

## **RESPUESTA DE LAS CÉLULAS DE LAS PLANTAS AL CRECIMIENTO EN AMBIENTE ESPACIAL: UN EXPERIMENTO EN LA ESTACIÓN ESPACIAL INTERNACIONAL**

**FRANCISCO JAVIER MEDINA**

*Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC),  
Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid  
fjmedina@cib.csic.es*

### **BIOLOGÍA ESPACIAL**

Si, desde los albores de la civilización, el ser humano ha mirado hacia arriba y se ha preguntado qué significado tenían esos millones de estrellas que brillaban en la noche, no digamos con qué ansiedad se ha interrogado sobre la existencia de vida fuera de la Tierra y cómo ha estimulado su natural ansia de curiosidad y aventura la posibilidad de salir de nuestro planeta “a ver qué hay más allá”. En nuestro tiempo presente hemos tenido la inmensa fortuna de asistir al comienzo de la plasmación de estas ansias del conocimiento humano, casi ancestrales, en algunas realidades, y el objetivo de este artículo es aproximar al lector a una pequeña parte de los esfuerzos que se están realizando, en concreto, en el campo biológico.

Ante todo, sin embargo, deberíamos sistematizar y acotar el terreno en el que nos vamos a mover. Cuando hablamos de “Biología Espacial” es evidente que estamos considerando a los seres vivos y a la propia criatura humana situados en un medio ambiente externo a la Tierra. A partir de este hecho debemos constatar que se suscitan dos grandes preguntas, las cuales dan lugar a dos tipos de investigaciones biológicas muy distintas en sus objetivos científicos y en su metodología. La pregunta ¿hay seres vivos fuera de la Tierra? origina la disciplina denominada “Astrobiología”, que ha adquirido carta de naturaleza a base de buscar en la tierra condiciones ambientales raras o extremas debidas a factores físicos o químicos (que se supone que reproducirían o se aproximarían a las condiciones ambientales de otros planetas) e investigar los organismos que son capaces de colonizar estos ambientes (los denominados “extremófilos”). Por otra parte, la pregunta ¿qué les pasa a las criaturas terrestres cuando salen del planeta? origina toda una variedad multidisciplinar de investigaciones sobre los efectos de un medio ambiente externo a la Tierra en los organismos terrestres. Estos efectos se estudian con los abordajes y metodologías que utiliza la Biología moderna para investigar la respuesta de los seres vivos a condiciones de estrés y en ellos se centrarán los experimentos que se describen en este artículo. Debe mencionarse, además, en relación con la supervivencia de organismos terrestres fuera de nuestro planeta, que se están realizando importantes esfuerzos para posibilitar el traslado al espacio exterior de réplicas a escala de los ecosistemas terrestres, de manera que los organismos puedan sobrevivir al amparo de instalaciones que, de un modo autónomo y sostenible, sean capaces de producir nutrientes y de eliminar residuos. Estos son los denominados “Sistemas de Soporte Vital”, en los que el hombre ocupa el vértice de la pirámide trófica. En fin, toda esta variedad de investigaciones, ya planteadas o sólo imaginadas, nos muestra que el concepto “Biología Espacial” es de una enorme complejidad y diversidad.

Como es bien sabido por su gran impacto en los medios de comunicación, la Astrobiología ha recibido un extraordinario impulso a partir de la decisión del Presidente de los Estados Unidos de América de promover la llegada del hombre a Marte en unas pocas décadas y, como etapa transitoria, la vuelta a la Luna. Uno de los aspectos más fascinantes de Marte es la sospecha, científicamente fundamentada, de la existencia allí de formas de vida, de modo que se ha desencadenado una cierta fiebre por obtener los más diversos datos sobre la naturaleza físico-química de este planeta y por encontrar en la Tierra algún organismo que fuera compatible con ella, aunque fuera sólo parcialmente, todo ello a la espera del hallazgo de algún rastro de actividad vital en alguna muestra procedente de nuestro planeta vecino. Por su parte, la supervivencia fuera de la Tierra de organismos terrestres, interesante como un reto fascinante por sí solo, es además un requisito imprescindible para llevar a cabo los planes de exploración de otros planetas o satélites. Con este objetivo, las principales Agencias Espaciales están impulsando fuertemente el diseño y construcción de Sistemas de Soporte Vital, con objeto de trasladarlos al espacio e incluso instalarlos en la superficie de Marte o la Luna. No obstante, el desarrollo de estos sistemas no elimina la necesidad de adaptación y supervivencia a algunos factores ambientales difícilmente soslayables fuera de la Tierra, el más importante de los cuales es la ausencia de gravedad o, mejor dicho, su presencia en magnitudes inferiores en varios órdenes a la de la Tierra. Esta es la denominada "Microgravedad".

## **GRAVEDAD, MICROGRAVEDAD Y BIOLOGÍA**

La existencia del vector gravedad es un factor físico básico y permanente en la Tierra, como expresión en nuestro planeta de la Ley de la Gravitación Universal. El vector gravedad ha estado presente de un modo constante desde la aparición de la vida y durante los 3500 millones de años que han transcurrido de evolución biológica hasta la actualidad. La gravedad ha modelado nuestro mundo y ejercido una influencia constante en todos los procesos biológicos. Para hacernos una idea intuitiva de la influencia de la gravedad en nuestra forma de vida, probemos a prescindir de los conceptos "arriba" y "abajo" e imaginemos por un momento cuántas cosas se alterarían.

La influencia de la gravedad sobre los procesos biológicos se ejerce de modo indirecto. La gravedad es un fenómeno físico y sus variaciones actúan sobre otros procesos físicos, modificándolos; esto ocurre con la sedimentación, la flotación, la convección y la presión hidrostática, entre otros muchos procesos. Puesto que las interacciones moleculares en las que se fundamenta la vida son posibles, precisamente, gracias a la existencia de estos procesos físicos, la alteración de éstos, debida a cambios en el vector gravedad, producirá necesariamente modificaciones significativas en las reacciones bioquímicas.

La investigación de los efectos de la ausencia de gravedad sobre los seres vivos se planteó por primera vez a comienzos del siglo XX como un problema de ciencia básica, sin relación con la exploración espacial. Fue entonces cuando se desarrollaron los primeros "clinostatos", unos dispositivos capaces de compensar la fuerza de la gravedad a base de someter al objeto de experimentación a un giro a una determinada velocidad angular. Sin embargo, a partir de los primeros vuelos espaciales se observó que la ausencia de gravedad era el principal factor diferencial del ambiente existente a bordo de los vehículos espaciales respecto del ambiente terrestre; enseguida comenzaron a observarse modificaciones en los seres vivos debidas a este factor, y cuando se constató que los efectos sobre el ser humano eran significativos, sobre todo en términos de masa ósea y muscular, se puso en evidencia que la investigación biológica en microgravedad era un requisito imprescindible para poder progresar en la presencia humana en el espacio. A partir de este momento, los clinostatos y otros aparatos que permiten simular la microgravedad en Tierra, desarrollados posteriormente, adquirieron una nueva relevancia como elementos auxiliares de la investigación espacial.

Así pues, por primera vez en toda la historia de la evolución, el ser humano ha sido capaz, desde hace unas pocas décadas, de colocarse a sí mismo y a otros seres vivos en un ambiente carente de gravedad y así sustraerse a este factor físico que ha modulado su filogenia y su ontogenia. Si bien los objetivos primordiales de estas investigaciones están dirigidos a posibilitar la adaptación al medio espacial, o al menos a contrarrestar sus efectos adversos con vistas a la exploración extraterrestre, no es menos cierto que estas investigaciones poseen también un gran valor para la Biología Fundamental, permitiendo obtener conocimientos básicos sobre los mecanismos de la vida. No es tampoco desdeñable el interés tecnológico que presentan estas investigaciones, desde la construcción de los propios vehículos espaciales, pasando por el “hardware” necesario para poder llevar a cabo los experimentos, hasta las soluciones que es preciso encontrar para los problemas cotidianos, como por ejemplo la necesidad de que los objetos estén fijados a las paredes del habitáculo espacial y no estén permanentemente flotando, pero puedan ser fácilmente desprendidos de ellas y vueltos a fijar, lo que llevó al desarrollo del “velcro”, de utilización tan frecuente en nuestra vida diaria en la Tierra.

