

C O N F E R E N C I A S

29 Enero 1955

METODOS DE INVESTIGACION BIOLOGICA

POR EL DR. D. UBALDO GASTAMINZA

Presidente de la Academia Médico Quirúrgica de Guipúzcoa

Esta conferencia que ofrecemos a nuestros socios a través de MUNIBE, recoge íntegro, el contenido de la lección más ajustada, didáctica y perfecta que, en su género, hemos tenido el placer de escuchar en "Aranzadi".

La falta de confort que nuestra Sala de San Telmo pudo ofrecer al limitado número de asistentes, sintiose muy pronto dominada por el calor que nuestro distinguido amigo, doctor Gastaminza, puso en las partes sustanciales de su deliciosa lección y la presencia de un selecto número de jóvenes que siguió atentamente el desarrollo de la conferencia.

Habíamos previsto la necesidad de que nuestros investigadores en Biología dejaran oír su palabra en "Aranzadi" llevando a su juventud un nuevo afán, y a sus elementos rectores el recuerdo insistente de la necesidad de crear y poner en marcha un Laboratorio de Investigaciones Biológicas. No pudimos prever —y nos alegra— que nuestro distinguido colaborador rebasara nuestras esperanzas en la iniciación de este tipo de temas al regalarnos en correcta exposición: y agradable charla, ilustrada con proyecciones y objetos reales —microscopio, objetivos, útiles, preparaciones, etc.—, una de las lecciones más perfectas que hemos escuchado en "Aranzadi".

PROLOGO

Amablemente invitado por la Sociedad "Aranzadi" de Ciencias Naturales a intervenir en el ciclo de conferencias organizado, hemos creído un deber aceptar afrontando alguno de los temas que pueden ser de interés general.

Nuestro punto de vista de la Biología viene determinado desde el ángulo de la especialización médica a la que pertenecemos: no es que nuestra ciencia abarque todo el ámbito de la Biología, pero se siente estrechamente unida a los progresos realizados en el estudio de los seres vivientes, lo mismo en el reino animal que en el vegetal que también son aplicados al hombre.

El tema que hemos elegido nada tiene de abstracto, de generalizaciones o fantasías, sino más bien se trata de la enunciación de problemas vivos y concretos de la Biología en varios de sus aspectos, lo cual justifica el interés de los que han venido aquí a aprender o a refrescar doctrinas ya dormidas pero que siempre renuevan el caudal de nuestra experiencia personal.

Para los no habituados a enfrentarse con los problemas biológicos les pedimos su benevolencia en la inteligencia de que lo más probable es que les cause algún tedio la aridez que produce la exposición de estas enseñanzas, pero tenemos la convicción de que aun este mismo sector se beneficiará con la adquisición de algunos conocimientos

* * *

Al hablar de Métodos de Investigación Biológica, que en la práctica son numerosísimos, nos limitaremos a reseñar los grupos siguientes:

Los instrumentos amplificantes de la visión, el Método de los cortes y la Teoría de las coloraciones en los tejidos.

Los tres temas aunque separados y formando técnicas propias, se penetran recíprocamente, siendo la base de toda la observación y experimentación de la Biología en su faceta morfológica y estructura de los organismos vivos.

EL MICROSCOPIO

De entre los innumerables aparatos de óptica no puede menos de hacerse el elogio del Microscopio porque a pesar de su pequeñez y la minuciosidad de sus procedimientos, ha sido la causa de los grandes progresos realizados en el campo de la Epidemiología, Agricultura y Zootecnia.

El Microscopio tuvo un origen próspero; no nació al azar; sus verdaderos padres fueron los filósofos de los siglos XVII y XVIII. De entre ellos tenemos a **Spinoza**, judío de Amsterdam, arrojado de su ciudad natal por sus correligionarios, los israelitas. Quedó sumido en la pobreza y encontró en la talla de lentes de aproximación su independencia económica y su libertad para filosofar.

Malebranche, de la Congregación del Oratorio de Francia, fundada por el Cardenal de Berulle, una Congregación parecida a la que fundó San Felipe Neri. Malebranche no fué sólo filósofo sino un gran metafísico y físico de nombradía y escribió su libro **Rocherche sur la verité** tallando y puliendo lentes para los anteojos.

