

ANALES  
DE LA  
**REAL ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA**

---

AÑO 2004 - TOMO CXXI  
CUADERNO CUARTO  
SESIONES CIENTÍFICAS  
SOLEMNE SESIÓN



Edita: REAL ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA

Depósito Legal: M. 5.020.—1958  
I.S.S.N. 0034-0634

---

Fotocomposición e impresión: Taravilla. Mesón de Paños, 6 - 28013 Madrid

XVII SESIÓN CIENTÍFICA

DÍA 2 DE NOVIEMBRE DE 2004

PRESIDIDA POR EL EXCMO. SR.  
D. AMADOR SCHÜLLER PÉREZ

**CIENCIA Y DESARROLLO ECONÓMICO**  
***SCIENCE AND ECONOMIC DEVELOPMENT***

Por el Excmo. Sr. D. FEDERICO MAYOR ZARAGOZA

Académico de Número

**APOPTOSIS MITOCONDRIAL**  
***MITOCHONDRIAL APOPTOSIS***

Por el Excmo. Sr. D. ANTONIO CAMPOS MUÑOZ

Académico de Número

# CIENCIA Y DESARROLLO ECONÓMICO

## SCIENCE AND ECONOMIC DEVELOPMENT

Por el Excmo. Sr. D. FEDERICO MAYOR ZARAGOZA

Académico de Número

### Resumen

En momentos de grandes turbulencias a escala planetaria, producidas por asimetrías económicas y sociales, por la degradación del medio ambiente, la uniformización cultural y la debilidad progresiva de las instituciones ético-jurídicas internacionales, el fortalecimiento de la investigación científica aparece como una de las claves maestras para lograr corregir las tendencias actuales. El incremento del conocimiento y su correcta aplicación no sólo constituyen los pilares fundamentales de la imprescindible mejora *general* de la calidad de vida, sino que la propia competitividad y solvencia económicas han de basarse en el conocimiento. En esta comunicación se presentan y comentan datos recientes de la ERA (área de investigación europea), así como la propuesta de un Fondo Europeo (de 2.000 millones de euros, inicialmente) que, administrado con plena autonomía por un Consejo Europeo de Investigación, permitiría en pocos años mejorar las perspectivas productivas y comerciales de la UE y, sobre todo, facilitar la permanencia o retorno de los científicos que hoy —«éxodo de talentos»— fijan su residencia en los Estados Unidos, faltos de oportunidades en Europa.

### Abstract

In times of great turbulences at a planetary scale, as a result of economic and social disparities, of environmental erosion, cultural uniformization and progressive weakness of international ethical and legal international institutions, the reinforcement of scientific research appears as one of the crucial keys to correct the present trends. Increase of knowledge and its adequate application are not only the fundamental pillars of the urgent general enhancement of the quality of life, but also economic competitiveness is based on knowledge. In this communication recent data on the ERA (European Research Area) are presented and commented as well as the

proposal of a European Fund (of 2000 million of euros initially) which, administered by a European Research Council, would improve the EU trade and productive perspectives and, above all, will avoid or reduce the present brain-drain of those who, lacking opportunities in Europe, emigrate to other countries, particularly the United States.

## EL FOMENTO DE LA INVESTIGACIÓN BÁSICA EN LA UNIÓN EUROPEA

El día 15 de diciembre de 2003 presenté, como Presidente del ERCEG (European Research Council Expert Group) el informe titulado «*The European Research Council-A cornerstone in the European Research Area*» («El Consejo Europeo de Investigación Científica - Piedra angular del área de investigación científica europea») al Ministro de Ciencia, Tecnología e Innovación de Dinamarca, Sr. Helge Sander, quien, en su calidad de Presidente del Consejo de Ministros (sobre competitividad) de la Unión Europea, me lo había encomendado un año antes. En efecto, como consecuencia de la reunión de dicho Consejo de 26 de noviembre de 2002, el Ministro Sander me invitó a presidir un grupo de expertos con el fin de explorar las posibilidades de creación de un *Consejo Europeo de Investigación para el fomento de la ciencia básica, en todas sus dimensiones, en el área europea*.

El grupo consultó a las instituciones relacionadas ya existentes, incluyendo el EURAB (European Union Advisory Board), la ESF (European Science Foundation), el ELSF (European Life Science Forum), Euroscience, la EUA (Asociación Europea de Universidades, la Academia Europea, la ALLEA (All European Academies), la EUROHORC (European Union Research Organizations Head of Research Councils), el EUROFORUM (European Governmental Scientific Research Organization), así como otras relevantes asociaciones científicas en las diversas disciplinas —EMBO, FEBS, CERN, ESO, etc.—, con el fin de beneficiarnos de su experiencia y dejar bien sentado, desde el principio, que no se trataba de crear una *gran «estructura»*, sino una estructura *poderosa*, con modestos recursos humanos y de espacio, pero con importantes medios financieros, que atribuiría gracias, precisamente, al concurso de las organizaciones existentes bien acreditadas.

Solicité observaciones, comentarios y sugerencias a quienes, algunos próximos colaboradores, podían hacer las aportaciones que les

dictaba su propia trayectoria científica, académica, humana. Quiero destacar la contribución de la profesora Rita Colwell, que durante los últimos años —hasta hace muy pocos meses— ha dirigido admirablemente la NSF (National Science Foundation) de los Estados Unidos, principal referente mundial para el objetivo que perseguíamos.

He de subrayar el apoyo unánime que, progresivamente, manifestó *la comunidad científica europea*. Acostumbrada a pedir, ha tenido que hacer un considerable ejercicio de adaptación para abandonar su habitual actitud mendicante y ofrecer a las altas instancias de gobierno europeo que reclamaban sus orientaciones las propuestas cuali y cuantitativas que podrían convertir a Europa, el año 2010, en «*el líder mundial de la economía basada en el conocimiento*». Ésta fue la decisión de la Cumbre de Lisboa del año 2000, que desencadenó los acontecimientos que estoy describiendo. Alarmados por el declive de la competitividad productiva y comercial europea, por el descenso del número de patentes, por la «deslocalización» de empresas hacia el este y de sus laboratorios hacia el oeste pero, sobre todo, por el éxodo de jóvenes talentos hacia los Estados Unidos, los jefes de Estado y de Gobierno consideraron que era urgente dar un gran impulso a la I+D en toda el área europea. Un año más tarde, en Barcelona, establecieron la necesidad de acercar el porcentaje del PIB dedicado a I+D al 3% de los Estados Unidos y Japón.

