

LA ACCIÓN DEL NITRATO DE PLATA
REDUCIDO (FIJACIÓN AL URANO-FORMOL)
SOBRE ALGUNOS PROTOZOOS

por

E. FERNÁNDEZ GALIANO

Hace unos veinte años que Golgi, valiéndose del método de impregnación al cromato de plata, descubrió en las células nerviosas de los ganglios raquídeos una red irregular de trabéculas gruesas, unidas entre sí por otras más finas, difícilmente discernibles algunos a causa de su tenuidad, y rodeando más o menos completamente el núcleo de los citados elementos histológicos: tal formación endocelular fué bautizada por su descubridor con el nombre de *aparato reticular interno*.

Numerosos histólogos se han aplicado en los últimos años, no sólo al estudio del aparato reticular en las células nerviosas, sino a la pesquisa de él en las células de los demás tejidos, con éxito en la mayoría de los casos, como lo demuestra el haber sido descubierto el retículo endocelular de Golgi en los epitelios de diversos órganos, en las mieloplaxias, en las células adiposas, en las cartilaginosas y óseas, en las fibras musculares, en los hematíes, etc.

El método del cromato de plata, como revelador del aparato endocelular de Golgi, fué prontamente abandonado a causa de la inconstancia en su modo de obrar y sustituido por el del nitrato de plata reducido que, a través

de sucesivos perfeccionamientos, ha llegado a constituir un excelente recurso técnico para lograr la impregnación del susodicho retículo endocelular.

La circunstancia de encontrarse en tantas clases de células, unida al hecho de que, durante la división carioquinética — según lo prueban Perroncito, Deineka y Fañanás — el aparato endocelular se disgrega en gránulos sueltos que después se reparten entre las dos células hijas para reconstruir en cada una de ellas el retículo de Golgi, es motivo para suponer en tal aparato una elevada jerarquía fisiológica, y quizá para estimarlo, según quiere Cajal, como un elemento constante del protoplasma celular.

Con el deseo de comprobar si tal generalización podría extenderse fuera del campo de las células federadas y ser aplicada a las de vida independiente, hemos emprendido hace algún tiempo investigaciones en este sentido, tratando infusorios de diversas especies por el método descrito por nuestro Cajal en 1912. Dicho método consta, en resumen, de las siguientes operaciones:

1.º Inmersión de los objetos de estudio (reducidos a piezas de dos a dos y medio milímetros de espesor) durante ocho a veinticuatro horas en este líquido fijador:

Nitrato de urano	1 gramo
Formol	15 gramos
Agua	100 »

2.º Lavado rápido (durante algunos segundos) en agua destilada.

3.º Inmersión de las piezas lavadas en una solución acuosa de nitrato argéntico al 1, 1'50 ó 0'75 por 100 durante veinticuatro o más horas.

4.º Lavado rápido de las piezas en agua destilada dos veces seguidas.

5.º Inmersión de los objetos de estudio en el líquido reductor siguiente:

Hidroquinona	2 gramos
Formol	6 »
Agua	100 »
Sulfito de sosa anhidro..	0'15 a 0'25 »

(La cantidad de sulfito sódico es la necesaria para dar a la solución un tinte ligeramente amarillo.)

6.º Lavado en agua, alcoholes, aclarante, etc.

Naturalmente, nos hemos visto obligados a disminuir el tiempo de permanencia de las piezas en cada uno de los líquidos, en armonía con la exigüidad del espesor de ellas.

En cuanto a los resultados de nuestra labor debemos declarar, ante todo, que no hemos hallado el aparato endocelular en los protozoos estudiados (1), habiendo observado, en cambio, ciertas particularidades en el modo de impregnación de tales organismos unicelulares que, a nuestro parecer, no están exentas de interés y que describiremos en las páginas siguientes. Para ser ordenados, daremos cuenta sucesivamente de los resultados obtenidos en cada uno de los infusorios observados.

Género «Paramaecium»

Los individuos del género *Paramaecium* se producen

(1) 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.

en abundancia extraordinaria en las infusiones de materias organizadas, tanto vegetales como animales.

