

---

## EL PRIMER MÉTODO DE IMPREGNACIÓN ARGÉNTICA APLICADO AL ESTUDIO DE PROTOZOOS CILIADOS

---

DIMAS FERNÁNDEZ-GALIANO  
Facultad de Biología. Universidad  
Complutense de Madrid. Madrid, España.  
Publicado originalmente en:  
*An. Soc. Mex Hist. Cienc. Technol.*, (5):  
75-84.1979.

Los protozoos ciliados, a pesar de tratarse de un material biológico de morfología muy compleja, muestran cuando se les observa "in vivo" a través del microscopio óptico, la apariencia de una gran simplicidad. Esta circunstancia ha dificultado mucho en el pasado el desarrollo de las ideas sobre la sistemática y la evolución de estos seres, ya que durante muchos años ha sido imposible realizar en ellos las detalladas observaciones morfológicas que han constituido desde siempre (y continúan siéndolo todavía) el principal fundamento de los estudios sobre la evolución de los distintos grupos de animales.

Más tarde, valiéndose de procedimientos de fijación y coloración tomados en su mayor parte de los histólogos, pudieron los protozoólogos comprobar la existencia de una serie de estructuras que se presentan en los distintos ciliados con una disposición diferente, habiéndose llegado a la conclusión de que la variación de tales estructuras nos puede ilustrar muy eficazmente sobre los avatares evolutivos sufridos por cada especie de ciliado y, en consecuencia, nos puede servir para establecer, en la medida de lo posible una sistemática científica de este importante grupo de protozoos.

A este respecto, la más valiosa y significativa de estas estructuras es el conjunto de cilios o ciliación, pero sobre todo la llamada infraciliación, que comprende el conjunto de los cinetosomas o gránulos basales de los cilios, que aparecen en los ciliados ordenados en unas filas denominadas cinetias.

Hay que advertir que el concepto de infraciliación ha sufrido cierta variación a lo largo del tiempo y aun hoy resulta a veces algo impreciso. En 1929 crearon E. Chatton, A. Lwoff y M. Lwoff esta palabra ("infraciliature") para designar a un conjunto de cinetosomas desnudos, es decir, sin cilios, que podían dar lugar a una ciliación completa en un determinado momento del ciclo biológico del protozoo; sin embargo, la mayor parte de los autores modernos emplean esta palabra para designar en todo o en parte al conjunto de las filas de cinetosomas que aparecen en la corteza del ciliado, prescindiendo de que den o no lugar a sus respectivos cilios, e incluso en muchos trabajos se extiende más o menos explícitamente a el concepto de infraciliación, no sólo a los cinetosomas ordenados en cinetias sino también a las diversas estructuras fibrilares, microfibrilares o microtubulares que dependen de aquéllos.

Pues bien, los cinetosomas, denominados también corpúsculos basales, observados primeramente por Eimer (1877), se pusieron de manifiesto tradicionalmente tiñéndolos con colorante de anilina hasta que para su mejor visualización se comenzaron a emplear varias técnicas de impregnación argéntica, tan superiores a los métodos antiguos que los han desplazado prácticamente por completo, constituyendo hoy, junto con las técnicas de microscopía electrónica, los mejores auxiliares del investigador especializado en el estudio de los ciliados desde el punto de vista morfológico, sistemático y taxonómico.

Como es sabido, los métodos de impregnación por sales de plata fueron ideados por los histólogos y utilizados por ellos para el estudio de muchas y diversas estructuras de diferentes tejidos, singularmente el tejido nervioso, desde que Golgi, hacia 1880, ideó su célebre método del bicromato argéntico; muchos de los grandes investigadores de la histología a nivel de microscopía óptica utilizaron e idearon métodos de plata, como Bielschowsky, Schultze y, sobre todo Ramón y Cajal y los demás histólogos de la escuela española, como del Río-Hortega, Achúcarro, Tello, Castro, Costero, etc., los cuales sin embargo, los aplicaron exclusivamente a los animales pluricelulares y no a los protozoos.

Como se ha dicho anteriormente los métodos de impregnación argéntica son hoy muy utilizados por los especialistas en ciliados no habiendo sido desplazados por la microscopía electrónica, de la que resultan ser un

complemento de valor inestimable. En efecto, los métodos de plata proporcionan en el caso de los ciliados unas imágenes panorámicas de la infraciliación muy difíciles de obtener con el microscopio electrónico, ya que con este último sólo pueden obtenerse imágenes (que, por otra parte, son extraordinariamente útiles) de porciones del protozoo y nunca de éste entero.