Algunas cifras hablan por sí solas:

— Si bien los Estados miembros de la Unión Europea, en cifras promedias, tienen un número comparable de publicaciones científicas por habitante, la UE (sobre la base de los quince miembros que tenía antes de la última ampliación) se halla muy rezagada en relación a los Estados Unidos de América por la calidad de sus publicaciones: 926 publicaciones por millón de habitantes en los Estados Unidos y 818 en la Europa de los Quince, pero las publicaciones más frecuentemente citadas son muy superiores en Norteamérica. Así, el porcentaje de trabajos altamente citados representa en US el 1,64% del total, en Japón el 0,59% y en la Unión Europea sólo el 0,25%.

— De 101 premios Nobel otorgados en Química, Medicina y Física en los últimos 15 años, 68 fueron a parar a los Estados Unidos y sólo 23 a Europa.

— Una razón importante, aunque seguramente no la única, de estas diferencias es el volumen de recursos financieros dedicados a I+D: las inversiones públicas en investigación y desarrollo en los

Estados Unidos representan el 2,69% del GDP frente al 1,93% en la Unión Europea (datos de 2002) y el crecimiento relativo es también mayor en el caso de Norteamérica.

— En la actualidad, el número de investigadores en relación a la «población laboral total» es muy superior en Japón y los Estados Unidos (9,3 y 8,1 por mil, respectivamente), comparados con el 5,4 en la Europa de los Quince.

— En la labor formativa de nuevos investigadores, la UE-Quince supera a los Estados Unidos y Japón (0,56 nuevos doctores en Ciencia y Tecnología por mil habitantes en la Unión Europea frente al 0,48 y 0,24 de los Estados Unidos y Japón, respectivamente). Pero, Europa tiene *grandes dificultades para retener* a los mejores de ellos, ofrecerles oportunidades y atraer a los mejores de otras partes del mundo. Éste es, en mi opinión, uno de los principales defectos del sistema investigador en España y Europa, responsable en buena medida de la precaria situación actual. En efecto, las familias, el Estado y la sociedad, a través de fundaciones e instituciones diversas, realizan un considerable esfuerzo para mejorar la calidad y el número de las ayudas pre y post doctorales. Pero, tradicionalmente, hemos sido incapaces de atraer a los mejores y ofrecerles oportunidades una vez ya formados, y hemos visto cómo eran los Estados Unidos los que «cosechaban» los mejores frutos. Tendremos que imitar a los Estados Unidos de Norteamérica no sólo en las inversiones que realizan en I+D y en su capacidad para la utilización práctica del conocimiento, a través de las patentes y fórmulas de innovación oportunas, sino en *el reclutamiento del profesorado universitario y de los investigadores científicos* en general, para llegar a ser realmente «competitivos».

Éstas son las principales situaciones y tendencias que deben enmendarse. Para ello —si de verdad se quieren alcanzar los objetivos fijados para el año 2010— será imprescindible ser muy riguroso en las cifras de cada uno de los países europeos y, particularmente, no caer en la tentación de juegos malabares con los «porcentajes promedios» que resultan de agrupar países como Suecia y Finlandia —con inversiones cercanas al 4% del PIB— y España, que no alcanza el 1%. El rigor y la transparencia deben aplicarse, desde luego, a separar de los porcentajes de I+D lo que pertenece a otros capítulos presupuestarios. Así, el 1% español, un tercio aproximadamente está destinado a adquisición y desarrollo tecnológico de material militar. Sin comentar las necesidades que hoy pueda tener

España al respecto, lo que está claro es que no deben situarse en el porcentaje de I+D. Lo mismo sucede con la participación del sector privado: con frecuencia las inversiones que figuran en el concepto «innovación» son en realidad instalaciones y equipos de análisis, verificación de calidad, etc.

Cuando se tomó la decisión en la Cumbre de Lisboa, faltaban diez años para que Europa se convirtiera en líder de la economía basada en el conocimiento. Ya han transcurrido cuatro, y el tiempo apremia. Si la Unión Europea no quiere perder el papel que le corresponde en el escenario mundial —que no es únicamente económico pero es también económico— tendrá que adoptar decisiones políticas de gran envergadura sin mayor tardanza. Hubiera sido mejor que se hubieran adoptado por estudios prospectivos realizados a su debido tiempo, por la escucha de tantas voces que, desde hace muchos años, claman por la necesidad de fomentar la investigación básica..., que se hubieran adoptado muy en especial, por objetivos sociales y principios ideológicos y morales. Pero han sido provocadas por lo que tiene mayor capacidad de convencimiento en un mundo de intereses a corto plazo y gobernantes poco acostumbrados a mirar lejos: por imperativos económicos. Pues bien: hay que aprovechar la ocasión para, de paso que gana en competitividad, *pueda Europa imprimir caracteres propios* que, en unos años, contribuyan a que el conjunto del planeta se beneficie, con una nueva visión del desarrollo, de la fortalecida cartera europea.

Las propuestas del ERCEG pueden resumirse así:

1) Establecimiento por la Unión Europea de *un fondo europeo para el fomento de la investigación básica de alta calidad*, y de un Consejo para administrarlo. Deben apoyarse los mejores grupos en las universidades e instituciones científicas de Europa, para incrementar la base de conocimientos que condiciona el desarrollo económico, industrial, cultural y social, favoreciendo en consecuencia la competitividad y capacidad de innovación de la Unión Europea en todas las dimensiones.

El fondo debe aplicarse para el *fomento de la investigación básica en todos los campos de la ciencia*, incluyendo desde luego las Humanidades y Ciencias Sociales. Sus decisiones se basarán en criterios científicos y el uso de un proceso de selección riguroso y transparente de «revisión por pares». Debe promocionar los proyectos interdisciplinarios, especialmente en las áreas de investigación emergentes.



Para conseguir el impacto necesario, el fondo requeriría contar durante los 3-5 primeros años con una cantidad de al menos dos mil millones de euros. Estos fondos, procedentes de la Unión Europea, deben figurar en las «perspectivas financieras» del próximo programa marco sexenal (el séptimo, de 2007 a 2012).