El tiempo que estos infusorios han permanecido en el fijador al urano-formol ha sido diferente en cada experimento efectuado: los mejores resultados han sido conseguidos cuando el tiempo de fijación no ha pasado de quince minutos. En la solución argéntica al 1 por 100 hemos conservado los infusorios fijados tiempos variables que oscilan entre tres cuartos de hora y seis horas: el resultado ha sido sensiblemente el mismo a igualdad de tiempo de fijación; si el baño en el nitrato de plata dura menos de cuarenta o cuarenta y cinco minutos, se corre el riesgo de obtener una impregnación insuficiente. Finalmente, la reducción en la hidroquinona se opera felizmente en treinta o cuarenta minutos.

Como es sabido, el protoplasma de los *Paramaecium* aparece sembrado de inclusiones de forma perfectamente esférica que no son otra cosa que vacuolas digestivas o estómagos accidentales en donde se verifica la digestión de las partículas alimenticias ingeridas por el animal.

Según Nirenstein, el proceso digestivo en los infusorios pestañosos consta de dos fases: durante la primera disminuye el tamaño de la vacuola digestiva por pérdida de agua, se produce la secreción en la vacuola de una sustancia mucosa procedente del protoplasma ambiente, al mismo tiempo que se acusa en el líquido de la propia vacuola una reacción ácida que, según se ha demostrado, es debida a la presencia de un ácido mineral libre. Con ayuda de las coloraciones vitales demostró, además, Nirenstein, que en este período ingresan en la vacuola finos gránulos que se tiñen intensamente con el rojo neutro (gotas o gránulos de secreción).

En el segundo período aumenta de tamaño la vacuola por absorción de agua, y se fragmentan las partículas in-

geridas en gránulos que, finalmente, desaparecen por disolución. En este segundo período muestra el líquido de la vacuola una reacción alcalina.

Por lo que atañe a las vacuolas digestivas, el resultado obtenido con el empleo del método de Cajal es el siguiente (microfotografía 1.^a) (1): impregnación enérgica en negro de unos gránulos muy pequeños, que, por su tamaño y situación, corresponden a las finísimas gotas de secreción que ingresan en la vacuola; impregnación menos enérgica de los cuerpos alimenticios ingeridos, que aparecen de color café más o menos obscuro; el líquido de la vacuola queda incoloro o, cuando más, pintado de un leve color pardo. Esta reacción es muy constante.

Cuantos conocen la anatomía de los infusorios pestañosos saben que al pie de cada pestaña existe un corpúsculo de forma redondeada u ovalada, designado con el nombre de *corpúsculo basal*: y como quiera que las pestañas vibrátiles están dispuestas en el cuerpo del infusorio formando líneas meridianas de uno a otro extremo del eje mayor del cuerpo, dicho se está que la misma disposición en filas afectan los corpúsculos basales.

Los corpúsculos basales se impregnan en algunos ejemplares del género *Paramaecium* tratados por la plata reducida y aparecen bajo la forma de puntos negros; las líneas formadas por estos puntos negros no se revelan de una manera neta en la mayoría de los individuos, haciéndose visibles solamente fragmentos de ellas. Por regla general, se ven en la superficie de cada individuo un gran número de puntos negros pequeñísimos: es probable que

(1) Para hacer las microfotografías que acompañan este trabajo, nos han prestado su cooperación personal y han puesto a nuestra disposición el material del Laboratorio de Histología de la Facultad de Medicina, el catedrático D. Carlos Calleja y su discípulo Sr. Fornells. Nos complacemos en dar las gracias a ambos señores.

la mayoría de ellos no correspondan a los corpúsculos basales, sino que sean simples depósitos argénticos accidentales.

En el protoplasma de los *Paramaecium* (así como en el de otros muchos protozoos) se observan ciertos granos de apariencia cristalina, muy refringentes, anhistos, y que son considerados como productos de excreción (*Exkretkörper*), constituidos verosímilmente por fosfato cálcico. El nitrato de plata reducido se comporta con estos cristales de una manera, al parecer, caprichosa, pues mientras algunos son fuertemente teñidos en negro, quedan otros a su lado completamente incoloros o con tinte más o menos parduzco. Un poco por encima del centro del ejemplar representado en la microfotografía 1.^a se ve un grupo de tales cristales de excreción.