Leuwenhoeck. Con estos precedentes Leuwenhoeck, holandés, años más tarde pudo construir su microscopio adquiriendo amplificaciones de 150 aumentos mediante el acoplamiento de una serie de 25 lentes talla-

das por él mismo y con el que descubrió el **Giardia intestinalis**, un flagelado que mide 15-20 micras. lo que supone ya un gran progreso.

Microscopio: teoría.—Su fundamento consiste en colocar un objeto fuera del foco de la lente. Producción de imagen real aumentada e invertida en el otro lado. Colocación de otra lente biconvexa y hacer que la imagen caiga dentro de la distancia focal para que al mirar por el ocular se vea la imagen que aparece de nuevo y virtual.

Desde el punto de vista de las partes que integran el microscopio vemos que aparte del objetivo y el ocular, dispone de un foco luminoso, unos espejos planos y cóncavos para la concentración de la luz y un aparato de condensación luminosa que obra inmediatamente por debajo de la platina del microscopio.

Si todos estos elementos son importantes, el que da la tónica en el microscopio y le hace acrecer su valor, es el objetivo, que es la pieza principal, por ello no estará de más que le dediquemos un espacio aparte.

OBJETIVOS

Precisan reunir exigencias especiales para calificarlos de buena calidad; son **tres**:

1.º **Poder resolvente.**—Facultad de distinguir los más finos detalles de estructura de los objetos: este poder depende sobre todo de la abertura numérica de los objetivos y no de su grosor, porque como sabemos en el grado de abertura numérica interviene el diafragma que elimina los rayos marginales, causa de aberraciones.

Angulo de abertura es el ángulo formado por los rayos marginales extremos que atraviesan la lente o sea es el cono luminoso emitido en un punto dado.

2.º **Poder definidor.**—O sea la facultad de poder suministrar imágenes de contornos perfectamente netos: este poder depende de la corrección de las aberraciones cromáticas.

3.º **Poder penetrante.**—Facultad de poder dar simultáneamente y con pureza diversos planos del mismo objeto.

En este momento hay que dar un consejo a los principiantes.

Si han de trabajar con aumentos medianos y grandes del orden de los 100 diámetros para arriba, sírvanse de los objetivos de poder resolvente y definidor.

Si por el contrario tratan de estudiar insectos, artrópodos y vegetales diversos a menor aumento, les interesa conocer las impresiones de conjunto y deben emplear entonces los objetivos de fuerte poder penetrante.

Clases de objetivos.—Dos son los tipos, los acromáticos y apocromáticos que dependen del grado de corrección de los defectos de color.

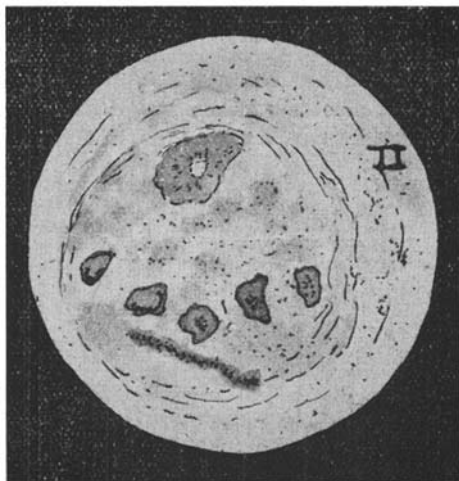
Pero al entrar en esta materia es preferible recordar que los rayos luminosos experimentan desviaciones al atravesar los prismas y lentes defectos que se conocen con los nombres de aberraciones de esfericidad y aberraciones cromáticas.

Aberración de esfericidad.—Consiste en que los rayos que parten de un punto del eje óptico no se reúnen todos de nuevo en un mismo pun-

to después de haber atravesado la lente, sino que se encuentran en puntos diversos pero próximos unos de otros. Ello se corrige por adaptación de otra lente que neutralice el defecto.

Aberración cromática.— Se debe a la distinta refrangibilidad de los distintos colores de los rayos luminosos. Sabemos que la luz consta de siete colores y cada color atraviesa la lente bajo distinto ángulo; de ahí que tampoco se encuentran unidos después de su paso por la lente y este defecto se traduce por imágenes de círculos con borde rojo por fuera, violeta por dentro cuando están dentro de la distancia focal y al contrario, violeta por fuera y rojo por dentro cuando es por fuera de la distancia focal.