2) *Autonomía*: el Consejo debe operar con plena autonomía en todos los temas científicos y académicos, incluyendo la política de financiación. Esta autonomía es imprescindible para asegurar la credibilidad del Consejo ante la comunidad científica y los Estados miembros.

3) El Consejo presentará los resultados científicos, contables y administrativos de su misión ante los correspondientes órganos de la Unión Europea.

4) El Consejo *utilizará para el cumplimiento de su función las instituciones europeas ya existentes*. Puesto que las universidades constituyen el destinatario natural de una parte muy importante de los fondos para investigación básica, deberán procurar estar a la altura de este nuevo desafío, que tantos beneficios puede conllevar al área europea de investigación.

Simultáneamente, es indispensable *reforzar los vínculos entre las instituciones académicas y científicas y las empresas*, de tal manera que se alcancen los objetivos concretados en la Declaración de Barcelona (2001). Europa ha demostrado en el pasado una gran capacidad de cooperación internacional, hasta el punto de alcanzar en algunos casos —como el del CERN, en Física Nuclear— la más alta graduación mundial. Hace tan sólo dos semanas se celebraba, en Ginebra, el 50 aniversario de la creación del CERN, consecuencia de la propuesta del Premio Nobel norteamericano Isidor Rabi a la Conferencia General de la UNESCO de Florencia (1950). Mediante un acuerdo franco-suizo; el CERN ocupó un espacio transfrontera, con sede en Ginebra, y constituye hoy, con el más potente acelerador de partículas, el LHC (Large Hadron Collider), el centro de investigación básica en Física de partículas más importante del mundo. Unos 700 ingenieros y científicos norteamericanos, en número mayor que el de los europeos, utilizan hoy sus extraordinarias instalaciones. Algo parecido, en cuanto a prestigio internacional, podría decirse del EMBL (European Molecular Biology Laboratory), del ESO (European Southern Observatory), ESA (European Space Agency), etc.

En los anexos que acompañan al informe —cuya extensión se limita a tres páginas— se comentan con mayor detalle las implica-

ciones del funcionamiento del Fondo relativas al reclutamiento, formación y situación laboral de los profesores e investigadores, así como de las infraestructuras y recursos compartidos que son imprescindibles para un empeño de esta naturaleza.

## ECONOMÍA BASADA EN EL CONOCIMIENTO

Señor Presidente, Señores y Señoras:

Según la Real Academia Española, «conocimiento» significa «acción y efecto de conocer; entendimiento, inteligencia, razón natural; noción, ciencia, sabiduría». Indico todas estas acepciones porque, como catalán, sé que «coneixement» indica con mayor frecuencia sabiduría que saber. Es la recomendación de un comportamiento sensato, lúcido, sereno. Creo que es absolutamente imprescindible para el esplendor de Europa que cuando hablamos de «economía basada en el conocimiento» tengamos muy en cuenta este significado.

Y que promovamos, por tanto, un proceso educativo, que culmine en las Universidades, para formar ciudadanos del mundo, capaces de participar, de elaborar sus propias respuestas y argüir en su favor, de dirigir, en suma, su propia vida. Un proceso que siga las cuatro grandes «pistas» de Jacques Delors: aprender a conocer, a hacer, a ser y a vivir juntos. Y, en el grado universitario, es fundamental *aprender a emprender*. Por eso es particularmente relevante la conjunción empresa-universidad. Porque son los empresarios los que saben medir adecuadamente el momento de «emprender». Me gusta repetir que el riesgo sin conocimiento es peligroso, pero el conocimiento sin capacidad de riesgo, inútil. Por ello, la política científica debe situarse al más alto nivel de la gobernación de un país —y de la Unión Europea— porque su estructura polimórfica (académica, científica, empresarial, sanitaria, agrícola, mediambiental, marina, etc.) no admite parcelaciones.

Desde la década de los 60, las Naciones Unidas han establecido que el auténtico desarrollo debe ser integral (económico, social, cultural), sostenible... y humano. En 1995, en la Cumbre de Desarrollo Social de Copenhague, todos los países suscribieron unos «compromisos» que evitarían las brechas que separan a los países más avanzados de los menesterosos y contribuirían de este modo a la estabilidad y seguridad globales.

El conocimiento, aplicado en sus dos principales acepciones, debe, sobre todo, favorecer un desarrollo endógeno generalizado, atendiendo las necesidades de salud, vivienda, educación, justicia, etc. que apremian a más de la mitad de los habitantes de la Tierra. Durante siglos nos hemos preparado para la confrontación. En las escuelas nos han repetido el proverbio perverso de «si quieres la paz, prepara la guerra». Es lógico que, después, se haga aquello para lo que nos han preparado. Ahora debemos prepararnos para construir la paz, para, todos juntos, hacer frente a los grandes retos que plantea el futuro de la humanidad en estos albores de siglo y milenio. Algunos analistas dicen que China alcanzará a Europa en su desarrollo económico en el año 2018 y a mediados de siglo alcanzaría a Estados Unidos. China y la India, no cabe duda, son dos grandes potencias que se incorporarán a pasos agigantados a esta «competición» actual entre los Estados Unidos, la Unión Europea y Japón, por lo que es imprescindible que, desde este momento, se construya, con firmeza y perseverancia, la colaboración y no la confrontación. En investigación científica, Asia está realizando un gran esfuerzo; en sus universidades y «parques» científicos. Deberá ahora, como en el caso de Europa, ver cómo pueden transformar la investigación en innovación, en iniciativa empresarial propia porque, de otro modo, teniendo en cuenta las «implantaciones» de grandes empresas extranjeras, especialmente norteamericanas —automóviles, productos químicos y farmacéuticos—, los frutos de su esfuerzo irán a parar a manos muy avezadas en la comercialización.

Sí: conocimiento y «coneixement» para darse cuenta en profundidad de la realidad global, por compleja que sea, con un enfoque transdisciplinar que hoy es imprescindible porque —me gusta reiterarlo— no se puede transformar la realidad si no se la conoce. La economía *basada en el conocimiento* —«no hay ciencia aplicada si no hay ciencia que aplicar»— y *en el buen sentido*. Pero, también, en la consideración de *todo* el panorama mundial, de la realidad del conjunto del planeta, para poder actuar en consecuencia.

Se requiere una economía basada en puntos de referencia éticos, con los acentos propios de cada ideología, en la que la confusión actual se desvanezca y se logren —a través de una educación permanente de gran calidad— ciudadanos preparados, exigentes, capaces de reconducir las actuales tendencias, propias de una deriva desenfrenada y desconsiderada con las generaciones venideras.