Género «*Colpidium*»

Los individuos pertenecientes a este género pueden ser obtenidos facilísimamente, pues se desarrollan y multiplican abundantemente en el seno de infusiones de materias organizadas, tales como heno, estiércol, etc.

El tiempo que han permanecido tales células en cada uno de los líquidos empleados en el método de Cajal ha sido próximamente el mismo que para los protozoos del género *Paramaecium*.

Hemos conseguido así la impregnación de las gotas de secreción de las vacuolas digestivas, que se destacan en color negro (fig. 1.^a), así como también la de las partículas ingeridas que, al igual que en los *Paramaecium*, ostentan un tono café de intensidad variable, rodeadas por un líquido vacuolar amarillento o incoloro (microfotografía 2.^a). Lo mismo también que en los *Paramaecium*, algunos cor-

púsculos basales aparecen correctamente impregnados, formando filas que, de ordinario, quedan rotas e interrumpidas.

Género «*Urotricha*»

Infusorios pestañosos caracterizados por poseer un flagelo situado en el extremo posterior del cuerpo de una longitud igual o superior a la de éste.

Se verifica una impregnación argéntica sobre las partículas encerradas en las vacuolas digestivas (fig. 2.^a), tiñéndolas de negro y destacándolas en el seno de un líquido vacuolar amarillento o café. Se observan también algunos gránulos negros dispersos por la superficie celular (precipitados accidentales) y quizá algún que otro corpúsculo basal.

Estos infusorios han estado en cada uno de los reactivos el mismo tiempo, poco más o menos, que los *Colpidium* y *Paramecium*.

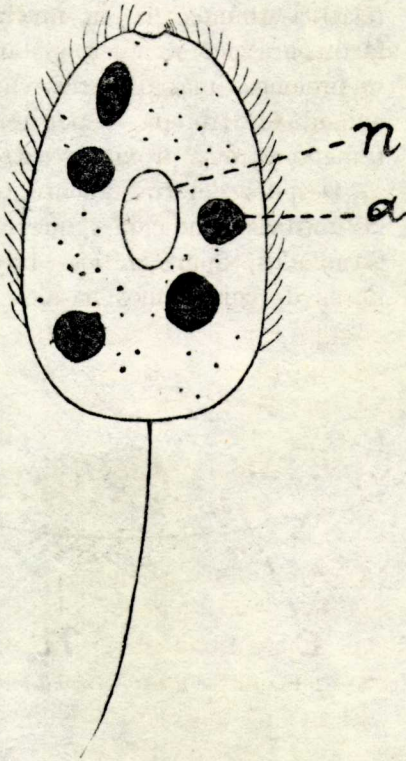


Fig. 2.^a—Infusorio del género *Urotricha*.—a) vacuolas digestivas.—n) núcleo.

Género «*Amphileptus*»

Los protozoos del género *Amphileptus* se hallan con relativa abundancia en muchas infusiones. Se conocen fácilmente por su cuerpo alargado, cuya parte anterior se prolonga más o menos en una porción muy flexible a modo de trompa, y por tener dos núcleos del mismo tamaño y muy próximos entre sí.

Después del tratamiento por el método de Cajal en las mismas condiciones que los infusorios anteriormente estudiados, aparecen los *Amphileptus* surcados por las líneas de corpúsculos basales teñidos en negro (fig. 3.^a):

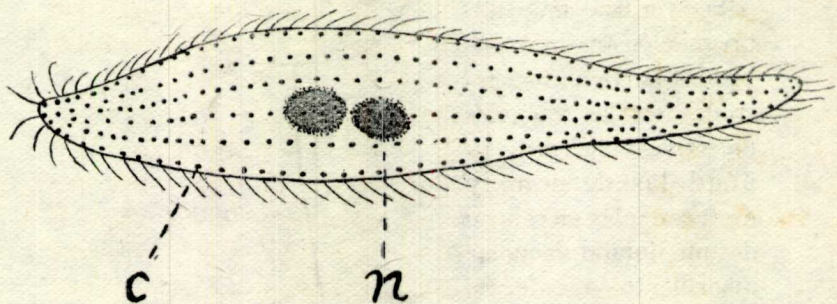


Fig. 3.^a—Infusorio del género *Amphileptus*.—c) corpúsculos basales.—n) núcleo.

muchos de estos puntos negros son relativamente gruesos, por lo que deducimos que alrededor de cada corpúsculo basal, como centro, se ha precipitado la plata envolviéndolo completamente. A veces el precipitado sobre las líneas de corpúsculos basales se verifica irregularmente, de modo que algunos granos se unen con los vecinos formando líneas gruesas y tortuosas.