## LA ESTACIÓN ESPACIAL INTERNACIONAL (ISS)

Como se ha comentado, la investigación biológica sobre los efectos de la microgravedad comenzó casi desde los albores de la exploración espacial. A lo largo del tiempo transcurrido desde entonces, el problema más importante que se han encontrado los investigadores ha sido poder disponer a bordo del vehículo espacial de unas condiciones lo más parecidas posibles a las del laboratorio de la Tierra para poder diseñar experimentos con abordajes modernos y metodologías actualizadas. En la práctica, la realización de experimentos en el espacio ha requerido siempre la modificación de los procedimientos habituales, teniendo que restringir, por ejemplo, el espacio (sitio) disponible, la liberación al exterior de sustancias, máxime si estas son tóxicas y/o volátiles, el personal técnico a cargo del experimento, ya que los únicos operadores son los astronautas (cuando el vuelo es tripulado), cuyo programa de trabajo suele estar saturado y cuya especialización en métodos científicos es mínima, el requerimiento de energía, un recurso tecnológicamente limitado y económicamente muy caro, etc. Por otra parte, los aparatos científicos habituales en la Tierra raramente pueden acoplarse en vehículos espaciales, necesitando, como mínimo, adaptaciones, y lo más frecuentemente, la construcción de “hardware” exclusivo, tecnológicamente muy complejo y extremadamente costoso. A lo largo de las pasadas décadas ha habido intentos útiles, pero limitados, de resolver estos problemas, como las sucesivas estaciones espaciales soviéticas (las “Salyut” y la “Mir”) y el “Spacelab”, un proyecto conjunto europeo-norteamericano, que voló en numerosas misiones a bordo de los transbordadores de la NASA y que contenía, entre otros, el módulo “Biorack”, diseñado en Europa, en el que se obtuvieron los resultados más importantes conseguidos hasta la fecha en el campo de la Biología Celular y Molecular. En los años 1980s, primero como respuesta a la estación soviética “Mir” y, tras la caída del muro, como un desarrollo multinacional de esta tecnología, se diseñó y abordó la construcción y ensamblaje de la “Estación Espacial Internacional” (ISS por sus siglas en inglés), un intento realmente serio y ambicioso de dotar a la investigación espacial de unos medios verdaderamente comparables a los existentes en los laboratorios terrestres. La ISS, en el momento que se proyectó, fue la iniciativa de cooperación multinacional con fines pacíficos más ambiciosa de la historia, e implicó a todas las agencias espaciales existentes en ese momento en el mundo: la norteamericana, la rusa, la europea, la japonesa y la canadiense. La construcción y ensamblaje de la ISS ha sufrido un sinnúmero de vicisitudes; de hecho, en el momento actual (2008) debería estar finalizada y aún no lo está. El trágico accidente del transbordador norteamericano “Columbia” en febrero de 2003, con la muerte

de sus siete tripulantes, estuvo a punto de dar al traste con el proyecto. En este momento, las prioridades han cambiado, se han detectado fallos y errores graves en el diseño del proyecto y se ha rehecho el programa en varias ocasiones, pero, finalmente, la expectativa es que la ISS podrá ser completada y su explotación científica podrá llevarse a cabo, si no según todo lo previsto, sí en gran parte, e incluso abrir nuevas perspectivas de investigación que se han suscitado durante el largo período de su diseño, construcción y ensamblaje. Las Tablas 1 y 2 recogen algunos hitos históricos de la ISS y algunos datos numéricos de interés, respectivamente. Por su parte, la figura 1 muestra tres recreaciones artísticas de la ISS realizadas por la Agencia Espacial Europea (ESA) en su proyectada configuración final (Fig. 1a), en el estado en que se encontraba en octubre de 2.003, cuando se desarrolló la “Misión Cervantes” o “Misión Soyuz Española” (Fig. 1b) y en julio de 2.006, durante la Misión Europea de Larga Duración “Astrolab” con el transbordador norteamericano acoplado a la Estación (Fig. 1c).

<b>1984:</b> El Presidente de los Estados Unidos, Ronald Reagan anuncia la intención de desarrollar la Estación Permanente <i>Freedom</i> .
<b>1988:</b> Acuerdos con las Agencias Canadiense y Europea.
<b>1989:</b> Acuerdo con la Agencia Japonesa.
<b>1993:</b> Firma del Plan de Desarrollo y Ensamblaje de la ISS, ya con Rusia integrada entre los promotores.
<b>20-11-1998:</b> Lanzamiento y puesta en órbita del primer módulo de la ISS: el módulo ruso <i>Zarya</i>
<b>31-10-2000:</b> Primera tripulación de la ISS: dos cosmonautas rusos (Serguei Krikalev y Yuri Gridzenko) y un astronauta americano (Bill Shepherd).
<b>07-02-2001:</b> Lanzamiento del laboratorio americano <i>Destiny</i>
<b>01-02-2003:</b> Accidente del transbordador <i>Columbia</i> . Alteración de los planes de Desarrollo y Ensamblaje de la ISS
<b>18-10-2003:</b> Lanzamiento de la nave <i>Soyuz 6S</i> con una tripulación de reemplazo para la ISS (dos astronautas, uno ruso y un americano) y el astronauta español de la ESA Pedro Duque para desarrollar la “Misión Cervantes”, financiada por España.
<b>26-07-2005:</b> Reanudación de los vuelos del Transbordador norteamericano. Misión STS-114 del vehículo “Discovery”. <b>La ISS puede continuar su construcción.</b>
<b>04-07-2006:</b> Misión STS-121 del transbordador “Discovery”. Se instalan el EMCS y el congelador a -80°C “Melfi”. Thomas Reiter (ESA) comienza la Misión “Astrolab”, de 6 meses. La tripulación permanente se establece de nuevo en tres miembros.
<b>07-02-2008:</b> Misión STS-122 (misión de montaje 1E) del transbordador “Atlantis”, con dos astronautas europeos, en la que se instala el Módulo Europeo “Columbus”.
<b>2008:</b> Previsión de puesta en servicio del Vehículo Automático de Transporte (ATV) “Julio Verne” (Europeo).
<b>2010:</b> Previsión de la finalización del ensamblaje de la ISS y fin de la operatividad de los transbordadores norteamericanos.

Tabla 1. Algunos hitos de la construcción, ensamblaje y actividad de la Estación Espacial Internacional (ISS)

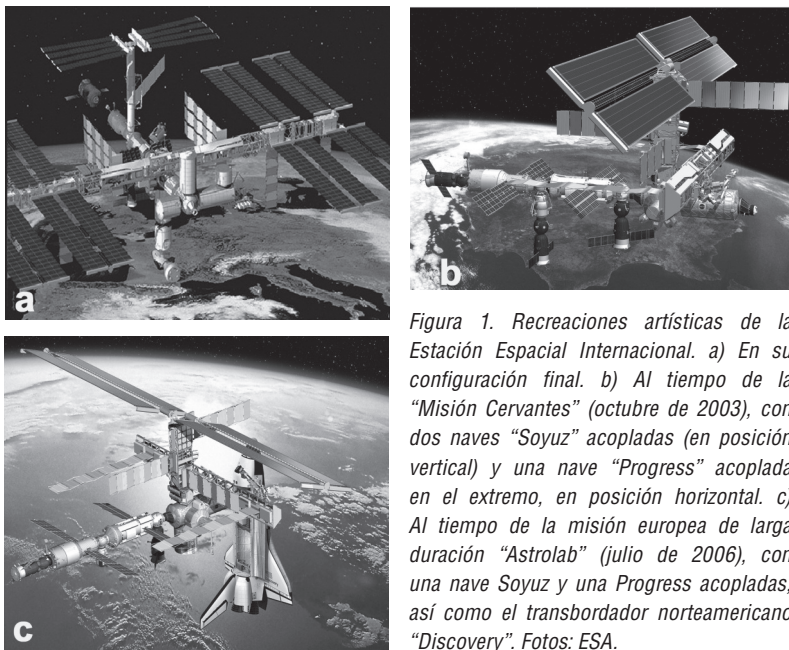
Así pues, queda claro que la ISS es esencialmente un laboratorio avanzado (el mejor dotado que se ha diseñado hasta hoy) para investigar los efectos del ambiente espacial y en particular de la microgravedad, sobre una gran variedad de sustratos y de procesos biológicos y físicos. Indudablemente, el objeto más importante de estudio es el propio ser humano, de modo que la mayor parte de los recursos se dedican al análisis de las variaciones fisiológicas que experimentan los astronautas. El problema de la resistencia del ser humano a las condiciones del espacio y en particular a la alteración de la gravedad, dista mucho de estar resuelto y es

Laboratorios: 6	Inclinación órbita: 51,6°
Ocupantes (capacidad máxima): 7 (*)	Espacio habitable: 1200 metros cúbicos
Altitud: 335 - 460 km	Masa total: 450 toneladas
Velocidad: 27720 km/h	Plazo de ejecución inicialmente previsto: de 1998 al año 2004-2005 (**)
Órbita terrestre: una cada 90 minutos aprox. (15 al día)	Vida útil: mínimo 10 años
Longitud: 108 metros	Construcción en 3 fases (70 vuelos)
Anchura: 74 metros	Inversión: más de 20 mil millones de euros

(\*) En estos momentos la tripulación permanente la forman **tres astronautas**.