Una economía que facilite la creatividad y, por tanto, promueva

la «tensión humana» necesaria para la fiel expresión de la diversidad cultural, que es la riqueza de los pueblos, y de los principios que la unen, su fuerza.

Una economía que tenga su punto de mira, muy especialmente, en el futuro, es decir, en los jóvenes, en las generaciones que llegan a un paso de nosotros. De nada servirá el fantástico desarrollo tecnológico alcanzado... si el desencanto y la indiferencia cunden entre los que deben protagonizar los escenarios dentro de unas décadas, el curso de la historia. La embriaguez, el sentimiento de desamparo, las adicciones, las adherencias en lugar de alas grandes y libres de cualquier tipo de lastre. Invertir todo lo que haga falta para que los padres, los profesores, la sociedad en su conjunto pueda ocuparse, uno a uno, con amor «particular», de los niños, adolescentes y jóvenes. No hay mejor inversión. Ellos y no otra deben ser la gran prioridad de la economía del conocimiento a partir de ahora.

Que el timón esté en manos de políticos, guiados por ideales, valores, ideologías y no de técnicos. En manos de gobernantes y no de entramados financieros que lo dominan todo. En manos de los parlamentos, que representan a todos los ciudadanos, y no en manos de unas cuantas corporaciones que, a escala nacional e internacional, campan a sus anchas, sin más brújula que el mercado.

Economía del conocimiento para invertir en la reducción del impacto de las catástrofes naturales y provocadas mediante alianzas internacionales —esencialmente con los países vecinos— para concertar en un momento dado los mejores recursos humanos y técnicos. Los incendios forestales, las inundaciones —hace poco, la revista *The Economist* ponía de manifiesto lo que representa, en muchas dimensiones, incluida la económica, la «tiranía de los monzones»— son calamidades, con frecuencia recurrentes, que cuestan mucho (sobre todo, en vidas y sufrimiento humano) y podrían evitarse en buena medida. Pestes, como las del ganado, las agrícolas, o la «langosta», que podrían, asimismo, prevenirse o reducirse. La FAO ha pedido recientemente ayuda sobre la plaga de la langosta: se necesitan alrededor de 80 millones de dólares y sólo se han recaudado unos 30. La plaga de 1987-89 costó aproximadamente 300 millones de dólares. La ONU alertó a mediados de octubre sobre el crecimiento progresivo de los efectos negativos de las catástrofes: en 2003, más de 76.000 personas murieron en desastres naturales y 254 millones de personas se vieron afectadas por estos fenómenos. Se calcula que las pérdidas económicas ascendieron a 44.000 millones

de euros. El 75% de la población mundial vive en áreas en donde tienen lugar con mayor frecuencia este tipo de catástrofes.

Una economía que invierta en Sanidad, sobre todo en medidas preventivas. La salud de todos los ciudadanos del mundo es una de las condiciones para este desarrollo equitativo —nombre de la paz— en todo el mundo.

He dicho en varias ocasiones que, en 1989, se hundió un sistema que, basado en la igualdad, había olvidado la libertad. Ahora zozobra el régimen que, basado en la libertad, ha olvidado la igualdad. Y la solidaridad. La economía basada en el conocimiento y el «coneixement» deberá abandonar de una vez los caminos trillados de unas normas que han concentrado más riqueza en unos cuantos en lugar de distribuirla a lo largo y ancho de la Tierra. Y, poco a poco, convertir «las lanzas en arados», como proclama la profecía de Isaías grabada en la sede de las Naciones Unidas de la isla de Manhattan. Para transitar desde una cultura de fuerza a una cultura de la palabra y el diálogo, del entendimiento y de la fraternidad, tal como proclama el artículo primero —tan poco leído y observado— de la Declaración Universal de los Derechos Humanos. Menos espadas y más medios para un gran plan global de desarrollo, del que surgiría la economía de este otro mundo posible que anhelamos. El siglo XXI sería así, por fin, el siglo de la gente. De la democracia genuina. De los jóvenes rescatados de la indiferencia y de los horizontes sombríos que hoy les ofrecemos. Para el gran salto desde la razón de la fuerza a la fuerza de la razón, invertir más en educación, justicia y salud. Y menos en armas. Invertir es lo que constituye nuestra esperanza en los tiempos turbulentos: el talento, la capacidad creadora de cada ser humano único. En personas educadas, que «dirijan con sentido la propia vida». Que sepan aplaudir y disentir según sus propias reflexiones. Y actuar de acuerdo con ellas y no inducidos por el omnipresente y omnímodo poder mediático que les convierte en actores tristes de papeles pensados por otros. Una economía solidaria, para que la mano alzada se transforme para siempre en mano tendida. Y dé respuesta a aquellos versos juveniles de mi hijo Federico sobre soldados adolescentes: «¿quién ha puesto en su mano un fusil y no una pluma, un fusil y no otra mano?...».

# **APOPTOSIS MITOCONDRIAL**

## ***MITOCHONDRIAL APOPTOSIS***

Por el Excmo. Sr. D. ANTONIO CAMPOS MUÑOZ

Académico de Número \*

### **Resumen**

Los métodos de impregnación argéntica, cuando son selectivos, dan origen en microscopía óptica a imágenes de alta resolución y de alto contraste. La aplicación al tejido hepático de un método clásico de impregnación argéntica para mitocondrias pone de relieve una marcada heterogeneidad en dichas organelas. Esta heterogeneidad es muy evidente cuando se estudian los cortes, sometidos a dicha técnica, con microscopía electrónica de transmisión. Las diferencias en la intensidad de impregnación mitocondrial pueden relacionarse con etapas diferentes en el ciclo de vida mitocondrial. Las menos impregnadas y las no teñidas, observadas con microscopía electrónica, representan las etapas iniciales del ciclo mientras que las más impregnadas, oscuras y fragmentadas reflejan las etapas finales de autodisolución de dichas organelas. Este proceso de «apoptosis mitocondrial» podría interpretarse como una vía preventiva de eliminación de mitocondrias dañadas antes de que estas liberen el Citocromo C y otros factores proapoptóticos presentes en su seno. El método constituye un buen marcador de la edad mitocondrial.

