



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

“A. AVOGADRO”

Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica

**Corso di Laurea Magistrale in Biologia – Curriculum  
Biomedico e Biomolecolare**

TESI DI LAUREA

“Esposizione di topi C57BLj10 all’ipergravità: analisi di  
parametri vitali e proteomica plasmatica”

Candidata:  
Silvia Bonardo

Relatrice:  
Dott.ssa Maria Angela Masini

Anno accademico 2023/2024



# Sommario

|               |   |           |
|---------------|---|-----------|
| <b>1.</b>     | <b><i>Premessa</i></b> .....                      | <b>3</b>  |
| <b>2.</b>     | <b><i>Introduzione</i></b> .....                  | <b>5</b>  |
| <b>2.1.</b>   | <b>La gravità terrestre</b> .....                 | <b>5</b>  |
| <b>2.2.</b>   | <b>L'ipergravità</b> .....                        | <b>8</b>  |
| <b>2.3.</b>   | <b>Ipergravità e conseguenze biologiche</b> ..... | <b>8</b>  |
| <b>3.</b>     | <b><i>Ratio dello studio e scopo</i></b> .....    | <b>13</b> |
| <b>4.</b>     | <b><i>Materiali e metodi</i></b> .....            | <b>14</b> |
| <b>4.1.</b>   | <b>Topi</b> .....                                 | <b>14</b> |
| <b>4.2.</b>   | <b>The Large Diameter Centrifuge</b> .....        | <b>14</b> |
| <b>4.3.</b>   | <b>The Mice Drawer System Payload</b> .....       | <b>19</b> |
| <b>4.4.</b>   | <b>Vivarium cages</b> .....                       | <b>24</b> |
| <b>4.5.</b>   | <b>Analisi proteomica e statistica</b> .....      | <b>25</b> |
| <b>5.</b>     | <b><i>Flusso di lavoro</i></b> .....              | <b>27</b> |
| <b>6.</b>     | <b><i>Risultati</i></b> .....                     | <b>28</b> |
| <b>6.1.</b>   | <b>Parametri sperimentali</b> .....               | <b>28</b> |
| <b>6.2.</b>   | <b>Benessere animale</b> .....                    | <b>33</b> |
| <b>6.2.1.</b> | <b>Consumo d'acqua</b> .....                      | <b>33</b> |
| <b>6.2.2.</b> | <b>Variazione di peso</b> .....                   | <b>35</b> |
| <b>6.3.</b>   | <b>Variazioni dell'assetto proteico</b> .....     | <b>38</b> |
| <b>6.3.1.</b> | <b>Confronto tra Training Cage e 3G</b> .....     | <b>38</b> |
| <b>7.</b>     | <b><i>Discussione e conclusioni</i></b> .....     | <b>41</b> |
| <b>7.1.</b>   | <b>Comportamento animale</b> .....                | <b>41</b> |
| <b>7.2.</b>   | <b>Proteomica plasmatica</b> .....                | <b>42</b> |
| <b>8.</b>     | <b><i>Bibliografia e sitografia</i></b> .....     | <b>50</b> |



## 1. Premessa

Già dalla preistoria le popolazioni primitive del Nord Europa e del vicino Oriente erano affascinate da tutto ciò che era legato al cielo: le stelle, il tempo atmosferico, i fenomeni celesti, sia per motivi di carattere pratico, sia per ragioni connesse alle credenze religiose. I naviganti si orientavano per mare osservando le stelle, gli agricoltori le usavano per decidere il periodo in cui seminare, alcune popolazioni le utilizzavano per prevedere le eclissi. Molti siti di carattere religioso vennero costruiti prendendo come riferimento il sole, come il monumento di Newgrange in Irlanda risalente al 3200 a.C. circa, il cui ingresso è allineato con il sorgere del sole al solstizio d'inverno. Si ritiene che, a partire dai due solstizi, si fosse creato un calendario di sedici mesi usato in Gran Bretagna dall'età del bronzo e sopravvissuto fino al medioevo. Diversi santuari vennero costruiti per consentire l'osservazione delle costellazioni, considerate come divinità per gli Egizi. Gli archeologi in tempi più recenti poterono affermare che lo stesso monumento di Stonehenge venne costruito sulla base di diversi allineamenti astronomici per consentire di registrare il calendario solare, studiare i cicli lunari e prevedere eclissi [1]. Molti dubbi vennero sollevati in seguito sulla reale correlazione della disposizione di molte opere con i fenomeni celesti, ma quello che è sicuro è che il cielo ha da sempre guidato la curiosità dell'uomo. Agli inizi l'astronomia coincideva con l'astrologia rappresentando allo stesso tempo uno strumento di conoscenza e potere; solo dopo l'avvento del metodo scientifico si è giunti a una separazione disciplinare netta tra astronomia e astrologia [2]. Diversi strumenti vennero inventati dagli scienziati dell'epoca per l'osservazione della volta celeste, a partire dall'astrolabio creato dagli antichi Greci fino all'invenzione del primo telescopio nel 1609 da Galileo Galilei grazie al quale ipotizzò la teoria del sistema eliocentrico. L'astronomia moderna ebbe inizio a partire dal 1500 con gli studi di Niccolò Copernico, seguiti da quelli di Keplero e Galileo Galilei, per giungere all'astronomia descritta con leggi matematiche da Isaac Newton con la definizione della Legge di gravitazione universale.