Este defecto se corrige por aplicación de otro tipo cóncavo de lente especial y así se logran las lentes acromáticas; pero con todo no llega



Células gigantes de un nódulo tuberculoso

Microfot: U. Gastaminza

a corregirse por completo de un modo perfecto y de este modo, aunque se logre reunir varios colores, los otros quedarán dispersos y éstos forman lo que se llama el espectro secundario. Así comprenderemos mejor la distinción entre objetivos acromáticos y los apocromáticos.

Objetos acromáticos.—La corrección del espectro secundario se realiza reuniendo en un mismo punto dos rayos de color diferente eligiéndose como zona más adecuada la porción más luminosa del espectro, es decir entre las rayas D y F o sea entre el amarillo y el verde. (Del espectro de las franjas de Fraunhofer).

La corrección de esfericidad no se efectúa más que para un solo color

Los cristales a base de boro y fosfo-silicatos resuelven este problema.

Objetivos apocromáticos.—La diferencia con los anteriores consiste en que se hacen converger tres rayos de color diferente en un punto del eje.

Esta corrección cromática es uniforme para todas las zonas del objetivo. Se trata pues de un acromatismo superior; aquí las lentes de ácido fosfórico y ácido bórico no sirven y se emplean cristales de fluorita (espato fluor, fluoruro de calcio).

Notación de los objetivos.—Todos los objetivos apocromáticos se designan por el grado de su distancia focal expresado en mm. o fracciones de mm.: 18, 16, 4, 3, 2, 1/2 mm.

Los objetivos acromáticos de inmersión son designados en cambio por sus distancias focales expresadas en pulgadas inglesas. Así las cifras 1/10, 1/12, 1/15, 1/18, representan 1/10, etc.... de pulgadas de distancia focal, teniendo en cuenta que la pulgada inglesa equivale a 25 mm.

1/10	1/12	1/15	1/18	1/16	1/18
2,5 mm.	1,9 mm.	1,8 mm.	1,6 mm.	1,4 mm.	

El aumento de los objetivos se calcula dividiendo 250, que es la distancia de la **visión distinta** por el valor de la distancia focal.

Para un objetivo apocromático de 4 mm. será $250/4=62,50$ aumentos.

Diferencia de notación.—La casa Zeiss anota los objetivos por letras: aa, AA, bb, BB... etc...., pero en general lo hace por números de una escala que comienza por 1 que es el más débil con distancia focal de 45 mm. y los más fuertes, 8 y 9 que suponen 2 y 1 mm. respectivamente de distancia focal.

El objetivo 1 de largo foco es bueno para estudios de Entomología, patas de los insectos, pequeñas larvas: es el que emplean los veterinarios para el examen de la **Triquina espiralis** en las carnes.

Los objetivos 2-3 con 100 a 200 diámetros buenos para huevos de Helminetos y sedimentos urinarios.

Los objetivos 6-7 con 300 a 500 aumentos para citología y a partir de 600 diámetros conviene utilizar los objetivos de inmersión en aceite de cedro que tiene el mismo índice de refracción del cristal porta-objetos. Nosotros en tiempos de penuria hemos utilizado el aceite de ricino.

Vamos a pasar a la segunda parte de nuestro programa.

* * *

Disponemos, en efecto unas veces sustancias líquidas cuyo contenido microscópico queremos analizar: esto ocurre con todos los líquidos orgánicos sobre todo para el estudio bacteriológico.

Pero otras veces se trata de sustancias vivas, compactas y macizas como los músculos, vísceras o tumoraciones cuya estructura precisa conocer. ¿Cómo se estudia la morfología de las sustancias compactas como los órganos, tallos, semillas y frutos? Entonces hay que recurrir al

METODO DE LOS CORTES

Tiene por objeto reducir los tejidos animales o vegetales a secciones tan delgadas y finas, tales que puedan examinarse por transparencia al microscopio. Los cortes se realizan con **cuchillas finas** y los procedimien-

tos son dos: 1.º Los cortes por congelación y 2.º Cortes por inclusión en parafina.