### **Abstract**

Silver staining methods, when selective, yield a high-contrast and high-resolution image in optical microscopy. A classical method for silver impregnation of mitochondria has been applied to liver tissue and reveals a marked heterogeneity among mitochondria in single cells. This heterogeneity can be detected in the optical microscope but is even more evident at the ultrastructural level. The differences in staining intensity may reflect different

---

\* Con la colaboración del Prof. José María López Cepero, Prof. Titular de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cádiz.

stages in the mitochondrial life cycle. The most lightly stained mitochondria and the unstained mitochondria also observed with Electron microscopy may represent the earliest phase of the mitochondrial life cycle. On the other hand, the progressively darker staining and final appearance of shrunken mitochondria may reflect the autodissolution process of these organelles. Such a process of mitochondrial apoptosis might make sense as a preventive pathway for elimination of damaged mitochondria before cytC or other proapoptotic factors could be liberated. This method reveals a marker of mitochondrial age.

## INTRODUCCIÓN

Las mitocondrias son orgánulos celulares convertidores de energía que se caracterizan por poseer una membrana especializada útil para la producción de ATP. Las mitocondrias, presentes en las células de prácticamente todos los organismos eucariotas, fueron inicialmente descritas por Altmann en 1890, con el nombre de «bioblastos». Con posterioridad Benda y Meves entre 1898 y 1904 identificaron su presencia en numerosas células proponiendo el primero la denominación de mitocondria para estos orgánulos por su carácter granular y filamentoso. El conjunto de las mitocondrias existentes en una célula recibió el nombre de condrioma. En la descripción del condrioma de las células destacan también las aportaciones realizadas por algunos de los miembros de la escuela española de histología, concretamente merecen destacarse los trabajos realizados en el laboratorio de la Residencia de estudiantes por el prof. Ortiz Picón, antecesor mío en la cátedra de Granada (4) (11).

La organización general de las mitocondrias tal y como la conocemos en la actualidad fue descrita con microscopía electrónica por George Palade en 1952 y Sjöstrand en 1953. De acuerdo con esta descripción las mitocondrias poseen una membrana externa y una membrana interna con invaginaciones, denominadas crestas, que delimitan una cámara interior que contiene la matriz mitocondrial. Las membranas externa e interna están separadas por una cámara externa o espacio intermembranoso. En tiempos recientes las reconstrucciones tomográficas al microscopio electrónico han permitido descripciones tridimensionales que establecen una conexión muy estrecha y tubular entre las crestas y la membrana interna lo que convierte al interior de las crestas en un compartimento con potencial de membrana y alta impedancia cuya descarga a través del rotor de ATPasa va acoplada a la generación de ATP (4) (5).

Desde una perspectiva funcional los estudios iniciales de Michaelis, Lewis y Cowdry y con posterioridad los de Lenhinger, Leloir, Mitchell, etc. otorgaron a las mitocondrias un importante papel en la fisiología celular. Estos últimos llevaron a establecer el papel respiratorio de las mitocondrias y a ubicar en ellas la producción de la mayor parte de la energía que resulta necesaria para el desarrollo normal de las distintas funciones celulares. Hoy sabemos que el ciclo de Krebs y otras rutas producen equivalentes reductores y liberan  $\text{CO}_2$  y son los electrones entregados a la cadena respiratoria los que permiten el bombeo de protones, el potencial de membrana mitocondrial y la fosforilación oxidativa con consumo de  $\text{O}_2$  y formación de agua. A nivel mitocondrial se desarrollan el ciclo de Krebs, la transferencia electrónica y la fosforilación oxidativa, pero además tienen lugar otras importantes reacciones bioquímicas como la  $\alpha$ -oxidación de los ácidos grasos. La mitocondria interviene también junto con el retículo endoplasmático liso en la síntesis de esteroides y fosfolípidos. En 1959 Chevremont descubrió la presencia de moléculas de ADN en la matriz mitocondrial con una estructura diferente e independiente del ADN nuclear lo que denuncia el origen bacteriano de la mitocondria en la historia evolutiva de la célula. El proteoma mitocondrial se ha estimado hace unos meses en unas mil proteínas distintas de las que 600 se han identificado pero sólo 13 proteínas, 2 ARN ribosómicos y 22 de transferencia son codificados en el ADN mitocondrial humano. Más del 90% de las proteínas destinadas a las mitocondrias son codificadas por el ADN nuclear, sintetizadas en el citoplasma y luego importadas por las mitocondrias (4) (5) (10).

En tiempos recientes a la mitocondria se le ha asignado un nuevo e importante papel en la biología celular. Se trata de su fundamental participación como iniciador o amplificador en el proceso que conduce a la apoptosis o muerte programada de la célula. En concreto se ha identificado en la cámara externa o espacio intermembranoso la presencia de los componentes clave implicados en dicho proceso como son la caspasa 2, la caspasa 3, el AIF y el citocromo c que se localiza sobre la cara externa de la membrana interna e interviene en el funcionamiento de la misma. Todas estas moléculas son liberadas al citosol y participan en los mecanismos ejecutores de la apoptosis (6) (7).



## VARIABILIDAD Y PLASTICIDAD MITOCONDRIAL

El tamaño de la mitocondria oscila, en general, entre 0,5 y 1 micra de diámetro aunque puede alcanzar en algunas circunstancias un diámetro de hasta 2 micras. La morfología estructural de las mitocondrias es, asimismo, muy variable en relación con los distintos tipos celulares. Así, por ejemplo, podemos distinguir las mitocondrias que son alargadas y con crestas paralelas de los órganos metabólicamente activos, las mitocondrias con alta densidad de crestas y gran capacidad respiratoria de los músculos esqueléticos, las mitocondrias con crestas tubulares existentes en las células con metabolismo esteroideo o las mitocondrias con crestas en zig-zag del músculo cardíaco, con placas fenestradas en las células de Sertoli, con crestas prismáticas en los astrocitos o con crestas de disposición vesicular o longitudinal presentes en otras muchas células. El correlato funcional de las variantes mitocondriales de los distintos tejidos es muy poco conocido. Aunque con frecuencia las mitocondrias se distribuyen de manera uniforme en el citoplasma celular existe también variabilidad en la distribución de las mismas en distintos tipos celulares. Esta distribución depende de su interacción con el citoesqueleto. En el músculo se sitúan alrededor de las bandas A de las miofibrillas, en los bastones de la retina ocupan el segmento interno o en los túbulos renales se disponen en la región basal. La variabilidad no está sistematizada y no existe un modelo que explique como se regula esta diversificación durante la histogénesis. Tampoco conocemos el proteoma diferencial que subyace a estas variaciones estructurales.