Toda la superficie celular muéstrase, además, salpicada de finísimas granulaciones, sólo perceptibles con fuertes

aumentos y que, verosímilmente, representan depósitos fortuitos de plata reducida.

Los núcleos se revelan en casi todos los ejemplares observados por su color amarillo y aspecto homogéneo, resaltando sobre el fondo incoloro del protoplasma. Alrededor de ellos, según se ve en muchos ejemplares, y muestra la fig. 3.^a, se ha operado un depósito argéntico de gránulos de ínfimo espesor, constituyendo una atmósfera que los circunda.

Género «Chilomonas»

Son los *Chilomonas* flagelados de pequeño tamaño (de 30 a 40 micras de largo) que se hallan en cantidades enormes en las aguas con materias orgánicas en descomposición. En el interior del cuerpo de estos animales hay una gran cantidad de granos de almidón y, además, dos corpúsculos muy refringentes situados en el tercio anterior de la célula y cuya composición química es desconocida por nosotros. En ninguna de las numerosas descripciones de *chilomonas* que hemos leído hemos encontrado la menor alusión a tales corpúsculos; tratándolos por diversos reactivos nos hemos convencido de que no están formados por almidón (fig. 4.^a).

Tratados los *chilomonas* por el método de Cajal en las mismas condiciones que los infusorios ya estudiados, se ve como la plata se ha depositado sobre los corpúsculos de que acabamos de hablar, dibujando sobre cada uno de ellos una red irregular, según enseña la fig. 5.^a En la mayoría de los casos tales corpúsculos permanecen completamente invisibles, mostrándose solamente el retículo formado por el precipitado argéntico, pero, sin embargo, se divisan en ocasiones entre las mallas de la red teñidos de color amarillo. El aspecto de la red es dife-

rente en cada grano: la fig. 6.^a reproduce el aspecto de varios retículos tomados de otros tantos granos pertenecientes a células diversas.

Fuera de este pormenor nada hay que señalar en los

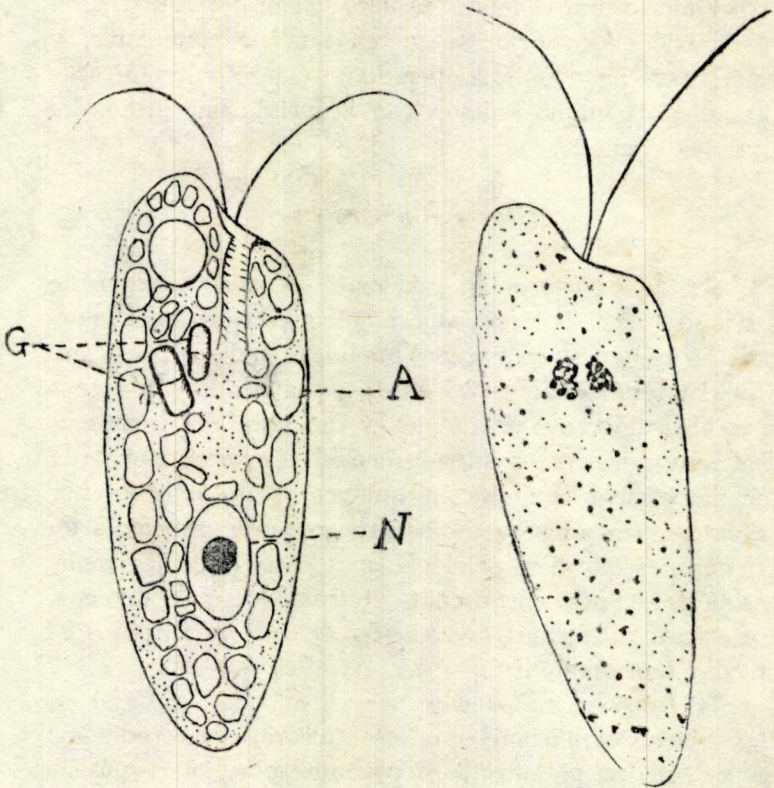


Fig. 4.^a—Flagelado del género *Chilomonas*.—A) granos de almidón.—G) granos de función desconocida.—N) núcleo.