Durante gli anni 20 del XX secolo nacque l'aeronautica, la disciplina che si occupa di studiare la navigazione al di fuori dell'atmosfera terrestre mediante veicoli spaziali, con o senza equipaggio. Il missile tedesco V-2 nel 20 giugno 1944 fu in assoluto il primo a compiere un volo suborbitale di prova. Nell'ottobre del 1957 venne inviato dall'Unione Sovietica il primo satellite artificiale in orbita bassa attorno alla Terra, lo Sputnik 1. Negli anni successivi la corsa allo spazio si fece sempre più attraente e culminò nel luglio 1969 con lo sbarco sulla Luna dei primi esseri umani, Neil Armstrong e Buzz Aldrin, durante la missione Apollo 11 [3].

In seguito, l'attività spaziale con equipaggio si concentrò esclusivamente sulle missioni in orbita terrestre e sulle stazioni spaziali, portando alla costruzione della Stazione spaziale internazionale (nota con l'acronimo SSI) agli inizi del XXI secolo, il primo progetto congiunto di cinque agenzie spaziali (la statunitense NASA, la russa RKA, l'europea ESA, la giapponese JAXA e la canadese CSA-ASC) dedicata principalmente alla ricerca scientifica [4]. Nello stesso periodo, tuttavia, numerose sonde automatiche sono state inviate in tutti gli angoli del Sistema Solare, permettendo

l'esplorazione di tutti i pianeti e anche di altri corpi celesti come asteroidi e comete.

Attualmente gli scopi delle missioni robotiche nello spazio sono di carattere scientifico e riguardano prevalentemente gli ambiti dell'astrofisica, dell'astronomia, l'osservazione della Terra e il monitoraggio delle risorse del pianeta, la geofisica e geodesia, il controllo del territorio, la navigazione assistita, lo studio del sistema Solare e le comunicazioni [5].

L'astronautica si avvale principalmente del lavoro del personale presso l'ISS in orbita attorno alla Terra, consentendo la conduzione di studi che spaziano dal campo medico alla scienza dei materiali, della propulsione, del comportamento ed altri ancora. L'uomo, di conseguenza, si trova sottoposto a condizioni ambientali molto diverse da quelle della terraferma, a partire dalla presenza delle radiazioni extraterrestri e dalla variazione dell'accelerazione di gravità che risulta aumentata (ipergravità) nelle brevi fasi di lancio e di atterraggio delle navicelle, mentre è diminuita durante la permanenza in orbita (microgravità), condizioni che hanno dimostrato essere entrambe d'impatto sulla salute degli astronauti.

Dal momento che la microgravità grava sull'uomo per l'intera durata della permanenza nello spazio, sono stati condotti numerosi studi su modelli animali al fine di valutarne le conseguenze fisiologiche; al contrario le ricerche scientifiche in ipergravità sono da ampliare per consentire una più completa comprensione dello sviluppo umano al fine di prevenire e curare l'insorgere di malattie connesse all'invecchiamento della popolazione e alla sedentarietà sulla Terra [6].

Il presente lavoro è finalizzato a comprendere meglio quali siano le variazioni biologiche indotte dall'ipergravità nella ricerca e sviluppo di futuri trattamenti per determinate patologie.

## 2. Introduzione

### 2.1. La gravità terrestre

Fino al XVII secolo la tendenza di ogni oggetto di cadere verso terra venne considerata come una proprietà intrinseca di tutti i corpi e per questo inizialmente non vennero studiati molti approfondimenti.