Distintos estudios revelan que el condrioma ocupa una fracción constante del volumen citoplasmico en cada estirpe celular pero puede sufrir variaciones adaptativas. Ello implica unir al concepto de variabilidad antes comentado el concepto de plasticidad mitocondrial, a semejanza de los conceptos de plasticidad conectiva o sináptica que se utilizan en el Sistema nervioso. Se trata de un concepto que expresa la capacidad de reorganización estructural o funcional, de carácter adaptativo, en función del uso. La plasticidad del condrioma afecta al volumen total, a la tasa de renovación y al grado de fragmentación. Este último se regula por los mecanismos de fisión y fusión mitocondrial. Hoy se conocen algunos de los componentes —Mgm1, Ugo1, Fzo1, etc.— que participan en los procesos de fisión y fusión y algunos de los mecanismos moleculares que

los explican (15) (16). En relación con la cinética mitocondrial se acepta que las mitocondrias se originan siempre a partir del crecimiento y la división de mitocondrias preexistentes y que se eliminan (las mitocondrias dañadas) por un proceso de autofagocitosis. Este mecanismo de eliminación mitocondrial nunca ha sido cuestionado pero resulta muy difícil ponerlo en evidencia en células no manipuladas a diferencia de lo que ocurre cuando las células se someten a estímulos que aumentan los cambios regresivos.

Por tanto, la variabilidad y plasticidad de las mitocondrias dependen, en primer lugar, del programa de diferenciación celular y a continuación de las reacciones fenotípicas celulares de significación adaptativa. El grado de fragmentación y distribución citoplásmica se relacionan con las oscilaciones de las condiciones focales del citoplasma que, a su vez, dependen de la disponibilidad local de nutrientes y de las variaciones de la carga energética, relacionadas con el consumo de ATP. Las mitocondrias se localizan donde son necesarias (1) (2).

## OBJETIVO Y METODOLOGÍA

La presente comunicación tiene por objetivo aportar las bases estructurales que sustentan la existencia de un ciclo vital en las mitocondrias que conduce a la autodisolución progresiva de dichos elementos de un modo semejante a lo que ocurre en el proceso de apoptosis celular. El objetivo es asimismo demostrar la vigencia que aun tienen los métodos clásicos de la histología a la hora de interpretar dinámicamente algunos procesos celulares y titulares.

El trabajo inicial consistió en aplicar a cortes de hígado la técnica del Carbonato de plata de Rio-Hortega (1918) (13) (14), en la variante publicada por su discípulo Moisés Polak (1946) (12). El objetivo era identificar todas las mitocondrias existentes en un hepatocito con microscopía óptica, ante los límites que presentan otras técnicas estereológicas y enzimáticas, para establecer sin error el número y la densidad de volumen de dichos organelos. En el desarrollo del trabajo surgió la evidencia de que la impregnación era heterogénea y se consideró conveniente estudiar el patrón de distribución de los precipitados de oro metálico utilizados en la técnica. Por tal motivo algunos cortes de tejido (tras su impregnación) se procesaron para microscopía electrónica sin contraste alguno y otros

con contraste de rutina con acetato de uranilo y citrato de plomo. En ningún caso se utilizó tetroxido de Osmio. Los resultados que se describen a continuación permiten postular una secuencia morfológica que pone de relieve el ciclo vital de la mitocondria y sugieren la existencia de un programa de eliminación mitocondrial de naturaleza apoptótica. Estas aportaciones han sido realizadas por el Prof. Lopez- Cepero y sus resultados publicados a principio de este año 2004 en la revista *Journal Histochemistry and Cytochemistry* (8)

## HETEROGENEIDAD MITOCONDRIAL

La aplicación de la técnica del carbonato de plata de Rio-Hortega con la variante de Polak, identifica selectivamente las mitocondrias sobre un fondo limpio y permite realizar estudios sobre el número y la densidad mitocondrial en cortes de grosor estandarizado. El estudio de distintos tejidos y de poblaciones celulares con distinto grado de proliferación y diferenciación revela diferencias significativas en el número de mitocondrias. El examen de los cortes no contrastados al microscopio electrónico pone de relieve la existencia de un material granular de 5 a 20nm que se deposita en agrupaciones o formaciones, que están aparentemente rodeadas por una membrana invisible y cuyo rango de diámetro es el que corresponde a las estructuras mitocondriales. Mitocondrias del mismo tamaño y en la misma zona se impregnan con distinta densidad. La densidad de los gránulos no tiene relación con el tamaño mitocondrial. El material rellena la mitocondria y se deposita en la matriz colapsando progresivamente las crestas (fig. 1). El examen de los cortes contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo puso de relieve que además de las mitocondrias con depositos metalicos había algunas mitocondrias existian mitocondrias que no se impregnaban. Su porcentaje en los hepatocitos era del 10 al 25% en cada campo de observación. La utilización de la técnica del carbonato de plata asociada a la microscopía electrónica pone, por tanto de relieve, la existencia de una marcada heterogeneidad mitocondrial dentro de la célula y de una transición morfológica gradual que puede interpretarse como las diferentes etapas de un ciclo vital de las mitocondrias. En dichas etapas la mitocondria evoluciona desde una imagen ortotípica carente de depósitos granulares hasta la compactación máxima de dicho material granular y su posterior