(\*\*) Revisión del Plazo tras el accidente del “Columbia” (2003): Finalización del ensamblaje en 2010.

*Tabla 2. Algunos datos numéricos de la ISS*



*Figura 1. Recreaciones artísticas de la Estación Espacial Internacional. a) En su configuración final. b) Al tiempo de la “Misión Cervantes” (octubre de 2003), con dos naves “Soyuz” acopladas (en posición vertical) y una nave “Progress” acoplada en el extremo, en posición horizontal. c) Al tiempo de la misión europea de larga duración “Astrolab” (julio de 2006), con una nave Soyuz y una Progress acopladas, así como el transbordador norteamericano “Discovery”. Fotos: ESA.*

un condicionante imprescindible para poder emprender nuevos planes de exploración espacial tripulada que exijan vuelos de larga duración. La investigación biológica sobre otras especies y modelos experimentales es también de gran importancia por múltiples razones: en primer lugar, como modelos en los que buscar posibles soluciones a problemas que finalmente sean aplicables al hombre; en segundo lugar, porque el hombre debe ser acompañado por otras especies en los proyectos de exploración y eventual colonización de otros planetas; además, por el interés intrínseco y básico de aumentar nuestros conocimientos sobre los procesos vitales en las condiciones del estrés gravitatorio, cuya importancia y trascendencia ya se han puesto de

manifiesto en párrafos precedentes. Por otra parte, siendo la gravedad un fenómeno físico, la investigación en Ciencias Físicas a bordo de la ISS es de una enorme importancia. Aunque escapan del propósito de este trabajo y de la especialización de su autor, no puede dejar de mencionarse la relevancia de las investigaciones en la ISS sobre dinámica de fluidos, cristalización de materiales (la cristalización de proteínas en microgravedad se ha revelado como una aplicación de enorme productividad y potencialidad, gracias a los trabajos del investigador español Juan Manuel García Ruiz), combustión, etc. Finalmente, deben también mencionarse los estudios de Observación de la Tierra (efectos del cambio climático, volcanes, terremotos, huracanes, deforestación, estudios atmosféricos, etc., etc.), que utilizan la ISS como observatorio privilegiado y la multitud de aplicaciones tecnológicas, directas o indirectas, con aplicación terrestre a muy diverso plazo, que se suscitan de la propia construcción y mantenimiento de la Estación y de la actividad llevada a cabo en sus instalaciones.

## LOS EFECTOS DE LA MICROGRAVEDAD SOBRE LAS CÉLULAS

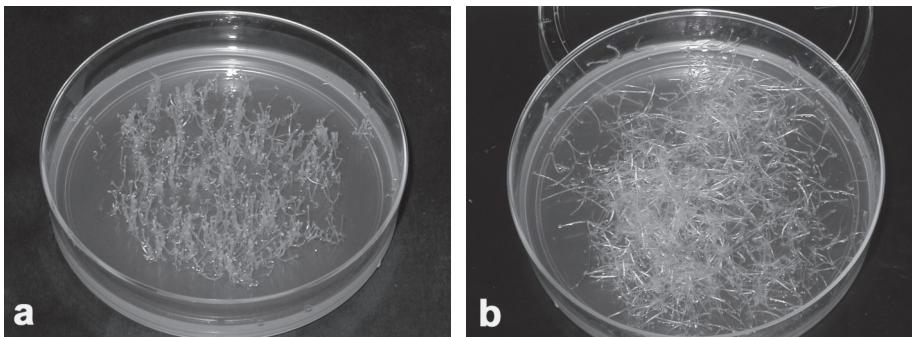
Tras todas las consideraciones de carácter general que se han hecho hasta aquí, es hora ya de concretar y de centrarnos en los temas sustanciales de este trabajo. De aquí en adelante vamos a tratar de Biología Celular de Plantas y sería conveniente que abordásemos el tema recapitulando brevemente algunos datos sobre las alteraciones en las funciones celulares inducidas por la ausencia de gravedad. Es muy importante investigar estos temas porque los procesos funcionales que ocurren en las células de un organismo son la base y la causa del comportamiento fisiológico del organismo entero. Por ejemplo, parece demostrado que las alteraciones celulares son responsables de las perturbaciones fisiológicas observadas en los astronautas y los animales de experimentación durante y tras su permanencia en órbita. La función de muchos órganos y sistemas se altera gravemente en condiciones de baja gravedad, dando lugar a pérdidas de fluidos y electrolitos, osteoporosis, pérdida de masa muscular, respuesta inmune reducida, atrofia cardíaca y otros síndromes (White y Averner, 2001). Es cierto que no se pueden desdeñar los mecanismos de integración a nivel de tejido, de órgano, e incluso de organismo completo, que producen que el todo no sea la mera suma de las partes; un ejemplo interesante a este respecto es el desarrollo embrionario de la mosca *Drosophila*, que ocurre con total normalidad en sus aspectos esenciales, aún cuando se ha demostrado la existencia de alteraciones a nivel celular e incluso de expresión diferencial de un importante número de genes (Marco *et al.*, 1996). En todo caso, la trascendencia de los estudios de Biología Espacial a nivel celular es difícilmente discutible.

En la base de todas las alteraciones celulares encontradas en ambiente de baja gravedad se encuentra el hecho de que las células eucarióticas son muy sensibles a las fuerzas mecánicas. En realidad, la localización de los componentes celulares depende de la integridad y organización espacial de la arquitectura citoesquelética, formada por un complejo entramado de fibras y tubos de tres tipos: microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios, cada uno de los cuales se caracteriza por su composición proteica específica, que origina una estructura peculiar y también un mecanismo de acción propio. En concreto, se ha demostrado que la microgravedad altera la estructura y la función del citoesqueleto en varios tipos celulares muy distintos entre sí, como los osteoblastos, las células gliales o las células tumorales y también que produce alteraciones en funciones celulares globales, tales como el metabolismo regulado por hormonas y la diferenciación (Infanger *et al.*, 2006). Otros estudios han puesto en evidencia cambios en la ultraestructura de orgánulos celulares, como mitocondrias, cloroplastos, retículo endoplásmico y aparato de Golgi (Claasen y Spooner, 1994; Kordyum, 1997).

## LA MICROGRAVEDAD Y LAS PLANTAS

Las plantas son probablemente los organismos vivos en los que se manifiesta con más evidencia la influencia de la gravedad como factor ambiental decisivo. Las plantas son organismos sésiles, es decir, inmóviles, y su crecimiento está condicionado por su orientación espacial, de acuerdo con los denominados “tropismos”. Entre estos tropismos hay tres que son esenciales: el fototropismo (orientación respecto a la luz), el quimiotropismo (orientación frente a estímulos originados por características peculiares de determinadas moléculas) y el gravitropismo (orientación respecto del vector gravedad). En concreto, el gravitropismo determina que la raíz crezca hacia abajo (en sentido positivo del vector) y el tallo crezca hacia arriba (en sentido negativo del vector). La trascendencia del gravitropismo es evidente, puesto que el sentido de crecimiento de la raíz hace posible la captación de nutrientes en el suelo por parte de sus órganos especializados (los pelos absorbentes), mientras que el sentido de crecimiento del tallo capacita a las hojas para su exposición a la luz solar y, consiguientemente, para la realización de la fotosíntesis. Ciertamente, el gravitropismo interacciona con el quimiotropismo en la raíz y con el fototropismo en el tallo, pero es una característica fundamental para el máximo aprovechamiento de las fuentes de nutrientes y de energía.

La ausencia de gravitropismo, o la alteración del vector gravedad, producen consecuencias muy evidentes, como el cambio en la dirección del eje de la planta o el aspecto enmarañado que presentan los cultivos de plántulas crecidas en ambiente de ausencia de gravedad (Fig. 2).



*Figura 2. Diferencias en el crecimiento de plántulas de la especie *Arabidopsis thaliana* debidas al gravitropismo. a: En condiciones control, en la Tierra, con gravedad 1 g, todas las plántulas crecen alineadas, con los tallos hacia arriba y las raíces hacia abajo. b: En condiciones de microgravedad no existe gravitropismo y, por tanto no hay dirección establecida para el crecimiento de las plántulas, las cuales crecen en direcciones aleatorias.*

El gravitropismo positivo de las raíces de las plantas se debe a unas células especializadas en la recepción de estímulos mecánicos denominadas estatocitos, que se localizan en el extremo de la raíz, en una zona llamada columela, que forma parte de la cofia. La especialización en la mecanosensibilidad se debe a los estatolitos, que son amiloplastos (es decir, plastidios cargados de granos de almidón) cuyo movimiento en función de la gravedad estimula una cadena de transducción de señales que termina en el núcleo con la expresión diferencial de determinados genes y en la generación de cambios en secreciones hormonales, resultando todo ello en cambios morfológicos de la planta.