A partire dal II secolo d.C. alcuni studiosi incominciarono a dare spiegazioni ai fenomeni celesti. Tra questi ricordiamo Tolomeo (ideatore della Teoria Geocentrica), Copernico (individuazione del Sole come centro del sistema solare), Brahe (esecutore di accurate misure sul moto dei pianeti) e Keplero (definì le omonime tre leggi sul moto dei pianeti). Fu Isaac Newton nel 1665 a definire le leggi generali del moto dei sistemi meccanici e in particolare la legge della forza che descrive il moto degli oggetti sulla Terra e quello dei pianeti, ovvero la **Legge di gravitazione universale**, la quale afferma che *tra due particelle di massa  $m_1$  e  $m_2$  separate da una distanza  $r$ , si esercita una forza attrattiva che agisce lungo la congiungente le due particelle con modulo:*

$$F = G \frac{m_1 m_2}{r^2}$$

dove  $G$  è una costante universale ottenuta sperimentalmente ed ha un valore pari a  $6,673 \cdot 10^{-11} \text{ Nm}^2/\text{kg}^2$ .

Per un oggetto di massa  $m$  la sua forza di gravità diretta verso la terra é:

$$F = m g \text{ (seconda legge di Newton)}$$

dove, considerando la Legge di gravitazione di Newton, l'**accelerazione di gravità**  $g$  diminuisce all'allontanarsi dalla crosta terrestre come da tabella seguente senza mai annullarsi. Va specificato che questi valori sono stati calcolati alla latitudine di  $45^\circ$ .

| Altezza, m | $g, \text{ m/s}^2$ |
|------------|--------------------|
| 0          | 9,806              |
| 1.000      | 9,803              |
| 4.000      | 9,794              |
| 8.000      | 9,782              |
| 16.000     | 9,757              |
| 32.000     | 9,71               |
| 100.000    | 9,60               |

|                            |         |
|----------------------------|---------|
| 500.000                    | 8,53    |
| 1.000.000 <sup>(1)</sup>   | 7,41    |
| 380.000.000 <sup>(2)</sup> | 0,00271 |

<sup>(1)</sup> Tipica quota dell'orbita di un satellite.

<sup>(2)</sup> Raggio dell'orbita lunare.

Per completezza si vuole sottolineare che il valore di  $g$  varia anche per effetto della latitudine a livello del mare come da tabella successiva [7].

| Latitudine, gradi | $g, \text{m/s}^2$ |
|-------------------|-------------------|
| 0                 | 9,78039           |
| 10                | 9,78195           |
| 20                | 9,78641           |
| 30                | 9,79329           |
| 40                | 9,80171           |
| 50                | 9,81071           |
| 60                | 9,81918           |
| 70                | 9,82608           |
| 80                | 9,83059           |
| 90                | 9,83217           |

La forza di gravità rappresenta l'attrazione che si esercita tra due corpi ed è direttamente proporzionale alla massa del corpo stesso: risulta evidente che qualunque particella esercita una forza attrattiva nei confronti del nostro pianeta, che risulta, tuttavia, trascurabile in considerazione dell'enorme massa terrestre.

In quanto grandezza vettoriale, la forza esercitata su di un corpo è caratterizzata da modulo, direzione e verso: il *modulo* è inversamente proporzionale alla distanza dal centro della terra (che influenza parimenti la grandezza  $g$  come da tabelle precedenti), la *direzione* è rappresentata dalla congiungente tra il corpo in esame e il centro della Terra ed infine il *verso* che risulta orientato al centro della Terra. L'intensità diminuisce all'allontanarsi dal centro della Terra: a livello del mare la forza di gravità è più intensa ai poli e si riduce (anche se di poco) spostandosi verso l'equatore, questo perchè il raggio equatoriale è maggiore del raggio polare. Inoltre, l'intensità dell'attrazione continua a diminuire leggermente man mano che ci allontaniamo dalla superficie terrestre, per cui sarà diversa se ci si trova in montagna (sull'Everest l'attrazione gravitazionale è il 99,7% di quella a livello del mare) o nello Spazio.



Indipendentemente dall'intensità, la forza di gravità è sempre diretta verso il centro di massa del corpo, che nel caso del nostro pianeta è rappresentato dal centro della Terra. La direzione della forza di gravità corrisponde in questo caso alla verticale del luogo e può essere determinata con un filo a piombo.