Fig. 5.^a—*Chilomonas* tratado por la plata reducida.

Chilomonas, si no es hacer constar que, como de costumbre, se aprecian sobre la superficie numerosas y finas granulaciones que estimamos debidas a precipitaciones accidentales de la plata.

Género «*Nyctotherus*»

Infusorio ciliado parásito de la cloaca de la rana.

El sistema de corpúsculos basales aparece perfectamente impregnado por la plata, tanto que en muchos ejemplares preparados se ven a poco aumento todas las líneas meridianas de corpúsculos, que van de un extremo

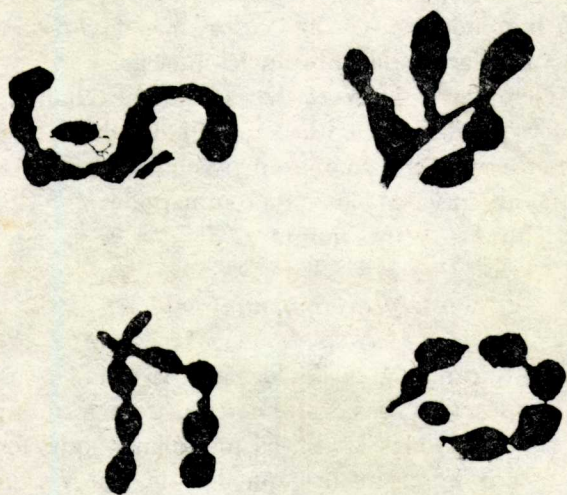


Fig. 6.^a — Aspecto de cuatro retículos de otros tantos *Chilomonas* diferentes después de la impregnación argéntica.

a otro del cuerpo, como lo muestra la microfotografía 3.^a Las imágenes de los corpúsculos que componen tales líneas no llegan a resolverse en la microfotografía, pues están muy próximos entre sí de modo que las series de ellos dan la impresión de líneas continuas. Pero, empleando buenos objetivos de inmersión, se aprecian perfectamente los corpúsculos separados unos de otros; de ello da idea la figura 7.^a El protoplasma se muestra teñido de amarillo.

Entre las filas de corpúsculos basales se han depositado algunos precipitados argénticos, pequeños, de contornos irregulares.

La plata se deposita también sobre el macronúcleo (microfotografía 4.^a) en forma de granulos de pequeñez extraordinaria, no imprimiendo a éste un color amarillo uniforme sin dejar ver detalles de estructura como, según dejamos apuntado, acontece en los *Amphileptus*, sino dibujando limpiamente en los casos más favorables una textura vacuolar de la substancia nuclear.

Los ejemplares de *Nyctotherus* que nos han servido para hacer esta descripción han sido fijados durante quince minutos en el urano-formol, han permanecido media hora en el baño argéntico y han estado sumergidos en el líquido reductor durante veinte minutos.

Género «*Balantidium*»

Habitante también en la cloaca de la rana.

Los corpúsculos basales muéstranse bien dibujados, llegándose a ver todas las líneas meridianas que forman, si bien menos intensamente que los de los *Nyctotherus*, de modo que se ven como puntos muy pequeños y un poco pálidos, aunque, repetimos, percibiéndose el sistema de corpúsculos en su totalidad.

En cambio, el macronúcleo se impregna de ordinario enérgicamente por el depósito sobre él de finas granulaciones argénticas (microfotografía 5.^a), que ponen de manifiesto también, en los casos más felices, una textura alveolar.

El protoplasma exhibe un tinte amarillo uniforme.