Los métodos argénticos más utilizados en la actualidad por los investigadores que se ocupan de la infraciliación de los ciliados son los siguientes:

a) Método de Klein (1926). Este método, al igual que sus modificaciones (Gelei, 1935, por ejemplo) está hoy prácticamente abandonado, aunque todavía lo usan algunos autores para complementar las imágenes que se obtienen con otros procedimientos. Tiene el mérito de ser el más antiguo de los que se han venido utilizando y consiste esencialmente en dejar secar los ejemplares sobre un portaobjetos y tratarlos a continuación con una solución de nitrato de plata, que se reduce después a la luz. El método pone en evidencia el "argiroma", conjunto de líneas que más o menos nos dan cuenta de la topografía de la infraciliación, aunque no tiñe específicamente ésta.

b) Método de Chatton y Lwoff (1930). Este sistema se basa en la inclusión en gelatina de los ejemplares y su tratamiento, igual que en el caso anterior, por el nitrato de plata. La reducción de la sal argéntica se hace mediante la luz ultravioleta. Este proceder, que todavía es utilizado muy profusamente, pone de manifiesto con gran nitidez los cinetosomas y los sacos parasomales, que son unas pequeñas depresiones de la película situadas en la vecindad de aquéllos.

c) Método del protargol. El proteinato de plata o protargol fue introducido en la técnica microscópica en 1936 por Bodian, el cual teñía con este compuesto las fibras nerviosas incluidas en parafina. El método fue adaptado a los protozoos por Kirby (1950) y modificado para su utilización con los ciliados por muchos autores, de los que el más importante es Tuffrau, quien publicó en 1967 unas indicaciones sumamente precisas para la realización correcta de este proceder, junto con una valiosa información bibliográfica sobre el mismo en la que se citan los autores que lo han ido modificando a partir de Kirby. Con el método del protargol se consiguen unos resultados extraordinarios en la impregnación de los cinetosomas e incluso de los cilios, lo que le ha valido ser ampliamente utilizado, con las modificaciones introducidas por Truffau, especialmente para el grupo de los hipotricos, en los cuales se obtienen unos resultados inmejorables.

d) Por último, debo aquí mencionar un método original del que firma este escrito y que viene siendo bastante utilizado últimamente. Este método fue ideado por mi el año de 1965, en que lo presenté al Congreso Internacional de Protozoología de Londres, y publicado el año siguiente (Fernández-Galiano, D., 1966). Sin embargo, los resultados no eran lo suficientemente constantes, por lo que tuve que esforzarme en modificarlo, logrando al fin unos resultados razonablemente constantes valiéndome de las modificaciones que publiqué en 1976. Este método utiliza el carbonato de plata de Río-Hortega adicionado de piridina para la impregnación y el formol para la fijación y para la reducción de la solución argéntica y muestra una gran precisión en la impregnación de los cinetosomas; no obstante, su ventaja principal frente a otros procedimientos estriba en que también impregna con gran perfección las fibras cinetodésmicas, lo que no se logra con ninguna otra técnica argéntica.

\* \* \*

Todo lo anteriormente escrito sirve de prólogo -quizá demasiado largo- para recordar aquí un antecedente olvidado del hoy habitual tratamiento con métodos argénticos de los protozoos ciliados, antecedente que data nada menos que de 1916, es decir, de diez años antes de que al alemán Bruno Klein se le ocurriera la idea de utilizar la plata para poner de manifiesto en los ciliados su "Silberliniensystem" (como denominó él al hoy comúnmente designado argiroma). Efectivamente, el primero que empleó la plata para la impregnación de diversos orgánulos en los ciliados y en flagelados fue el profesor D. Emilio Fernández Galiano, mi difunto padre y mi maestro también en mis primeros pasos por el campo de la Protozoología.

D. Emilio Fernández Galiano (1885-1953) era a la sazón Catedrático de Histología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Barcelona y sus aficiones científicas se dividían a partes iguales entre la Histología (fundamentalmente la histología de los invertebrados) y la Protozoología.

Su afición a esta ciencia puede datarse a partir de 1913, fecha en que estuvo algún tiempo en la Universidad de Bonn (Alemania) trabajando en el laboratorio del gran fisiólogo alemán Max Verworn, del que guardó siempre un recuerdo entrañable.

Fue precisamente en el laboratorio de Verworn donde el por entonces joven profesor comenzó sus estudios

protozoológicos y precisamente, como es lógico dada la especialidad científica del maestro alemán, investigando sobre ciertos aspectos de la fisiología de los protozoos.