1.º **Cortes por congelación.**—Para ello precisa endurecer las piezas que hay que examinar, piel, músculos, trozos carnosos, vísceras, etcétera... con cuerpos indurantes: se emplea el bicloruro de mercurio, el ácido picrico y el formol. El mejor es el formol o formaldehído de 40º que es gaseoso haciendo soluciones al 10 por 100; en dos o tres días se endurecen y entonces se coloca un trozo de 2-3 mm. de grosor y se lleva al **Microtomo de congelación.**

Allí, mediante una bala de ácido carbónico, como las que se usan en los bares para los barriles de cerveza, se deja pasar el gas y se produce la congelación por nieve carbónica convirtiendo la pieza a estudiar en una masa dura, apta para realizar los finos cortes, más finos que un papel de fumar, de 4 a 5 micras de grosor. Así se obtienen los cortes de tejidos para teñirlos con colorantes y observar al microscopio.

La refrigeración por debajo de 0º y dentro de ciertos límites no perjudica a la estructura de los tejidos; desde luego en la economía animal es bien sabido para quienes han estudiado Anatomía cómo se han efectuado estudios de grandes secciones del cuerpo humano en cadáveres congelados, con lo cual se ha logrado mantener las piezas endurecidas formando una pieza compacta. Así están hechos todos los dibujos de las magistrales obras de Anatomía de Testut y Rouviere.

Ahora bien; en forma anecdótica y con motivo de hallar alguna explicación invitamos a los naturalistas a fijarse en un fenómeno que será conocido para ellos pero que a nosotros nos llamó mucho la atención.

Se trata de que en una ciudad próxima a la nuestra, concretamente en Pamplona y durante los días crudos del invierno pasado se heló un pequeño estanque de la azotea de una casa convertida en piscina-jardín.

En dicha piscina, sus dueños criaban peces de colores. Al sobrevenir la helada los pececitos quedaron englobados, incluidos por efecto de la solidificación del agua.

Los dueños sintieron mucho el percance, dándoles por muertos. Al deshelse el estanque días después, fué grande la sorpresa cuando observaron que los peces seguían viviendo, de modo que el hielo no fué obstáculo para la conservación de sus vidas.

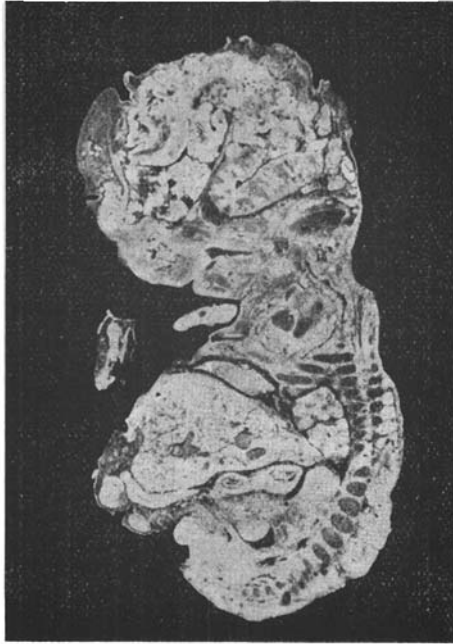
¿Cuál sería el mecanismo de muerte a la larga? ¿Será por asfixia? ¿Por compresión? ¿Por inedia o hambre? Un fenómeno curioso y digno de estudio.

2.º **Cortes por inclusión en parafina.**—Hay tejidos blandos como son los glandulares, blandos de por sí que no permiten su endurecimiento con la congelación y si se congelan, los cristales de hielo producidos desintegran la estructura de las células. En tal caso hay que recurrir a este otro procedimiento.

La inclusión en parafina consiste en hacer que el tejido o trozo que hayamos de estudiar quede empapado consustancializándose con la parafina, formando todo un bloque en conjunto. Es distinto del **rebozado** que sólo alcanzaría a cubrir tan sólo la superficie.