La impregnación de estos infusorios se ha llevado a cabo en las mismas condiciones reseñadas para los del género *Nyctotherus*.

Género «Opalina»

Infusorios corpulentos, parásitos, como los anteriores, en la porción terminal del intestino de la rana. Han sido sometidos al mismo tratamiento y en idénticas condiciones que los *Nyctotherus* y *Balantidium*.

Hemos conseguido la impregnación de los corpúsculos basales, que se destacan como puntos pequeñísimos, sólo visibles con grandes aumentos, sobre el fondo rojizo-amarillento del protoplasma; a pesar de la palidez con que se dibujan dichos corpúsculos, pueden seguirse en muchos casos todas las líneas meridianas.

Los muchos y pequeños núcleos que, como es sabido, se albergan en el protoplasma de estos infusorios, toman también la plata, si bien con menos avidez que los otros parásitos estudiados, de modo que se distinguen los núcleos bajo la apariencia de manchas de color amarillo o café claro y con contornos borrosos.

Contribuye a hacer imprecisas las imágenes de los núcleos la presencia de un sinnúmero de granulaciones finas de plata reducida que se depositan sobre la superficie de la célula.

Se sigue, pues, de nuestras investigaciones que (prescindiendo de los flagelados del género *Chilomonas*), fijando los infusorios ciliados por el urano-formol y sometiéndolos después al tratamiento por la plata reducida, los resultados son:

a) En los infusorios de vida libre, impregnación bien clara y manifiesta de ciertos elementos que forman parte de las vacuolas digestivas, así como una impregnación inconstante e incompleta de los corpúsculos basales;

b) En los infusorios parásitos de la rana, impregnación enérgica del núcleo (menos enérgica en los múltiples núcleos de las *Opalinas*) y más o menos intensa, pero siempre completa y constante, de los corpúsculos basales.

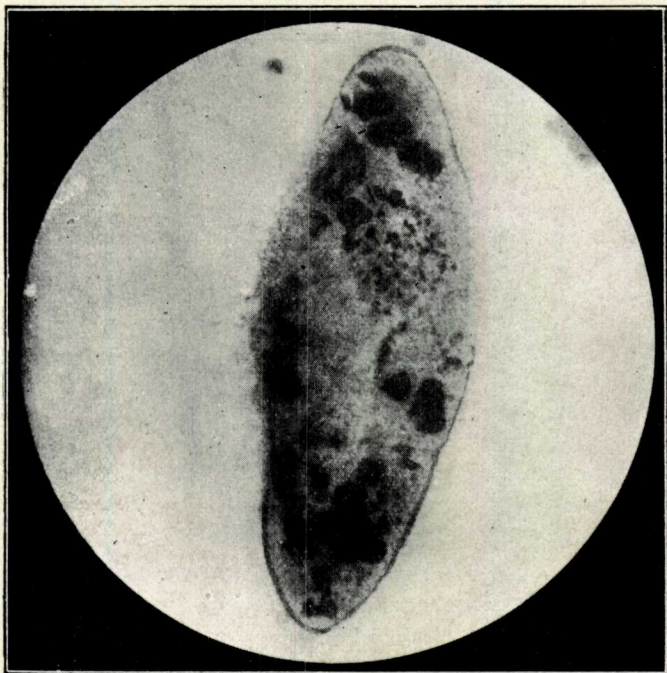
No queremos terminar sin hacer constar el hecho siguiente: tratados los infusorios objeto de nuestro estudio por el rojo neutro, substancia que, como se sabe, pertenece al grupo de los colorantes vitales, hemos observado cierta analogía entre las respectivas maneras de obrar del citado colorante y del nitrato de plata reducido.

En efecto, las partículas alimenticias contenidas en las vacuolas digestivas, así como también los finos gránulos que, según dijimos, ingresaban en las vacuolas, se tiñen tanto por el rojo neutro como por la plata reducida.

