas (Graham & Joshi, 1995, 1996; Kraus *et al.*, 1998) al establecerse interacciones coulombicas, pero produciendo efecto metacromático, ya que estos componentes del tejido se tiñen de color rojo o violáceo.

En el caso de las paredes compuestas por lignina se colorean en tonos celestes verdosos (batocromasia). En este sentido, Horobin (2002), enfatizó sobre un complejo color verde que se origina entre el Azul de Toluidina y los biopolímeros que contienen grupos fenólicos presentes en todas las estructuras lignificadas por transferencia de cargas. Sin embargo, éste no sería el caso de la epidermis que se colorea de amarillo verdoso con el Azul Brillante de Cresilo, ya que el contenido celular amarillo de la misma, en combinación con el colorante azul, produce un fondo verdoso por alocromasia.

Por otra parte, el método de coloración de secciones histológicas sin remover la parafina (Sakai, 1973; Kiernan, 1996; Ma *et al.*, 1993; Graham & Joshi, 1995,

1996), se traduce en un ahorro substancial de tiempo y de reactivos químicos, tales como etanol, butanol, xilol, benzol, y evita el contacto continuo con dichos solventes, de efectos conocidos perjudiciales para la salud (García del Moral, 1993). En este sentido, la aplicación del método aquí propuesto en secciones de muestras vegetales, agrega otras ventajas, ya que el Azul Brillante de Cresilo se puede emplear para tinciones sin necesidad de desparafinar ni de hidratar los cortes histológicos, evitando gastos innecesarios de reactivos y contaminaciones con sustancias tóxicas para el personal de laboratorio y el ambiente.

AGRADECIMIENTOS

Deseamos expresar nuestro agradecimiento al Dr. Gabriel Bernardello por la lectura crítica del manuscrito y por su constante apoyo. A la Dra. Laura Stiefkens por su asesoramiento en tejidos vegetales, a la Dra. Carolina Carrizo García por facilitar gran parte del material estudiado y por el asesoramiento para la obtención de las fotomicrografías y a la Técnica Cristina Ciarlante por el armado de la Figura 1. Asimismo deseamos agradecer a la dirección del IMBIV por permitir el uso de sus equipamientos.

BIBLIOGRAFÍA

- BAKER, J. R. 1958. *Principles of Biological Microtechnique*. Methuen, London.
- CONN, H. J. 1991. *Biological Stains*. R.D. Lillie, M.D. Ed. Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.
- D'AMBROGIO DE ARGÜESO, A. 1986. *Manual de técnicas en histología vegetal*. Hemisferio Sur, Buenos Aires.
- GARCÍA DEL MORAL, R. 1993. *Laboratorio de Anatomía Patológica*. McGraw-Hill, Interamericana, Madrid.
- GERLACH, D. 1984. *Botanische Mikrotechnik*. Georg Thieme Verlag, New York, NY.
- GRAHAM, E. T. & P. A. JOSHI. 1995. Novel fixation of plant tissue, staining through paraffin with Alcian blue and Hematoxylin, and improved slide preparation. *Biotech. & Histochem.* 70: 263-266.
- GRAHAM, E. T. & P. A. JOSHI. 1996. Plant cuticle staining with Bismarck brown Y and Azure B or Toluidine blue O before paraffin extraction. *Biotech. & Histochem.* 71: 92-95.
- GRAHAM, E. T. & W. R. TRENTHAM. 1998. Staining paraffin extracted, alcohol rinsed and dried plant tissue with an aqueous mixture of three dyes. *Biotech. & Histochem.* 73: 178-185.
- HOROBIN, R. W. 2002. Biological staining: mechanisms and theory. *Biotech. & Histochem.* 77: 3-13.
- JENSEN, W. A. 1962. *Botanical Histochemistry*. W. H. Freeman & Co., San Francisco.
- KIERNAN, J. A. 1996. Staining paraffin sections without prior removal of the wax. *Biotech. & Histochem.* 71: 304-310.
- KIERNAN, J. A. 2001. Classification and naming of dyes, stains and fluorochromes. *Biotech. & Histochem.* 76: 261-277.
- KRAUS, J. E., H. C. DE SOUZA, M. H. REZENDE, N. M. CASTRO, C. VECCHI & R. LUQUE. 1998. Astra blue and Basic fuchsin double staining of plant materials. *Biotech. & Histochem.* 73: 235-243.
- MA, Y., V. K. SAWHNEY & T. A. STEEVES. 1993. Staining of paraffin-embedded plant material in Safranin and Fast green without prior removal of the paraffin. *Canad. J. Bot.* 71: 996-999.
- MÁÁ CZ, G. J. & E. VÁ GÁS. 1961. A new method for staining for cellular and lignified cell-walls. *Mikroskopie* 16: 40-43.
- PRENTØ, P. 2001. A contribution to the theory of biological staining based on the principles for structural organization of biological macromolecules. *Biotech. & Histochem.* 76: 137-161.
- SASS, J. E. 1958. *Botanical Microtechnique*. 3rd ed. Iowa State University Press, Ames, IA.
- SAKAI, W. S. 1973. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using Toluidine blue O. *Stain Technol.* 48: 247-249.
- STEWART, W. A. & A. M. SCHERTIGER. 1949. Brilliant Cresyl blue as a stain for plant chromosomes. *Stain Technol.* 24: 39.
- STRITTMATTER, C. G. 1980. Coloración con Violeta de Cresilo. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 19: 273-276.
- TAYLOR, K. B. 1961. The influence of molecular structure of thiazine and oxazine dyes on their metachromatic properties. *Stain Technol.* 37: 73-83.
- WOESSNER, E. 1970. Astrablau-Safranin – noch einfacher. Botanische Mikropräparate mit geringstem aufwand. *Mikrokosmos* 59: 31-32.

Recibido el 25 de Octubre de 2002, aceptado el 20 de Noviembre de 2002.