Fruto de su permanencia en Bonn y de su trabajo ulterior en Barcelona fueron una serie de artículos sobre la quimotaxis de diversos protozoos, el primero de los cuales se publicó en Alemania (Fernández Galiano, E., 1914a) y otros en España (Fernández Galiano, E., 1914b, 1920), así como sobre la contractilidad del pedúnculo de las vorticelas (Fernández Galiano, E., 1922) con cuyo material tuvo la fortuna de realizar un interesante descubrimiento, ya que pudo demostrar experimentalmente con unos medios técnicos realmente insignificantes pero con una gran habilidad de investigador, que el citado pedúnculo de las vorticelas se contrae de acuerdo con la denominada por los fisiólogos "ley del todo o nada"; este hecho fue publicado en Francia y en España en el año de 1924 (Fernández Galiano, E., 1924).

Su vocación protozoológica se concretó por aquellos años en la publicación de un libro "Morfología y Biología de los Protozoos" que se ha de recordar aunque no sea más que por el hecho de ser el primer libro que trata exclusivamente sobre estos organismos publicado en español (Fernández Galiano, E., 1921).

De acuerdo con su doble condición de histólogo y protozoólogo, el profesor Fernández Galiano, que dominaba por su primera vocación los métodos de impregnación argéntica de la escuela española de Histología, y que conocía perfectamente gracias a la segunda el material protozoológico, tuvo la acertada idea de probar en los cultivos de su laboratorio una técnica que entonces estaba muy en boga y era de mucho éxito: el método del nitrato de plata reducido con previa fijación por el urano-formol, que Cajal había ideado pocos años antes (Ramón y Cajal, 1912).

El resultado de ello fue la publicación en la revista *Treballs de la Societat de Biologia*, editada por Institut de Ciencies de la Ciudad de Barcelona del trabajo titulado "La acción del nitrato de plata reducido (fijación al urano-formol) sobre algunos protozoos", que vio la luz, como se ha dicho anteriormente, en 1916.

Este trabajo (publicado en idioma castellano, aunque el título de la revista y la mayoría de los trabajos en ella publicados están redactados en lengua catalana) consta de una breve introducción y de una parte experimental en la que muestra los resultados obtenidos, los cuales se ilustran con cinco microfotografías en sendas láminas y siete dibujos en el texto<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup>Desgraciadamente, este trabajo fue desde el principio de difícil consulta, dada la escasa difusión de la revista donde se publicó. Poseo una carta fechada en 1925 y dirigida por P.P. Grassé (a la sazón en Montpellier) a mi padre, en la que le pide que le envíe una copia del trabajo, con las siguientes palabras "J'ai cherché mais en vain votre mémoire intitulé..., etc."

En la introducción, aparte de indicar las características del método de impregnación seguido, se manifiestan los objetivos del trabajo, los cuales, curiosamente, no se alcanzaron. Efectivamente, el autor nos dice que ha intentado poner de manifiesto en los protozoos el "aparato reticular interno" de Golgi, animado por los éxitos obtenidos por los histólogos al aplicar la técnica del nitrato de plata reducido con fijación por el urano-formol, la cual, dice "ha llegado a constituir un excelente recurso técnico para lograr la impregnación del susodicho retículo endocelular". Sin embargo, en los protozoos no pudo mi difunto padre demostrar retículo de Golgi alguno, lo que no es obstáculo para que él, que estaba dotado de un extraordinario sentido crítico frente a los hechos científicos, no llegó a deducir -lo que hubiera sido erróneo- que no hay aparato de Golgi en estos organismos, sino que mostró una gran cautela afirmando:

"Sería muy aventurado afirmar rotundamente, en vista de este resultado, la no existencia del retículo de Golgi en los infusorios, pues, por una parte, las experiencias efectuadas por nosotros, aunque relativamente numerosas, han recaído sobre un corto número de especies y empleando exclusivamente el citado método de Cajal, y, por otra, no tendría nada de particular que la extraordinaria complejidad de la única célula que compone el cuerpo de dichos animales enmascarase o disimulase la presencia del aparato reticular. Esto lo han de resolver futuras y detalladas exploraciones".

Más adelante, en la parte experimental, da cuenta de los resultados obtenidos en la impregnación de los siguientes protozoos: *Paramecium*, *Colpidium*, *Urotricha*, *Amphileptus* y *Chilomonas* procedentes de infusiones y *Nyctotherus*, *Balantidium* y *Opalina* procedentes del intestino de ranas. De ellos, la mayoría son ciliados, pues

solamente *Chilomonas* y *Opalinas* son flagelados, aunque para el autor del trabajo, dada la fecha en que lo redactó, las opalinas eran también ciliados (pertenecientes para la mayoría de los autores contemporáneos a los holotricos, aunque ya para aquellas fechas había creado Metcalf (1900) la subclase protociliata para estos protozoos).