Se ha estudiado con mucho detalle el desencadenamiento de la señal mecanosensible y las diversas etapas de la cadena de transducción de esta señal. En condiciones de gravedad control (1 g; la gravedad de la Tierra) la posición de los estatolitos determina una evidente polaridad celular: las imágenes de la ultraestructura de los estatocitos muestran con claridad que los estatolitos aparecen agrupados en el polo de la célula al que apunta el vector gravedad y el núcleo de la célula se localiza en el polo opuesto, existiendo un contacto entre la envuelta nuclear y la membrana plasmática. En condiciones de microgravedad, la polarización de la célula se pierde, apareciendo los estatolitos dispersos por todo el territorio celular; el núcleo, aunque no se desplaza excesivamente, pierde el contacto con la membrana plasmática y este, precisamente, es el hecho que desencadena la transducción de la señal (Perbal, 2001). Las etapas de esta cadena de transducción comienzan porque el estímulo recibido por la membrana plasmática provoca tensiones en los microfilamentos de actina, que forman parte del citoesqueleto y poseen también puntos de unión a esta membrana plasmática; estas tensiones activan canales de iones de calcio a través de la membrana hacia el interior de la célula, de modo que los iones calcio estimulan la secreción diferencial de auxinas, unas hormonas vegetales que tienen un alto poder mitogénico, es decir, estimulador de la división celular. El efecto final es que, si en condiciones de gravedad control todas las capas celulares de la raíz poseían un contenido equilibrado en auxinas y, por tanto, crecían equilibradamente, en condiciones de gravedad alterada, la distribución de auxinas en la raíz está desequilibrada, lo que produce un mayor crecimiento de unas capas de células respecto a otras y, finalmente, la curvatura de la raíz (Boonsirichai *et al.*, 2002).

Por otra parte, con objeto de evaluar los efectos sobre la expresión génica que podía producir un leve cambio en la percepción de la gravedad, se realizó un experimento consistente en germinar semillas en una placa de Petri y, al cabo de algunos días, cuando las plántulas habían desarrollado ya raíces de unos pocos centímetros de longitud, girar la placa 90° respecto de la dirección del crecimiento. Un breve período de crecimiento en las nuevas condiciones permitió constatar que las plántulas habían reorientado su crecimiento y se habían curvado, buscando siempre la dirección del vector gravedad. Tras este período se analizaron las muestras mediante la técnica de “microarrays” con objeto de evaluar los genes que se estaban expresando y se comparó el resultado con el obtenido de plántulas control, a las que no se sometió a ningún giro. Hasta 150 genes mostraron expresión diferencial entre las plántulas sometidas al cambio en su referencia gravitópica respecto de los controles (Moseyko *et al.*, 2002). Este experimento demuestra hasta qué punto los estímulos mecánicos son importantes en la actividad de las células vegetales. De hecho, el elevado número de genes afectados indica que muchas y muy diversas funciones celulares son sensibles a las alteraciones en este tipo de estímulos; evidentemente, estas funciones celulares alteradas resultan en alteraciones más o menos drásticas en las funciones del organismo completo.

En la práctica se ha demostrado experimentalmente que la alteración en la dirección del crecimiento no es el único efecto que se observa en las plantas cuando crecen en un ambiente de gravedad reducida. Otros parámetros, medidos a nivel bioquímico, celular o fisiológico, como la propia morfometría general de la planta, su tasa de crecimiento, la proliferación celular, el índice mitótico, la distribución de los orgánulos subcelulares, la regulación del ciclo celular o la capacidad reproductiva, han aparecido alterados en diferentes experimentos, respecto de los correspondientes controles crecidos en las condiciones de gravedad terrestre (Kordyum, 1997). De importancia particular son los efectos encontrados sobre la capacidad de crecimiento de las plantas, puesto que si las plantas crecen menos o crecen peor en ausencia de gravedad, su eficacia como fuente nutritiva en una misión de exploración espacial de larga duración queda seriamente comprometida. Es evidente que el objetivo final de toda esta investigación es conseguir el cierre



del ciclo vital de las plantas, es decir, “obtener semillas desde semillas” y ello en proporciones razonablemente altas y con ejemplares suficientemente robustos y productivos. Para ello es imprescindible conocer las alteraciones provocadas por la ausencia de gravedad en aquellos procesos celulares sobre los que se construye el crecimiento y el desarrollo de la planta, entre los que se encuentran la proliferación celular y el crecimiento celular.

### LA “MISIÓN CERVANTES” (“MISIÓN SOYUZ ESPAÑOLA”) Y EL EXPERIMENTO “ROOT”

La ISS necesita renovar su tripulación estable con periodicidad. Por otra parte, las condiciones de seguridad de la tripulación hacen necesaria la existencia con carácter permanente de una nave espacial acoplada a la Estación en la que los tripulantes puedan escapar y ponerse a salvo en caso de un accidente de extrema gravedad. Esta función la cumplen las naves rusas “Soyuz” (Fig. 3). Estos vehículos espaciales, diseñados en los años 1960s, fueron la segunda generación de cápsulas tripuladas soviéticas después del “Vostok”, la nave espacial histórica de Gagarin. A pesar de su antigüedad, y con ligeros retoques para mejorar su capacidad de comunicación, su control y hacer ligeramente más cómoda la ubicación de los tripulantes, el “Soyuz” sigue siendo uno de los vehículos espaciales más fiables. Su gran limitación es el espacio disponible, ya que no puede albergar más de tres pasajeros, y su capacidad de carga, sobre todo en el retorno a la Tierra, que se limita a unos 15 kg. Para misiones de aprovisionamiento se diseñaron las naves “Progress”, con la misma estructura de las “Soyuz” pero no tripuladas, que pueden transportar hasta unos 6.000 kg, pero no son recuperables.



*Figura 3. El vehículo espacial ruso “Soyuz”. Pueden apreciarse los tres elementos de los que consta: el Módulo Orbital, en la parte delantera, tiene una forma casi esférica, contiene el equipo necesario para la supervivencia de la tripulación y es abandonado en el espacio para su destrucción justo antes de la reentrada en la atmósfera. La Cápsula de la Tripulación, en la parte central, es la única parte del vehículo que regresa a la Tierra, por lo que va equipada con un escudo térmico y dos paracaídas, uno primario y otro de emergencia. Tiene forma de campana y en su interior pueden ir hasta tres tripulantes. Por último, el Módulo de Servicio, el segmento trasero, de tono más claro, con forma cilíndrica, contiene los motores orbitales y los tanques de combustible. Tras frenar la nave para volver a la Tierra, se separa de la cápsula y es destruido en la atmósfera. Foto: NASA.*

La función de las naves “Soyuz” como “bote salvavidas” de la ISS y su vida útil limitada a seis meses imponen la necesidad de una misión espacial en estas naves a la Estación con esta periodicidad temporal. En la rutina de la construcción y mantenimiento de la ISS, las misiones Soyuz se programaron como una vía de reemplazo de tripulaciones y de suministro de materiales complementaria a las misiones del transbordador espacial norteamericano, que asumiría las tareas de mayor magnitud, incluyendo el transporte de todos los módulos de la Estación, que se irían ensamblando sucesivamente. Así pues, en el año 2000 se firmó un acuerdo entre la ESA y la Agencia Espacial Rusa “Rosaviakosmos” (actualmente “Roskosmos”) por el cual un astronauta europeo ocuparía una plaza en una serie de vuelos “Soyuz” destinados a reemplazar a dos miembros de la tripulación de la ISS, permanecería 10 días en la Estación

realizando experimentación científica en el módulo ruso “Zarya” y volvería a la Tierra en la nave reemplazada, junto con los dos tripulantes sustituidos. Por su parte la ESA consiguió de algunos de sus países miembros que financiasen los gastos derivados de estas misiones, a cambio de que el astronauta elegido fuera de su nacionalidad y de prioridad en la selección de los experimentos a realizar. El resultado fue la realización, entre 2001 y 2005, de seis “Misiones Soyuz Europeas”, a saber, “Androméde” (francesa, 2001), “Marco Polo” (italiana, 2002), “Odissea” (belga, 2002), “Cervantes” (española, 2003), “Delta” (holandesa, 2004) y “Eneide” (italiana, 2005). Un hecho decisivo en esta historia fue el trágico accidente del transbordador “Columbia”, en febrero de 2003, que provocó la suspensión del programa de vuelos norteamericano y de la construcción y ensamblaje de la ISS hasta su reanudación en julio de 2005. Durante ese período las misiones “Soyuz” fueron la única vía de interacción con la ISS y la única actividad científica a bordo de la Estación. En junio de 2006 se celebró en Toledo un congreso donde se revisaron y se discutieron los resultados científicos y las experiencias alcanzadas en estas misiones. Las comunicaciones presentadas a este congreso se han publicado en la revista “Microgravity Science and Technology”, y para una visión general más amplia de las Misiones Soyuz Europeas, véase el artículo de Van Loon *et al.* (2007).