El rojo neutro no tiñe los núcleos celulares de los infusorios libres, haciéndolo, en cambio, cuando se trata de infusorios parásitos (1), comportamiento que, como se recordará, observa también la plata reducida y, es más, los núcleos de la *Opalina* que se impregnan flojamente con la plata, débilmente también se tiñen con el rojo neutro. Finalmente, cuando se tienen infusorios durante mucho tiempo en una solución de rojo neutro lo bastante concentrada para causarles a la larga la muerte, al sobrevenir el período que pudiéramos llamar agónico, los corpúsculos basales comienzan a aparecer bajo la forma de puntitos rojos que, aumentando sin cesar, llegan a hacer

(1) *Taschenbuch der mikroskopischen Technik der Protistenuntersuchung* von Dr. S. von Prowazek, 2. Auflage (1909), p. 15.

E. Fernández Galiano



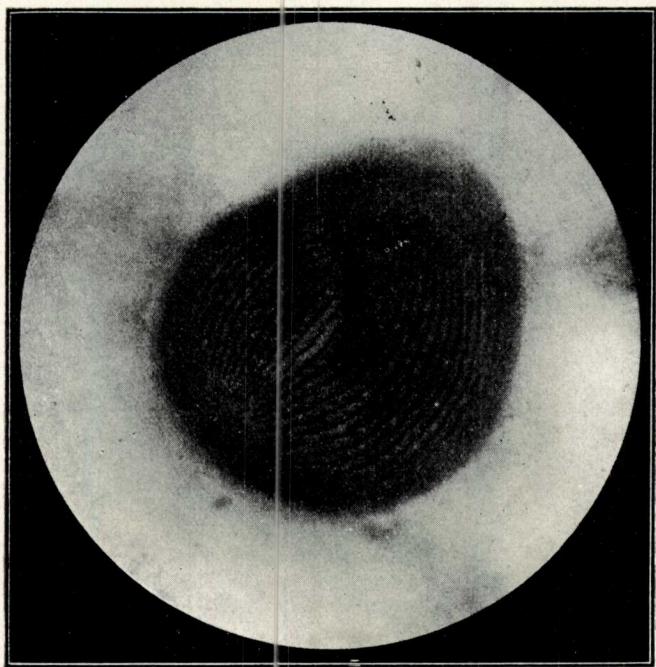
Microf. 1.^a — Infusorio del género *Paramaecium*.

E. Fernández Galiano



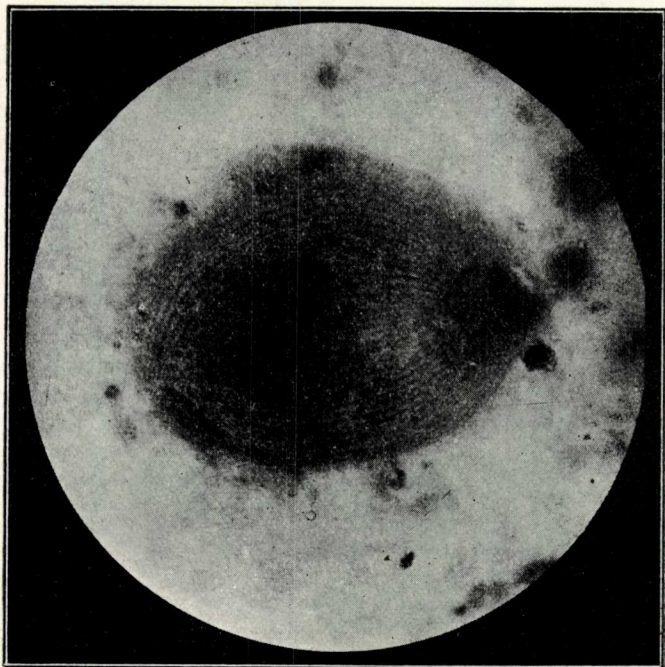
Microf. 2.^a — Infusorio del género *Colpidium*.