Para ello hay que seguir un sistema curioso: Se empieza por dar baños de deshidratación de la pieza haciéndola pasar por distintos frascos de alcohol de 70º, de 96º y alcohol absoluto,

Al salir del alcohol absoluto la pieza ha perdido toda su agua. Se pasa luego a Xilol que es un hidrocarburo de la hulla, luego al Benzol y entonces observaremos que la antigua pieza compacta se ha blandecido y queda gelatinosa, quedando tanto su interior como su exterior empapado del líquido bencénico. Entonces se pasa la pieza a la parafina fundida de 56°. Hay parafinas duras y blandas: se emplean las duras para los países cálidos, que funden a 60-62°: aquí empleamos la de 56° y se introduce la pieza en este baño de parafina a 56° y se



Embrión humano de 24 mm. Corte por inclusión en Parafina
Microfot: U. Gastaminza

tiene por espacio de 1-2 horas y después la parafina enfriada se ralla en bloque conteniendo la pieza, como un dado, que estará dispuesta para los cortes.

Los cortes se efectúan con los microtomos parecidos a los de las charcuterías, sólo que con cuchillas más delgadas y se obtienen cintas de los cortes del tejido ya cortado.

TEORIA DE LAS COLORACIONES

Algunas veces puede hacerse el examen microscópico de líquidos que llevan en suspensión elementos celulares en fresco, es decir, sin previa tinción. No es lo más frecuente, por lo cual se recurre al empleo

de tintes o colores que al impregnar a dichos elementos los hace susceptibles de una buena visión pudiendo examinarse sus estructuras.

Hay diversidad de colorantes que se emplean en Biología, quedando reducidos a tres grupos: Colorantes ácidos, básicos y neutros.

Colorantes básicos.—Son los más importantes, siendo los principales la Tionina, Azul de Toludinina y el Azul de metileno. Este cuerpo es una tetra-metiltionina, de gran aplicación no sólo en la investigación biológica, sino también en la industria de los colorantes y de aplicaciones caseras con la gama de los azuletes tan conocidos en la vida habitual.

El Azul de metileno goza de gran fama en la investigación por la coloración uniforme que da a las células haciéndolas perfectamente distinguibles en los exámenes microscópicos.

Colorantes ácidos.—Acido pírico que tiñe en amarillo: Fuchina ácida en rojo y las Eosinas. Estas son unas Ftaleinas del grupo de los tri-fenil-metanos; se trata de sales sódicas o potásicas de la fluoresceína. bromada, de ahí el tinte fluorescente que da como una irisación en su superficie del rojo al amarillo verduoso en todas las eosinas.

Colorantes neutros: Método de Romanowski.—Aquí viene lo curioso de la experimentación cuya historia se remonta al año 1891. En aquella época Romanowski, mezclando soluciones de Azul de metileno y Eosina, logró colorear los parásitos del paludismo en la sangre.

Es que se había producido, siguiendo las leyes de la Química, un eosinato de Azul de metileno, que teñía los núcleos del parásito en azul, dándole carácter de especificada tintórea.

Al mismo tiempo el famoso Unna obtuvo la coloración de ciertos gránulos de los leucocitos empleando soluciones de Azul de metileno envejecidas o tratadas en caliente por la potasa.

Por lo tanto había un proceso químico discutido: se había formado una sal por el Romanowski o bien se trataba de un proceso de oxidación del Azul de metileno. El término de toda esta historia es que se había producido un nuevo cuerpo: el **Azul de metileno**.

Este principio aprovechado por numerosos autores que fabricaron diversidad de colorantes fundados en el método Ramonowski ha servido de base para realizar muchos descubrimientos en la Citología animal y vegetal.

Nosotros, en nuestra práctica ordinaria, no compramos el Giemsa ni los azules policromos; nos servimos simplemente del método de Stenwenell que consiste en oxidar el Azul de metileno en caliente con cantidades mínimas de permanganato potásico, con lo que se obtienen excelentes coloraciones para los trabajos habituales de sangre y líquidos orgánicos.

Método de Graham.—Tiene la particularidad de distinguir los microbios según los tipos de apetencia tintórea: unos de los que **toman el Graham** y otros de la que **no toman el Graham**.

Consiste en teñir primero la preparación con la Violeta de genciana después, sin lavar, añadirle unas gotas de solución de Lugol, que es una solución de yodo; luego viene el tiempo de la decoloración mediante el alcohol y se termina con una coloración de contraste con fuchina

ácida diluida. Los cocos, estreptococos, así como los bacilos grandes, se tiñen en color café tostado: es que han tomado el Graham, los otros no se han coloreado.