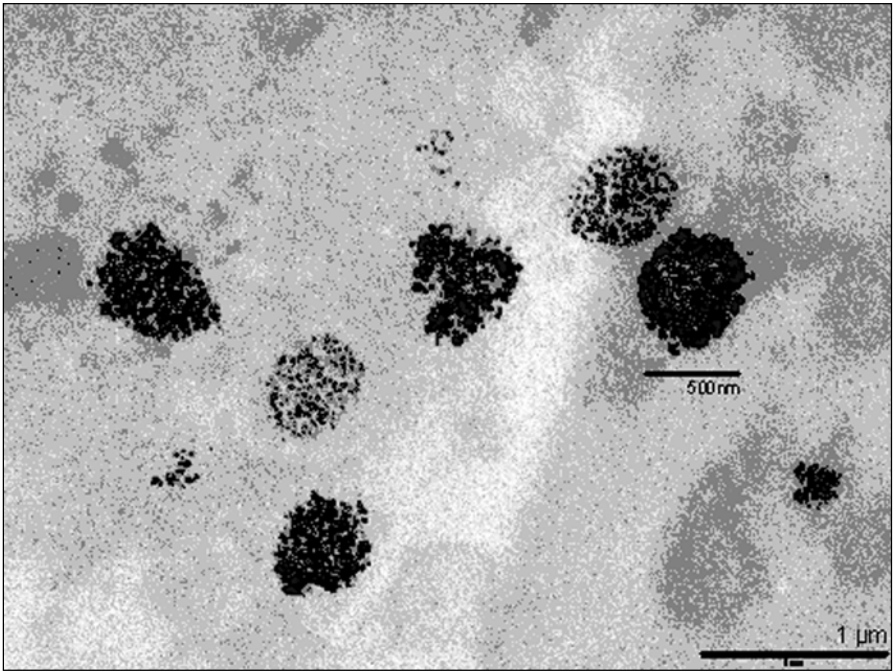


Fig. 1. Heterogeneidad mitocondrial en cortes no contrastados.

ruptura y fragmentación, pasando por la concentración progresiva de material granular en la matriz y una marcada reducción de su volumen (-pícnosis mitocondrial-). Algunas imágenes observadas pueden atribuirse a fisión mitocondrial o fragmentación mientras que otras pueden corresponder a procesos de fusión. Junto a las imágenes de ruptura mitocondrial parecen observarse en el citoplasma pequeños focos de depósito granular (fig. 2).

## CICLO MITOCONDRIAL

En las diferentes etapas morfológicas que se han considerado en el apartado anterior las mitocondrias no impregnadas observadas con microscopía electrónica y las impregnadas muy ligeramente representan las fases más tempranas del ciclo vital de las mitocondrias. Se trata de una etapa en la que la mitocondria importa los productos necesarios codificados en el genoma nuclear, absolutamente necesarios para el desarrollo y la actividad madura de la

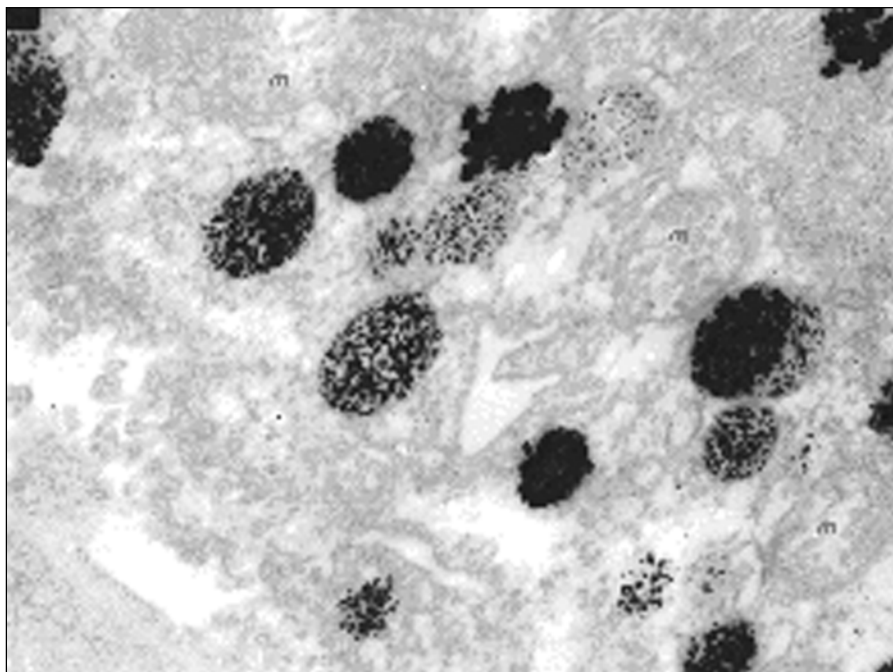


Fig. 2. Mitocondrias en diferentes etapas del ciclo vital.

mitocondria. En el otro extremo las mitocondrias compactadas y fragmentadas representan la fase final de senescencia o daño irreparable de estas organelas. La impregnación constituye por tanto un marcador de la edad mitocondrial que no se asocia a la maduración sino que precede y acompaña a la autodisolución.

Aunque no se conocen las bases fisicoquímicas ni el sustrato bioquímico de la impregnación utilizada es muy probable que la alta selectividad sea debida a una interacción específica con una o varias proteínas que pudieran existir en la matriz mitocondrial hacia la que, sin duda, el compuesto metálico muestra una especial avidez. Al parecer se trataría de algún componente que se iría concentrando progresivamente a medida que la mitocondria madura, envejece o resulta dañada. Estudios de incubación mitocondrial «in vitro» han demostrado desde los años setenta que en la mitocondria se origina un 1-2% de anión superóxido de todo el oxígeno consumido y que la producción de ROS –especies reactivas de oxígeno– por parte de las mitocondrias conduce progresivamente al daño oxidativo y por tanto a la alteración de componentes proteicos, li-

pídicos y del ADN mitocondrial, lo que incide sobre los 13 componentes que codifica para la cadena respiratoria. En las mitocondrias con daño oxidativo, y con un aumento en la producción de radicales libres y un déficit de recambio proteico, esto es en mitocondrias incardinadas en un proceso de envejecimiento, se va a producir progresivamente el proceso de autodisolución, el proceso que podría denominarse según el Prof. López-Cepero «apoptosis mitocondrial» (3) (8) (9) (17) (19). El papel que las proteasas PIM/Lon y Clp, existentes en la matriz mitocondrial pudieran tener en este proceso y su posible concentración en el seno de la misma a medida que avanza el ciclo y por tanto su responsabilidad en la disolución mitocondrial es algo que habrá que determinar y resolver en un próximo futuro (18). Al ser proteasas ATP dependientes (AAA proteasas) solo las mitocondrias dañadas pero no energéticamente muertas podrían utilizar este mecanismo.