En lo que atañe a los ciliados (incluyendo aquí las opalinas como acabo de decir) los resultados fueron ciertamente dispares, pero en todos ellos se lograron teñir, con mayor o menor constancia y regularidad, los gránulos basales de los cilios. Los mejores resultados los obtuvo en los parásitos de la cloaca de la rana, observando en *Nyctotherus* que "el sistema de corpúsculos basales aparece perfectamente impregnado por la plata, tanto las líneas meridianas de corpúsculos, que van de un extremo a otro del cuerpo..."; y en *Balantidium* que "los corpúsculos basales muéstranse bien dibujados, llegándose a ver todas las líneas meridianas que forman... percibiéndose el sistema de corpúsculos en su totalidad".

No nos puede extrañar que con el método de Cajal empleado por Fernández Galiano, como con el de Chatton y Lwoff, que es todavía hoy el más utilizado para la demostración de los gránulos basales, se ponga claramente de manifiesto la infraciliación, pues ambos, en suma, utilizan la misma sal argéntica (el nitrato de plata), que en el segundo se reduce por la luz y en el primero por la hidroquinona. Hay que decir, sin embargo, que mientras Edouard Chatton se dedicó con ahínco a trabajar con su método original, dejándonos una pléyade de trabajos con los que puso por primera vez las bases de una correcta sistemática de los ciliados, el investigador español no siguió por este camino que podría haber sido extremadamente fructífero, quedándose así en un precursor del empleo de estos métodos argénticos que tan preciosos resultados dieron después en las manos de Fauré-Fremiet, Corliss, De Puytorar, Lom y tantos otros protozoólogos contemporáneos.

\* \* \*

Sólo me queda añadir unas líneas para comentar brevemente un resultado de cierto interés que se menciona en el trabajo que estamos comentando en el flagelado *Chilomonas paramecium*, objeto también, como dije anteriormente, de la impregnación argéntica.

Tratados por el tantas veces mencionado método de Cajal, el profesor Fernández Galiano no pudo poner de manifiesto estructura alguna fuera de una "red irregular" de plata reducida depositada sobre "dos corpúsculos refringentes situados en el tercio anterior de la célula" que él mismo pudo observar "in vivo" y describir someramente, afirmando: "En ninguna de las numerosas descripciones de *Chilomonas* que hemos leído hemos encontrado la menor alusión a tales corpúsculos". Pues bien, dichas formaciones, que han sido denominadas por Deflandre (1938) corps de Maupas" (en mi opinión erróneamente pues no consta que el insigne protozoólogo del siglo pasado los haya visto), creo que es la primera vez que aparecen en la literatura, pudiendo por consiguiente considerarse como primera cita la que aparece en el trabajo que estamos comentando; después de que se mencionaran por mi padre en 1916 han tratado de estos corpúsculos varios autores (Hall, 1930; Mast y Doyle, 1935; Gatenby y Smith, 1938), todos ellos ignorantes de los antecedentes bibliográficos al respecto, especialmente de aquel antiguo trabajo. No solamente los descubrió y los dibujó mi padre en aquellas lejanas fechas, sino los volvió a estudiar veintiséis años después (Fernández Galiano, E., 1942), hallando entonces que los "elipsoides", nombre que les asignó en este último trabajo, están contenidos en el interior de una minúscula vacuola, por lo que los consideró como unos productos de secreción elaborados por la célula, contradiciendo las opiniones emitidas hasta entonces sobre su significación funcional (Hall, vacuolas pulsátiles accesorias; Gatenby y Smith, pirenoides; Mast y Doyle, manchas oculares rudimentarias). Para terminar, diré que para el último autor que conozco que haya tratado de estos corpúsculos (Hollande, 1952), significarían un particular material de reserva.