En este contexto se desarrolló la “Misión Cervantes” o “Misión Española Soyuz”, en octubre de 2003, la primera después del accidente del “Columbia”, retrasada seis meses en su ejecución por esta causa. En ella participó el astronauta español de la ESA Pedro Duque, que ejecutó un programa científico de 24 experimentos de Biología, Fisiología Humana, Ciencias Físicas, Observación de la Tierra y Tecnología, además de un importante programa de actividades educativas dirigido a divulgar el interés por la investigación espacial y por la Ciencia en general a niños y jóvenes, predominantemente españoles, pertenecientes a diferentes niveles de enseñanza. Entre los experimentos científicos, uno de ellos, denominado “Root”, fue diseñado en nuestro laboratorio con el objetivo de investigar las alteraciones producidas por el ambiente de ausencia de gravedad en la proliferación y el crecimiento de las células meristemáticas de la raíz de plantas de la especie modelo *Arabidopsis thaliana*.

## **EL DISEÑO EXPERIMENTAL, LOS PREPARATIVOS DEL EXPERIMENTO “ROOT” Y SU EJECUCIÓN EN LA ISS**

El investigador que prepara un experimento para ser llevado a cabo en un vehículo espacial, debe ser consciente, ante todo, de que va a encontrarse con una serie de problemas metodológicos y restricciones que no son habituales en el laboratorio terrestre. En primer lugar, el experimento va a tener lugar en un sitio muy reducido, en el que existen multitud de objetos que no pueden colocarse en otro sitio; en segundo lugar, el experimento lo va a manipular un astronauta que ha recibido una preparación intensísima, pero que no está especializado en nuestra disciplina científica ni en nuestros métodos experimentales y, además, dispone de un tiempo muy corto en el marco de una agenda extremadamente apretada. Además, los recursos energéticos de la nave espacial son limitados y deben compartirse con otras necesidades, que pueden llegar a ser vitales y, finalmente (por no ser exhaustivo en exceso) hay que tener muy en cuenta qué productos o reactivos químicos se exponen al ambiente de la nave, porque debe evitarse absolutamente la liberación de sustancias tóxicas volátiles, que podrían poner en riesgo la salud o la vida de la tripulación y serían muy difíciles de eliminar. En conclusión, nuestro experimento debe ser todo lo automático que sea posible y debe llevarse a cabo en un contenedor lo más herméticamente cerrado que pueda permitirse.

La consecución del objetivo del experimento “Root” exigía el envío de semillas al espacio para su germinación en ambiente de microgravedad y el crecimiento de las plántulas durante el tiempo necesario para disponer de meristemas radicales, los tejidos más altamente proliferativos de la raíz. Una vez que las plántulas hubieran crecido, sería necesario preparar las muestras para el análisis cuando todavía estuvieran en la ISS, puesto que la vuelta a la Tierra de las plantas produciría su adaptación inmediata a la gravedad terrestre y la abolición de los efectos producidos por la ausencia de gravedad. Esto significaba la necesidad de fijar las muestras a bordo de la nave espacial, lo que implicaba el uso de alhédidos, es decir, ponía en juego las temidas “sustancias tóxicas volátiles” y, por tanto, exigía el confinamiento del experimento en un recipiente hermético en todo el período de su presencia en la nave Soyuz y en la ISS.

Estos problemas se solventaron aplicando dos estrategias metodológicas e instrumentales que habían probado su eficacia en vuelos espaciales anteriores. La primera de ellas fue el denominado sistema “berlingot-ampolla” desarrollado en el Grupo Científico de Biología y Medicina Espacial de la Universidad “Paul Sabatier”, de Toulouse (Francia) (Tixador *et al.*, 1981) para el almacenamiento de líquidos y su liberación a un recipiente de plástico termosellado. La segunda fue el uso de los dispositivos denominados MAMBA (una sigla en inglés que significa “sistema motorizado de rotura de ampollas”), desarrollados por la empresa holandesa “Dutch Space”, justamente para poder producir la liberación de los líquidos por rotura de las ampollas que los contenían sin necesidad de abrir el recipiente hermético. Todo esto se comprenderá mejor observando la Figura 4. En ella mostramos todo el montaje instrumental en las diferentes fases de su ensamblaje. Las semillas se colocaron adheridas a un papel de filtro y, en la cara opuesta del papel, se dispusieron dos juegos de 12 ampollas de vidrio cada uno (Fig. 4a). El juego de la izquierda contenía medio de cultivo, adecuado para la germinación de las semillas y el crecimiento de las plántulas y el de la derecha contenía una solución de paraformaldehído capaz de producir una buena fijación de los tejidos compatible con una gran variedad de estudios a microscopía óptica y electrónica. Las ampollas eran, en realidad, tubos capilares en cada uno de los cuales se introdujeron 30 µl de líquido en vacío, lo que garantizaba que, al romperse el tubo, el líquido saldría a presión al exterior. El conjunto de semillas y ampollas se introdujo en unas bolsas de plástico de doble pared, que se termosellaron (los denominados “berlingots”) (Fig. 4a).

Los “berlingots” montados se introdujeron en dispositivos “MAMBA”, a razón de dos por dispositivo. La rotura de las ampollas se realizaría por medio de unas barras metálicas o levas, capaces de rotar accionadas por un motor (Fig. 4b, c). El conjunto se introdujo en un contenedor experimental “Biorack” tipo I/E, capaz de ser herméticamente cerrado y dotado de un conector eléctrico para operar el motor giratorio interno (Fig. 4d, e). Para la operación del motor se utilizó una fuente de alimentación construida *ad hoc* (Fig. 4f, g).

Además de las pruebas del funcionamiento del sistema realizadas en nuestro laboratorio, se adiestró a los astronautas (Pedro Duque y su eventual sustituto, el holandés André Kuipers) en sesiones realizadas en la réplica del módulo ruso de la ISS ubicada en la “Ciudad de las Estrellas”, el complejo espacial ruso localizado cerca de Moscú (Fig. 5).

El experimento fue montado y ensamblado en la Universidad “Paul Sabatier” de Toulouse, con la colaboración del Dr. Gilbert Gasset en el rellenado de las ampollas de vidrio y en la preparación de los “berlingots”. Desde Toulouse, el contenedor experimental voló a Moscú vía París y desde allí, en un vuelo fletado por la Agencia Espacial Rusa, hasta Baikonur (Kazajistán) donde se encuentra la base de lanzamiento de naves espaciales rusas, la misma que sirvió durante décadas al programa espacial de la Unión Soviética y a sus hitos históricos como la puesta en órbita del “Vostok” tripulado por Gagarin, el primer ser humano que orbitó la Tierra, en 1961.