Método de impregnaciones metálicas.—Consiste sencillamente en producir sobre elementos determinados de tejidos un fino precipitado de metal reducido. El metal se pone en contacto con los tejidos en forma de sales: la reducción se efectúa, en parte por el tejido mismo, por efecto de la luz o por medio de sustancias reductoras como el formol, ácido pirogálico o la hidroquinona

Los metales empleados son la plata, oro y osmio

Fué el insigne Ramón y Cajal quien dió renombre a este tipo de coloraciones.

Este método sirve para la tinción de los epitelios. de la sustancia extraída de los músculos y principalmente del tejido nervioso, que durante muchos años fué un verdadero tabú para las coloraciones, pues el tejido nervioso es reactio a tomar los tintes usuales lo mismo en frío que en caliente.

Técnica.—Lo principal para que salgan bien estas coloraciones es necesario operar con agua destilada, pues el agua corriente contiene sales de cal que son precipitadas por las soluciones de plata. Utilizar asimismo para las manipulaciones varillas de vidrio porque la plata ataca a las agujas metálicas.

Utilizamos ordinariamente las soluciones de carbonato de plata y el secreto de una buena coloración consiste en la elaboración del carbonato de plata amoniacal.

Para ello, se toma una probeta con una disolución de nitrato de plata; 3 grs. en 30 grs. de agua.

En otra probeta sol. de carbonato de sosa.

Se mezclan las dos soluciones, produciéndose un precipitado blanco lechoso sucio, que queda en el fondo de la probeta.

Se lava este depósito con agua destilada dos o tres veces, agitando y decantando

El depósito se redisuelve en la mínima cantidad de amoníaco. Así se obtienen las soluciones de carbonato de plata amoniacal.

Pero hay que andar con mucho cuidado al hacer estas soluciones. no concentrándolas mucho. Nosotros hemos empleado a veces soluciones fuertes, pero es preciso obrar con prudencia.

Nada de ello nos dicen las obras de Cajal ni las obras francesas que estudiamos al tocar estos temas, pero me permito decir que en una ocasión, habiéndose preparado en el Instituto Radio-Quirúrgico de Guipúzcoa una solución muy concentrada de carbonato de plata amoniacal en una solución de 1 por 10 o de 1 por 20 (pues que las soluciones ordinariamente utilizadas son al 1 por 100 ó 150) se observó que a su contacto con el frasco daba como unas pequeñas chispas y un día, al abrir la señorita enfermera (por más señas Juanita Yeregui, hoy madre de tres hijos) el armario donde se contenía la solución, dió el frasco un

gran estallido, quedando las puertas del armario rociadas de las gotas de la solución de plata y afortunadamente no hubo que lamentar desgracia personal alguna.

Más adelante y con ocasión de la última guerra mundial, nos hemos enterado de que este fenómeno ha sido utilizado con fines bélicos.

* * *

Y ahora unas palabras para terminar:

Estamos convencidos de que en Guipúzcoa, que siempre se ha distinguido por su carácter industrial y comercial, las actividades científicas y culturales van tomando cada vez mayor rango, por lo que precisan organizaciones de más complejidad y amplitud.

Y se está dando este fenómeno a pesar de que no existen centros universitarios propiamente dichos, cuya misión y esencia consisten en crear y dirigir la cultura universal.

Aquí sucede al revés; que la cultura se va enriqueciendo como floración espontánea y es posible que algún día se creen en nuestro país los centros superiores de enseñanza cuando la maduración cultural se haya logrado.

Por esta razón estimamos que todos los esfuerzos de "Aranzadi", con su Junta Directiva, merecen nuestros más sinceros aplausos y les estimulamos a que en breve preparen un Laboratorio de Investigaciones Biológicas, grande o pequeño, que esto importa poco, pero que empiece a funcionar y que sirva de centro de reunión y trabajo a los titulados, alumnos de Ciencias Naturales y aficionados a esta clase de estudios, en la seguridad de que con ello se dará un gran impulso al conocimiento de grandes áreas de la Historia Natural de este país que está aún por hacer.