E. Fernández Galiano



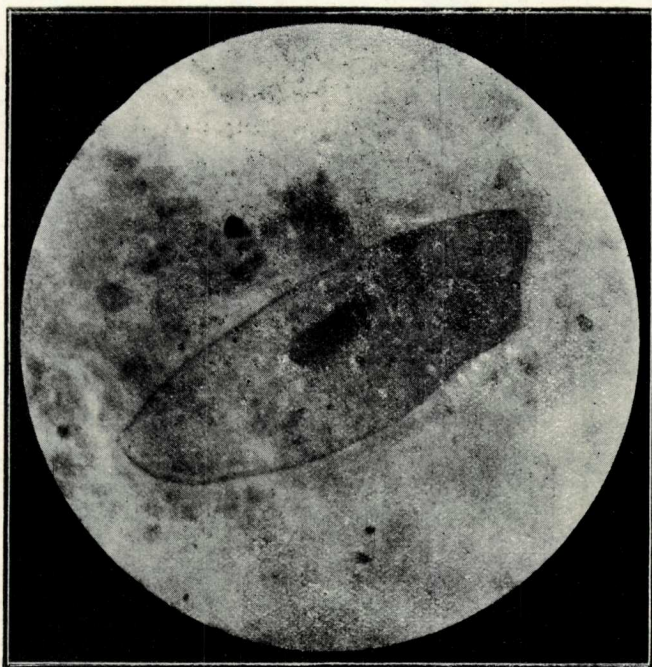
Microf. 3. • — Infusorio del género *Nyctotherus*:
impregnación de los corpúsculos basales.

E. Fernández Galiano



Micrcf. 4.^a — Infusorio del género *Nyctotherus*:
impregnación del macronúcleo

E. Fernández Galiano



Microf. 5.^a — Infusorio del género *Balantidium*.

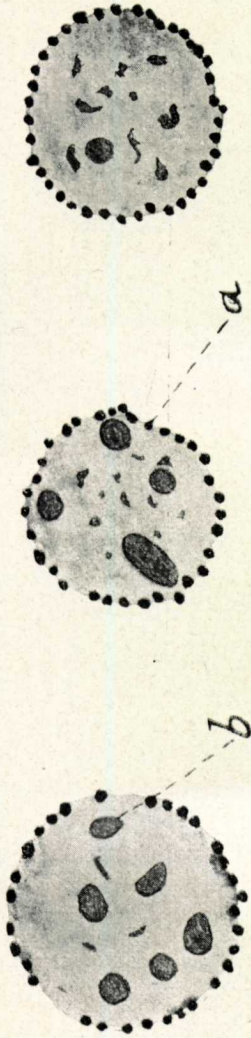


Fig. 1.^a—Vacuolas digestivas del *Colpidium*.—a) gotas de secreción.—b) partículas alimenticias.

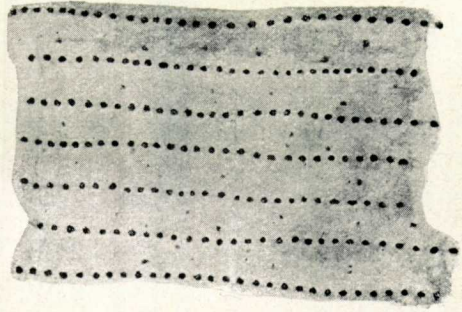


Fig. 7.^a—Un trozo de la membrana de *Nyctotherus*, después del tratamiento por la plata y visto a gran aumento. Se distinguen las líneas de los corpúsculos basales.

visibles las líneas meridianas (1); esto lo hemos observado tanto en infusorios libres como en parásitos (*Paramaecium*, *Colpidium*, *Nyctotherus*, *Opalina*).

Por ahora nos limitamos a hacer esta observación, sin prejuzgar si la analogía en el modo de obrar del rojo neutro y de la plata reducida es debida a una simple coincidencia o tiene una significación más profunda.

Laboratorio de Histología de la Facultad de Ciencias.

(1) Prowazek ha observado este fenómeno en el género *Paramaecium* y opina que los gránulos teñidos por el rojo neutro son precipitados de productos de excreción en la superficie interna de la membrana celular. Ignoramos las razones que alega Prowazek para hacer esta afirmación, pero nosotros, que, como decimos en el texto, hemos sorprendido tal fenómeno en el *Paramaecium* y en otros infusorios, hemos notado una coincidencia absoluta de posición y de tamaño con los corpúsculos basales; además, hemos observado la tinción de gránulos formando líneas meridianas, en mucho mayor número que las que presenta un dibujo de Prowazek reproducido por Doflein en su *Lehrbuch der Protozoenkunde*, 3.^a edición.