El significado último de los hechos que pone de relieve el ciclo mitocondrial descrito se nos escapa por el momento aunque podría constituir por un lado un mecanismo destinado a garantizar la renovación y el mantenimiento estructural y funcional del condrioma y, por otro, un mecanismo preventivo de eliminación de mitocondrias viejas o dañadas antes de que estas liberen los factores proapoptóticos existentes en su seno. La apoptosis mitocondrial sería en última instancia un mecanismo al servicio de la viabilidad y supervivencia celular mediante la estrategia de autodisolución apoptótica de mitocondrias dañadas que, quizá, debería tenerse en cuenta como indicador, en cualquier programa que pretenda evaluar la viabilidad de las células destinadas a terapia. Es preciso recordar que el daño mitocondrial acumulado es uno de los correlatos morfofuncionales más fiables del grado de envejecimiento celular, un riesgo grave para la supervivencia celular, y un elemento clave en todas las teorías del envejecimiento.

## BIBLIOGRAFÍA

1. BERTONNI-FREDARI, C.; FATTORETTI, P.; CASOLI, T.; DI STEFANO, G.; SOLÁIS, M.; GRACCIOTTI, N.; POMPEI, P. (2001): «Mapping of mitochondrial metabolic competent by cytochrome oxidase and succinic dehydrogenase cytochemistry». *J. Histochem. Cytochem.* 49: 1191-1192.
2. BOLDOGH, I.; VOJTOV, N.; KARMONS, S.; PON, L.A. (1998): «Interaction between mitochondria and the actin cytoskeleton in budding yeast requi-

- res two integral mitochondrial outer membrane proteins Mmm1p and Mdm10p». *J. Cell Biol.* 141: 1371-1381.
3. BOVERIS, A.; CHANCE, B. (1973): «The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen». *Biochem. J.* 134: 707-716.
  4. EMSTER, L.; SCHATZ, G. (1981): «Mitochondrial: a historical review». *J. Cell Biol.* 91:227-255.
  5. FREY, T.G.; MANNELLA, C.A. (2000): «The internal structure of mitochondria». *Trends Biochem. Sci.* 25: 319-324.
  6. GREEN, D.R.; REED, J.C. (1998): «Mitochondria and apoptosis». *Science* 281: 1309-1312.
  7. KROEMER, G.; DALLAPORTA, B.; RESCHE-RIGON, M. (1998): «The mitochondrial death-life regulator in apoptosis and necrosis». *Annu. Rev. Physiol.* 60: 619-642.
  8. LÓPEZ-CEPERO, J.M. (2004): «Silver carbonate staining reveals mitochondrial heterogeneity». *J. Histochem. Cytochem.* 52(2): 211-216.
  9. MENZIES, R.A.; GOLD, P.H. (1971): «The turnover of mitochondria in a variety of tissues of young adult and aged rats». *J. Biol. Chem.* 246: 2425-2429.
  10. MITCHELL, P. (1961): «Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type mechanism». *Nature* 191: 144-148.
  11. ORTIZ-PICÓN, J.M.; PÉREZ-LISTA, J. (1929): «Aportación al conocimiento del condrioma de la célula nerviosa». *Bol. Real Soc. Esp. Hist. Nat.* XXIX: 147-174.
  12. POLAK, M. (1946): «Sobre una técnica sencilla y rápida para la coloración del condrioma». *Arch. Histol. Norm. Patol.* III: 365-376.
  13. RÍO-HORTEGA, P. (1918): «Notas técnicas. Noticia de un nuevo y fácil método para la coloración de la neuroglía y del tejido conjuntivo». *Trab. Lab. Inv. Biol. Univ. Madrid* XV (1917): 367-378.
  14. RÍO-HORTEGA, P. (1925): «Condrioma y granulaciones específicas de las células neurológicas». *Bol. Soc. Esp. Hist. Nat.* XXV:34-55.
  15. SCOTT, S.V.; CASSIDY-STONE, A.; MEEUSEN, S.L.; NUNNARI, J. (2003): «Staying in aerobic shape: how the structural integrity of mitochondria and mitochondrial DNA is maintained». *Current Opinion in Cell Biology*, 15 (4): 482-488.
  16. SHAW, J.M.; NUNNARI, J. (2002): «Mitochondrial dynamics and division in budding yeast». *Trends in Cell Biology*, 12 (4): 178-184.
  17. SZIBOR, M.; HOLTZ, J. (2003): «Mitochondrial ageing». *Basic Res. Cardiol.* 98: 210-218.
  18. VAN DYCK, L.; LANGER, T. (1999): «ATP-dependent proteases controlling mitochondrial function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*». *Cell Mol. Life Sci.* 56: 825-842.
  19. WEI, Y.H.; LEE, H.C. (2002): «Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation and impairment of antioxidant enzymes in aging». *Exp. Biol. Med.* 227: 671-682.

## **INTERVENCIÓN DEL PROF. BLÁZQUEZ FERNÁNDEZ**

También quiero manifestar mi agradecimiento al Prof. Campos Muñoz por haber traído este tema; con la brillantez que lo ha expuesto, al igual que el Prof. Mayor Zaragoza, juntos han hecho una gran sesión científica. Tengo curiosidad por algunos aspectos que ha tocado. El primero, en la apoptosis un hecho fundamental inicial es la contribución de la mitocondria al proceso general apoptótico. La primera pregunta es que si esto que llama apoptosis mitocondrial se refiere a ese punto o es un proceso que puede ser hasta cierta medida independiente del general; en otras palabras, si morfológica o bioquímicamente nosotros podríamos diferenciar entre lo que es la apoptosis general de la célula y lo que podría ser de la mitocondria.

La segunda pregunta sería: ¿qué reacción ocurre en esas distintas poblaciones de mitocondrias cuando unas se tiñen y otras no se tiñen? ¿Se debe a algún proceso, por ejemplo, la fragmentación del ADN mitocondrial, a la acción de las proteasas, o si finalmente eso en la evolución da lugar a la producción de microcuerpos, lo mismo que ocurre en la apoptosis general?

## **PALABRAS FINALES DEL PRESIDENTE**

Quiero felicitar a los dos conferenciantes de hoy, excelentes conferencias. Posiblemente, hemos entrado en los círculos académicos, no sólo de esta Academia, de una integración de las modernas técnicas de diferentes estructuras científicas, en modernas interpretaciones que modifican conceptos y conocimientos muy clásicos. Creo que debemos tener amplia esperanza en nuestros investigadores.

Les felicito, Prof. Mayor Zaragoza y Prof. Campos Muñoz, por sus extraordinarias aportaciones.

Se levanta la sesión.