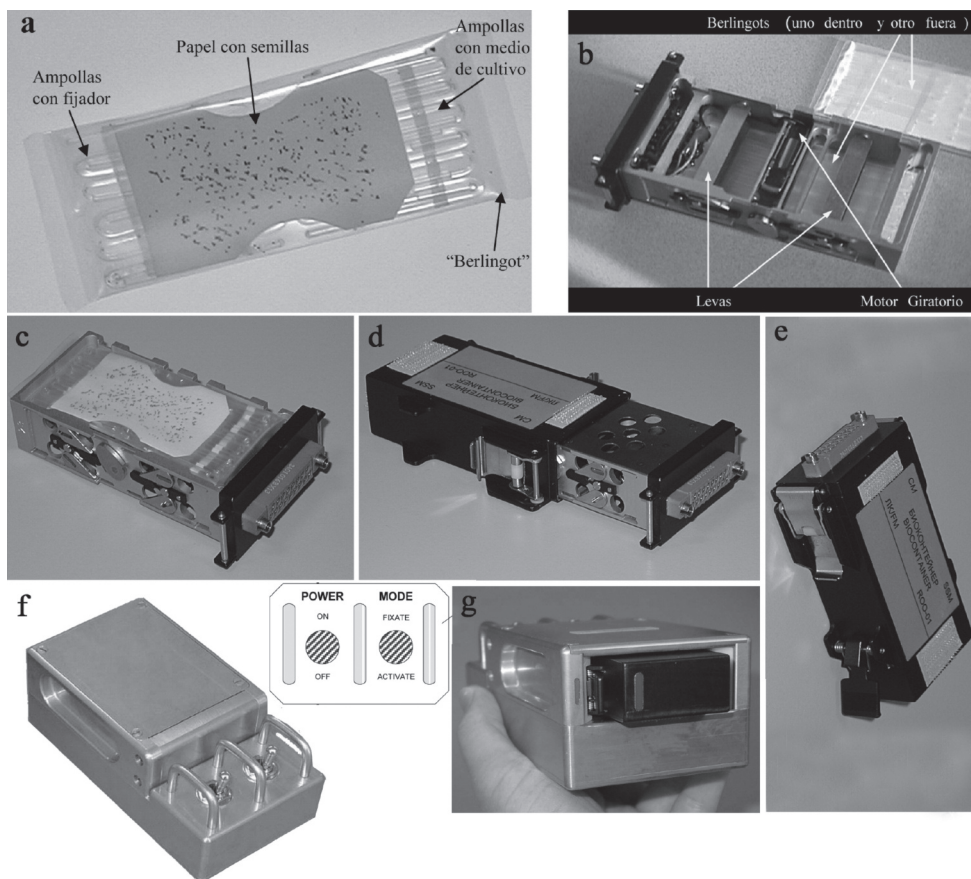


Figura 4. Montaje de las muestras biológicas tal como fueron enviadas al Espacio (a): “Berlingot” conteniendo un papel de filtro con las semillas estériles y, en la otra cara, las ampollas de vidrio con medio de cultivo y fijador. Todo este conjunto se introdujo en un contenedor experimental denominado MAMBA (Motorized Ampoule-Breaker Assembly) (b y c), en concreto dos “Berlingots” por cada contenedor (en b sin montar y en c montados). Para llevar a cabo la activación del experimento, se rompieron las ampollas de medio de cultivo mediante el giro de las levas interiores (se indican con flechas en la imagen b) que activó el motor giratorio. La liberación del fijador con el fin de parar el crecimiento tuvo lugar de la misma manera, con la salvedad de que en cada caso las levas que giraron fueron las de un lado del dispositivo. El ensamblaje de las muestras, las ampollas y el dispositivo eléctrico se introdujo en un contenedor experimental “Biorack” tipo I/E (d) donde el conjunto quedó herméticamente cerrado (e). La operación del motor se hace posible por la conexión del MAMBA a una fuente de alimentación (f), construida específicamente para este experimento. El MAMBA recibe corriente eléctrica a través del conector de color azul, una vez introducido en la fuente de alimentación (g).

En la base de Baikonur tuvo lugar el sábado, día 18 de octubre de 2.003, a las 11:38 horas (hora local), el lanzamiento de la nave “Soyuz TMA 3”, tripulada por el norteamericano Michael Foale, el ruso Alexander Kaleri y el español Pedro Duque, con la que daba comienzo la “Misión Cervantes”. En uno de los escasos huecos libres de la cápsula, sobre las cabezas de los astronautas, se ubicaba el contenedor experimental que contenía nuestro experimento “Root”, junto con otros dos experimentos españoles, diseñados por el Prof. Roberto Marco de la Universidad Autónoma de Madrid, dirigidos a conocer la influencia de la ausencia de gravedad sobre el envejecimiento



Figura 5. a: El autor con Pedro Duque en la sesión de adiestramiento de los astronautas celebrada en la “Ciudad de las Estrellas”, cerca de Moscú. b: La réplica del módulo ruso de la ISS en la que se desarrollaron las sesiones de adiestramiento.

de moscas *Drosophila*, medido por su capacidad de vuelo, y las variaciones en la expresión génica inducidas por la adaptación al ambiente espacial, estudiadas también en *Drosophila*, sobre embriones en la fase pupal del desarrollo.

La “Misión Cervantes” y nuestro experimento “Root” se desarrollaron con toda normalidad según el programa previsto (Fig. 6). Las actividades del experimento fueron seguidas por nosotros en tiempo real desde el Centro Español de Apoyo a las Operaciones de Usuarios de la ISS (E-USOC) ubicado entonces en la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Aeronáuticos, en Madrid. A medida que fuimos recibiendo noticias de la ejecución de las distintas fases de experimento, fuimos realizando simultáneamente un experimento control en nuestro laboratorio, utilizando los mismos dispositivos y las mismas condiciones que el experimento espacial, evidentemente con la excepción de la ausencia de gravedad. La realización de este experimento control era de una importancia crucial, ya que sería la referencia frente a la cual confrontar los datos que se obtuvieran de las muestras crecidas en la ISS.



Figura 6. a: Lanzamiento del cohete “Soyuz” conteniendo la nave “Soyuz TMA 3” con los astronautas de la “Misión Cervantes” a bordo, desde la base de Baikonur, el 18 de octubre de 2.003. Foto: F.J. Medina. b: Pedro Duque y el astronauta norteamericano Michael Foale, en el módulo ruso de la ISS durante la “Misión Cervantes”. Pedro Duque sostiene los contenedores experimentales de uno de los experimentos españoles. Foto: ESA.

El día 28 de octubre, Pedro Duque, junto con Yuri Malenchenko y Edward Lu, que habían tripulado la ISS durante los seis meses anteriores, embarcaron en la nave “Soyuz TMA 2”, que estuvo acoplada a la Estación durante todo ese período, y emprendieron el regreso a la Tierra, dejando arriba a los dos astronautas que acompañaron a Pedro en el viaje de ida y a la nave Soyuz en la que volaron. En el viaje de vuelta embarcaron el contenedor experimental con el material del experimento “Root” dispuesto para ser analizado. El aterrizaje se produjo con total normalidad, en las estepas de Kazajistán, a las 8:40 horas (hora local). Desde allí los astronautas y los materiales experimentales fueron transportados a Moscú, a la Ciudad de las Estrellas, donde tuvo lugar un emotivo recibimiento. El material experimental nos fue entregado en un laboratorio improvisado de este complejo espacial ruso donde, en condiciones algo precarias, procedimos a su apertura y al procesado inicial de las muestras hasta dejarlas en condiciones de ser transportadas a Madrid.

Como se ha mencionado anteriormente, las plántulas fueron fijadas en vuelo, por lo que se nos entregaron en los “berlingots” sellados, impregnadas en la solución de paraformaldehído. En la Ciudad de las Estrellas se abrieron los “berlingots”, se fotografiaron las muestras y se transfirieron a un “buffer” fosfato salino, para eliminar el aldehído, y posteriormente se deshidrataron parcialmente en soluciones progresivamente enriquecidas en etanol hasta el 70%. En esta solución de alcohol de 70° se realizó el transporte a Madrid. Una vez en nuestro laboratorio, se completó la deshidratación y se incluyeron las muestras en una resina acrílica, para posibilitar la realización de cortes observables a microscopía óptica y electrónica y la localización *in situ* de proteínas en las estructuras celulares por métodos inmunocitoquímicos.

## RESULTADOS Y CONCLUSIONES DEL EXPERIMENTO “ROOT”

El primer parámetro estudiado sobre los materiales recuperados del vuelo espacial fue la medida de la longitud de las plántulas, que se realizó sobre imágenes tomadas de las muestras recién recuperadas y se comparó con la del experimento control llevado a cabo en tierra. El resultado, relativamente sorprendente, fue que las plántulas crecidas en el espacio presentaban mayor longitud que las crecidas en tierra (Fig. 7a).