#### REFERENCIAS

- BODIAN, D., 1936. A new method for staining nerve fibers and nerve endings in mounted paraffin sections. *Anat. Rec.*, 65: 89.
- CHATTON, E. et A. LWOFF, 1930. Impregnation, par diffusion argentique, de l'infraciliature des cilies marine et d'eau douce, apres fixation cytologique et sans dessication. *C.R Soc. Biol.*, 104: 834-836.
- CHATTON, E., A. LWOFF et M. LWOFF, 1929. Les infraciliatures et la continuité génétique des systèmes ciliares

- récésifs. *C. R Acad. Sc.*, 188: 1190-1192.
- DEFLANDRE, G., 1938. Les corpuscules biréfringents des cilies et des cryptomonadines. *Bull. Soc. Fr. Micr.*, 7: 110-129.
- EIMER, TH., 1877. Weitere Nachrichten über den Bau des Zellkernes, nebst Bemerkungen über Wimperreepithelium. *Arch.f. mikr. Anat.*, 14.
- FERNÁNDEZ-GALIANO, D., 1966. Une nouvelle méthode pour mettre en évidence l'infaciliature des Ciliés. *Protistologica*, 2: 35-38.
- FERNÁNDEZ-GALIANO, D., 1976. Silver impregnation of Ciliated Protozoa: Procedure yielding good results with the pyridinated silver carbonate method. *Trans. Amer. Micr. Soc.*, 95: 557-560.
- FERNÁNDEZ GALIANO, E., 1914. Beitrag zur Untersuchung der Chemotaxis der paramäcium. *Zeitschr. f. allg. Physiol.*, 16: 359-372.
- FERNÁNDEZ GALIANO, E., 1914. Datos para el conocimiento de la quimiotaxis de los infusorios. *Treb. Soc. Biol. Barcelona*, 4.
- FERNÁNDEZ GALIANO, E., 1916. La acción del nitrato de plata reducido (fijación al urano-formol) sobre algunos protozoos. *Treb. Soc. Biol. Barcelona*, 6: 21-23.
- FERNÁNDEZ GALIANO, E., 1920. Contribución al estudio de las reacciones quimiotácticas del flagelado "Chilomonas". *Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat.*, 20: 282-301.
- FERNÁNDEZ GALIANO, E., 1921. Morfología y Biología de los Protozoos. Madrid (Calpe).
- FERNÁNDEZ GALIANO, E., 1922. Observaciones sobre la contractilidad de *Vorticella*. *Bol. R Soc. Esp. Hist. Nat.*, 22: 212-233.
- FERNÁNDEZ GALIANO, E., 1924. L'application de la loi du "tout ou rien" à l'enroulement du pédoncule des *Vorticelles*. *C E. Soc. Biol.*, 40: 810-819.
- FERNÁNDEZ GALIANO, E., 1924. La Ley del "todo o nada" aplicada al arrollamiento del pedúnculo de *Vorticella*. *Bol. R Soc. Esp. Hist. Nat.*, 24: 33-43.
- FERNÁNDEZ GALIANO, E., 1942. Sobre cierta estructura existente en el citoplasma del flagelado *Chilomonas paramecium*. *Bol. R Soc. Esp. Hist. Nat.*, 40: 93-104.
- GATENBY, J.B. and J.O. SMITH, 1938. The Golgi apparatus and pyrenoids of *Chilomonas paramecium*, with remarks on the identification of *Copromonas subtilis*. *Quart. J. Micr. Soc.*, 81: 567.
- GELEI, J.V., 1935. Eine neue Abänderung der Kleinschan trockenen Silbermethode und das Silberliniensystem von *glaucoma scintillans*. *Arch. f. protistenk*, 84: 446-455.
- HALL, R.P., 1930. Osmophilic inclusions similar to Golgi apparatus in the Flagellates, *Cromulina*, *Chilomonas* and *Astasia*. *Arch. f. Protistenk*, 69: 7-22.
- HOLLANDE, A., 1952. Classe des Cryptomonadines (Cryptomonadina Ehrenberg, 1832); en *Traité de Zoologie* (ed. P.P. Graseé), t. I, 285-308.
- KIRBY, H., 1950. Materials and methods in the study of Protozoa. Los Angeles, Univ. of California Press.
- KLEIN, B.M., 1926. Ergebnisse mit einer Silbermethode bei Ciliaten. *Arch. f. Protistenk*, 56: 243-279.
- MAST, S.O. and W.L. DOYLE, 1935. A new type of cytoplasmic Structure in the Flagellate *Chilomonas paramecium*. *Arch. f. Protistenk*, 85: 145-149.
- METCALF, M.M., 1909. *Opalina*. *Arch. f. Protistenk*, 13: 195-375.
- RAMÓN Y CAJAL, S., 1912. Fórmula de fijación para la demostración fácil del aparato reticular de Golgi y apuntes

sobre la disposición de este aparato en la retina, en los nervios y en algunos estados patológicos. *Trab. lab. Inv. Biol.*, 10.

TUFFRAU, M., 1967. Perfectionnements et pratique de la technique d'imprégnation au Protargol des ifusoires Ciliés. *Protistologica*, 3: 91-98.