Para indagar en las causas de esta diferente longitud nos fijamos en aquellos tejidos de la planta que sustentan su crecimiento, caracterizados por la mayor capacidad proliferativa de las células. Estos tejidos son los meristemas y, en particular, nos fijamos en el mayor de ellos, el tejido meristemático de la raíz, localizado en su zona terminal. Para su estudio, sobre el material fijado e incluido, realizamos cortes “semifinos”, de 2  $\mu\text{m}$  de grosor, que observamos al microscopio óptico (Fig. 7b). Sobre estos cortes se realizaron medidas de parámetros significativos para evaluar la tasa de proliferación y de crecimiento celular. Teniendo en cuenta la organización de las células meristemáticas en filas en el sentido longitudinal de la raíz, las cuales se producen a partir de divisiones celulares cuyos ejes mitóticos se disponen precisamente en este sentido, medimos en cada fila el número de células por unidad de longitud. Esta medida nos ofrecía, no sólo una estimación de la tasa de proliferación celular, sino también del tamaño celular, entendido éste como la longitud de la célula en la dirección del crecimiento de la raíz. El resultado fue que las muestras crecidas en el espacio presentaban células más cortas que las del control terrestre, es decir, mayor número de células por unidad de longitud en cada fila. La diferencia entre una muestra y otra era muy significativa, del orden del doble de células en la muestra del espacio respecto de la de la tierra. Puesto que no solamente había más células en cada unidad de longitud, sino que, además, la longitud total era mayor, el resultado indicaba que la actividad proliferativa de las células meristemáticas de la raíz aumentaba muy sensiblemente cuando el crecimiento se daba bajo condiciones de microgravedad. Junto a esto, el dato del tamaño menor de las células era

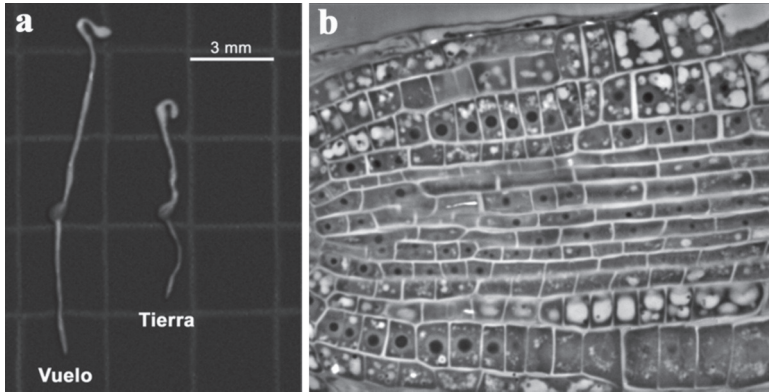


Figura 7. a: Plántulas de *Arabidopsis thaliana* obtenidas de la germinación de semillas y el cultivo durante cuatro días, en oscuridad, a 22°C, en la ISS (izquierda) y en tierra. Se puede apreciar la diferencia de longitud entre las dos muestras. b: Corte “semifino”, de 2 µm de espesor, del extremo de la raíz de una plántula crecida en el espacio, observado en un microscopio óptico dotado de contraste de fase, conteniendo la zona meristemática. Aparentemente el corte es totalmente normal. Se aprecian las células, limitadas por la pared celular y organizadas en filas longitudinales; el disco denso que aparece en muchas células en posición central es el nucleolo.

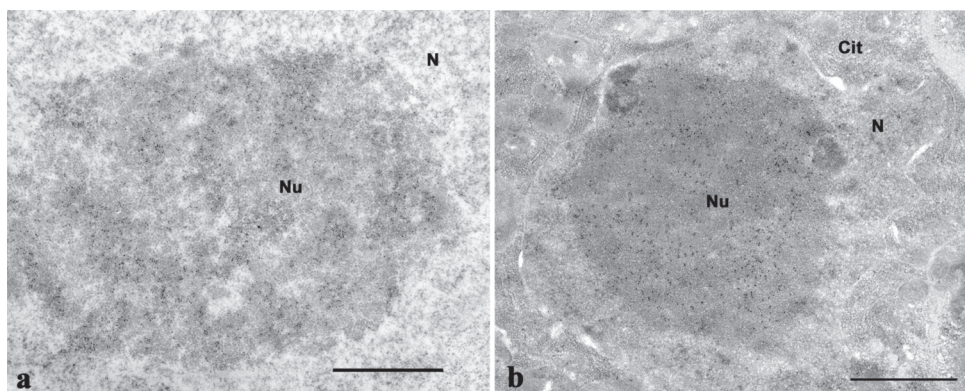
muy interesante y sorprendente puesto que la regla, en condiciones normales de crecimiento, es que proliferación y crecimiento celular son procesos estrechamente asociados, interdependientes y correlacionados, de manera que, cuanto más alta es la capacidad proliferativa de las células, mayor es su crecimiento. Esta regla parecía romperse por efecto de la ausencia de gravedad.

Con objeto de analizar en profundidad las posibles alteraciones en el crecimiento celular centramos nuestro estudio en un orgánulo del núcleo de la célula denominado nucleolo (Fig. 8). Este es un cuerpo esférico muy denso, situado en el centro del núcleo, que resulta de la expresión de los genes que codifican para los RNAs ribosómicos, es decir los RNAs que, junto con proteínas específicas, constituyen la multitud de ribosomas de la célula, pequeños gránulos situados en el citoplasma donde se efectúa la síntesis de proteínas. La producción de ribosomas (las “factorías” de proteínas) en el nucleolo es uno de los procesos funcionales más activos de la célula, al servicio del cual pone en juego más biomasa y más recursos energéticos. El proceso es complejo y comienza con la transcripción del DNA que codifica para los RNAs ribosómicos, es decir, la síntesis de RNA siguiendo la secuencia del DNA. Los genes ribosómicos consisten en la repetición de una secuencia de DNA cientos o incluso miles de veces, dependiendo de la especie. Esa secuencia, por tanto, puede transcribirse simultáneamente en todas o en parte de sus repeticiones, produciendo una enorme cantidad de copias de una molécula de RNA, precursora de las moléculas “maduras” que se localizarán en los ribosomas. El proceso de “maduración”, desde el precursor a los productos finales, es una sucesión de cortes en la molécula inicial, unido al ensamblaje de los RNAs que se van produciendo con las proteínas ribosómicas, hasta que las partículas ya formadas son exportadas al citoplasma para realizar su función. En este proceso intervienen una importante cantidad de proteínas y pequeños RNAs con funciones reguladoras, modulando la velocidad a la que se efectúa el proceso y la correcta sucesión de los procesos bioquímicos. Una mayor información sobre los procesos funcionales que ocurren en el nucleolo puede encontrarse en buenos libros de texto de Biología Celular (Alberts *et al.*, 2002) o en revisiones específicas (Smetana y Busch, 1974; Hadjiolov, 1985; Risueño y Medina, 1986).

En definitiva, el nucleolo es un excelente marcador del crecimiento celular por su indisoluble relación con la síntesis de proteínas, dado que el crecimiento celular esencialmente consiste en el incremento de la dotación proteica de la célula, ya sea con función enzimática, estructural, reguladora, receptora y/o transductora de señales, etc.

Al observar al microscopio óptico y electrónico los nucleolos de las células meristemáticas de la raíz de las plántulas crecidas en el espacio y en la Tierra se observaron diferencias significativas entre ambos tipos de muestras. Estas diferencias afectaban al tamaño del orgánulo, así como a la cantidad y distribución de sus componentes estructurales. El tamaño del nucleolo era mucho menor en las muestras crecidas en condiciones de microgravedad. Este dato, junto con la organización ultraestructural de los subcomponentes nucleolares, indicaba una menor actividad nucleolar y, consiguientemente, una menor producción de ribosomas como consecuencia de la alteración gravitatoria, con las implicaciones sobre el crecimiento celular que acabamos de considerar en los párrafos precedentes (Fig. 8).

La misma conclusión se obtuvo del experimento de inmunolocalización cuantitativa de la proteína nucleolar denominada nucleolina. Esta proteína interviene en la biogénesis de los ribosomas desempeñando papeles clave en la regulación de diferentes etapas del proceso, de manera que la medición de sus niveles en el nucleolo indica cuantitativamente la productividad del nucleolo en la síntesis de ribosomas (Pontvianne et al., 2007). El resultado obtenido fue que, en los nucleolos de muestras crecidas en microgravedad, que eran más pequeños, la nucleolina mostraba niveles más bajos en comparación con los de la muestra control, crecida en la Tierra (Fig. 8).



*Figura 8. Imágenes al microscopio electrónico de nucleolos (Nu) de células meristemáticas de la raíz de plántulas crecidas en condiciones de gravedad terrestre control (a) y en ambiente espacial, en la ISS (b). Las dos imágenes están, aproximadamente, al mismo aumento (en ambos casos, la barra corresponde a la longitud de 1 µm). Las muestras han sido sometidas a incubación con un anticuerpo que reconoce a la proteína nucleolar nucleolina, que interviene activamente en la biogénesis de los ribosomas. La localización del anticuerpo, y por tanto de la proteína, está revelada con partículas de oro coloidal de 10 nm de diámetro, que se observan en las imágenes como diminutos puntos negros localizados preferentemente sobre el nucleolo. Puede observarse que el nucleolo de la muestra control (a) presenta un mayor tamaño, una mayor complejidad estructural interna y una mayor acumulación de partículas de oro, que indican un nivel más alto de la proteína nucleolina, comparado con el nucleolo de la muestra crecida en ambiente de microgravedad (b). Todos estos datos muestran claramente que el nucleolo control es más activo en la producción de ribosomas y, en definitiva, que la ausencia de gravedad induce el retardo del crecimiento celular. N. núcleo. Cit: citoplasma.*



Finalmente, se realizó un análisis de las proteínas totales de la plántula (el denominado “proteoma”) utilizando una técnica llamada electroforesis bidimensional en la que se trituraron las plántulas, se extraen las proteínas y se separan en función de su tamaño (peso molecular) y de su punto isoeléctrico (abundancia de aminoácidos cargados positiva o negativamente). El análisis demostró que existen diferencias en el proteoma según las condiciones de crecimiento, lo que nos lleva a concluir que la ausencia de gravedad altera los patrones de expresión génica.

En definitiva, los resultados obtenidos de nuestro experimento en la ISS demuestran que, en ausencia de gravedad, se produce un enorme incremento de la proliferación celular, pero no del crecimiento celular. Dicho de otra manera, las células crecen menos y se dividen más en ausencia de gravedad que en gravedad control. Esta mayor proliferación no se acompaña de un incremento en la síntesis de ribosomas, como es la regla en la Tierra, sino que los marcadores funcionales de este proceso aparecen disminuidos en ausencia de gravedad. Nuestra interpretación es que el ciclo celular (la sucesión de división y crecimiento celular, que ocurre en las células proliferantes) se ve profundamente alterado en el ambiente espacial y se disocia del crecimiento celular. Proliferación y crecimiento celular son dos procesos que se asocian y se interrelacionan estrechamente en condiciones normales de crecimiento, en la Tierra.

Así pues, la alteración de las condiciones ambientales de gravedad supone un estrés para la planta de gran magnitud, detectable a nivel macroscópico y a nivel celular, frente al que tiene que poner en juego mecanismos de supervivencia para poder completar su ciclo vital y poder perpetuarse. El conocimiento en profundidad de estas alteraciones y de estos mecanismos moleculares y celulares es imprescindible para afrontar el cultivo de plantas en ambiente espacial.

## PERSPECTIVAS DE FUTURO

Recientemente hemos asistido a un hito de enorme trascendencia para la investigación espacial, consistente en el transporte y ensamblaje en la ISS del módulo “Columbus” construido por la Agencia Espacial Europea. La misión del transbordador norteamericano “Atlantis” que tuvo lugar entre el 7 y el 20 de febrero de 2008 puede que no tuviera la repercusión mediática de otras aventuras espaciales, pero representó un salto cualitativo y cuantitativo sin precedentes para la ciencia espacial, porque los laboratorios instalados en el módulo “Columbus”, junto con el “*European Modular Cultivation System*” ya instalado en la ISS y totalmente operativo, van a permitir realizar experimentos en unas condiciones que superan muchas de las restricciones que tenía que afrontar hasta ahora el investigador.

En concreto, la línea de investigación que iniciamos con el experimento “Root” y que proporcionó resultados de gran interés y enormemente prometedores, se beneficiará en gran medida de estas importantísimas mejoras. Los siguientes pasos se centrarán en el análisis en profundidad de las alteraciones del ciclo celular, diseccionando aquéllas etapas y procesos reguladores que aparecen alterados, mediante el uso de marcadores genéticos que nos permitan discriminar la expresión diferencial de genes de interés. Será preciso, además, realizar estudios secuenciales, analizando las alteraciones a lo largo del tiempo. Tendremos que profundizar, además, en el estudio proteómico, estudiando la identidad de las proteínas cuyos niveles muestran diferencias entre las condiciones de microgravedad y los controles, para lo cual será necesaria la utilización de cultivos celulares que, además, permitan la sincronización de las células en su progreso a través del ciclo celular.

Todo ello ya está en marcha. Mientras esperamos la oportunidad de la realización de nuevos experimentos en la ISS, utilizando los nuevos y potentes recursos puestos a nuestra disposición, estamos realizando experimentos en dispositivos de microgravedad simulada ubicados en

laboratorios terrestres, como la “*Random Positioning Machine*” o el Instrumento de Levitación Magnética. Ya estamos obteniendo resultados que nos permiten avanzar en el conocimiento de estos problemas. El trabajo intenso en el laboratorio, la cooperación nacional e internacional y una adecuada financiación permitirán que este camino no se detenga.

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a Fernando González Camacho, Isabel Matía, Ana Isabel Manzano, Antonio Manrique y Mercedes Carnota (CIB-CSIC, Madrid), Roberto Marco (Depto. Bioquímica UAM, Madrid), Gilbert Gasset (GSBMS, Université de Toulouse, Francia), John Z. Kiss (Miami University, Oxford OH, USA), Jack van Loon (Vrije Universiteit, Amsterdam, Holanda), Julio Sáez-Vásquez (CNRS-Université de Perpignan, Francia), Luc van den Bergh (Dutch Space, Leiden, Holanda) y Pedro Duque (Agencia Espacial Europea) por su inestimable colaboración en los trabajos descritos en este artículo. El experimento “Root” de la “Misión Cervantes” fue financiado por el Programa Nacional del Espacio, del “Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo Tecnológico e Innovación” del Gobierno de España (Proyectos con N° Ref. ESP2002-12062-E y ESP2003-09475-C02-02).

## BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Walter, P., y Roberts, K.** (2002) “Molecular Biology of the Cell”. Garland Publishing, New York.
- Boonsirichai, K., Guan, C., Chen, R., y Masson, P.H.** (2002) Root gravitropism: An experimental tool to investigate basic cellular and molecular processes underlying mechanosensing and signal transmission in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**, 421-447.
- Claasen, D.E., y Spooner, B.S.** (1994) Impact of altered gravity on aspects of Cell Biology. *Int. Rev. Cytol.* **156**, 301-373.
- Hadjiolov, A.A.** (1985) The nucleolus and ribosome biogenesis. *Cell Biology Monographs* **12**, 1-268.
- Infanger, M., Kossmehl, P., Shakibaei, M., Bauer, J., Kossmehl-Zorn, S., Cogoli, A., Curcio, F., Oksche, A., Wehland, M., Kreutz, R., et al.** (2006) Simulated weightlessness changes the cytoskeleton and extracellular matrix proteins in papillary thyroid carcinoma cells. *Cell Tissue Res.* **324**, 267-277.
- Kordyum, E.L.** (1997) Biology of plant cells in microgravity and under clinostating. *Int. Rev. Cytol.* **171**, 1-78.
- Marco, R., Benguría, A., Sánchez, J., y De Juan, E.** (1996) Effects of the space environment on *Drosophila melanogaster* development. Implications of the IML-2 experiment. *J. Biotechnol.* **47**, 179-189.
- Moseyko, N., Zhu, T., Chang, H.S., Wang, X., y Feldman, L.J.** (2002) Transcription profiling of the early gravitropic response in *Arabidopsis* using high-density oligonucleotide probe microarrays. *Plant Physiol.* **130**, 720-728.
- Perbal, G.** (2001) The role of gravity in plant development. *En* “A world without gravity” (G. Seibert, ed.), pp 121-136. European Space Agency. Noordwijk

- Pontvianne, F., Matía, I., Douet, J., Tourmente, S., Medina, F.J., Echeverría, M., y Sáez-Vásquez, J.** (2007) Characterization of AtNUC-L1 Reveals a Central Role of Nucleolin in Nucleolus Organization and Silencing of AtNUC-L2 Gene in Arabidopsis. *Mol. Biol. Cell* **18**, 369-379.
- Risueño, M.C., y Medina, F.J.** (1986) "The nucleolar structure in plant cells". Cell Biology Reviews (RBC). vol. 7. University of the Basque Country-Springer International.
- Smetana, K., y Busch, H.** (1974) The nucleolus and nucleolar DNA. En "The Cell Nucleus Vol. 1" (H. Busch, ed.), pp 73-147. Academic Press. New York
- Tixador, R., Raffin, J., Richoilley, G., Kordium, V.A., Kojarinov, V., y Maneko, G.** (1981) Ampoule de verre cassable contenant un liquide sous pression, éjectable en totalité, lors de la cassure de l'ampoule. Brevet B. 148 No. 8007471. *Innov. Tech. Biol. Med.* **2**, 12-14.
- Van Loon, J.W.A., Medina, F.J., Stenuit, H., Istasse, E., Heppener, M., y Marco, R.** (2007) The National-ESA Soyuz missions Andromède, Marco Polo, Odissea, Cervantes, DELTA and Eneide. *Microgravity sci. technol.* **XIX**, 9-32.
- White, R.J., y Averner, M.** (2001) Humans in space. *Nature* **409**, 1115-1118.