Le conseguenze della presenza della forza di gravità sulla Terra sono principalmente due:

- Tutti i corpi hanno un peso;
- Tutti i corpi se lasciati liberi, cadono in verticale (direzione della forza di gravità) e subiscono la stessa accelerazione ( $g$ ).

Questo significa che due corpi in caduta libera verso il suolo subiscono la stessa accelerazione di gravità anche se hanno diverse masse [8].

A 400 km di altezza, dove orbita la Stazione Spaziale Internazionale, questa forza è circa il 90% di quella sulla Terra. Effettivamente, la SSI con gli astronauti al suo interno, tendono a cadere entrambi alla stessa velocità verso il centro della Terra, risultando fermi l'uno rispetto all'altro. Di conseguenza sembrano galleggiare a causa di una apparente assenza di peso.

La stazione, tuttavia, non viene attratta verso la Terra perché si trova in movimento ad altissima velocità, il che le consente di rimanere lungo l'orbita terrestre con un moto che può essere approssimato a circolare uniforme. L'alta velocità viene stabilita in modo da creare una forza centripeta che eguagli la forza di gravità, per cui, dalla legge di gravitazione universale:

$$F = G \frac{m_1 m_2}{r^2}$$

dove:

$m_1$  = massa della stazione

$m_2$  = massa della Terra

$r$  = distanza dal centro della Terra

e dall'espressione della **forza centripeta**:

$$F_c = m_1 \frac{v^2}{r}$$

dove:

$v$  = velocità della stazione.

Diventa immediato calcolare la velocità con cui la Stazione si sposta lungo l'orbita terrestre, che è pari a 7,67 km/s ovvero circa 28.000 km/h completando 15,5 orbite al giorno. Si tratta di una velocità molto sostenuta necessaria alla genesi di una forza sufficientemente grande da accelerare il veicolo spaziale in modo da mantenerlo ad una altezza compresa tra 330 e 410 km evitando che venga attratto sulla Terra.

## 2.2. L'ipergravità

Come descritto nel paragrafo precedente, il valore di  $g$  varia con l'aumentare della distanza dalla crosta terrestre. La Stazione Spaziale Internazionale si trova a circa 400 km di altezza, dove l'accelerazione di gravità equivale a  $8,7 \text{ m/s}^2$ , valore inferiore a quello della gravità terrestre e per questo definito *microgravità*, il cui effetto più immediato è la riduzione del peso dei soggetti che si trovano sotto tale condizione.

Per raggiungere la SSI e al ritorno sulla Terra, gli astronauti sono al contrario sottoposti a una accelerazione di gravità superiore a quella terrestre, chiamata *ipergravità*.

Considerando che condizioni di microgravità prolungate hanno dimostrato avere impatto sulla salute degli astronauti durante la loro permanenza in orbita e al ritorno sulla terraferma, è altresì pensabile che anche l'ipergravità ne abbia, motivo per quale sono stati sviluppati dei sistemi per ricreare sia la microgravità sia l'ipergravità sulla Terra con il fine di condurre studi più approfonditi sugli effetti biologici indotti dalla variazione del vettore gravità. È possibile ridurre gli effetti dell'attrazione gravitazionale mediante l'uso del clinostato, un dispositivo che per mezzo della rotazione lungo il suo asse o in tutte le direzioni (clinostato 3D o a due assi), media l'effetto dell'assenza di peso.

Al contrario è possibile aumentare artificialmente l'accelerazione di gravità utilizzando le centrifughe di largo diametro, di cui la più rappresentativa è quella situata presso il Centro Europeo di Ricerca e Tecnologia Spaziale (ESTEC) dell'Agenzia Spaziale Europea (ESA) a Noordwijk, nei Paesi Bassi (approfondimento al paragrafo 4.2).

## 2.3. Ipergravità e conseguenze biologiche

Tutti gli esseri viventi sulla Terra si sono evoluti per adattamento alla gravità terrestre. Ne consegue che condizioni prolungate di ipogravità o di ipergravità inducano delle modificazioni biologiche che sono state direttamente osservate negli astronauti al ritorno dai loro viaggi, con conseguenti possibili rischi per la loro salute sia nello spazio sia al ritorno sulla terraferma.

Di seguito si è voluta riportare una breve analisi di quelli che sono i tessuti e gli organi principalmente coinvolti nelle alterazioni indotte dall'aumento del vettore gravità.

Sui topi, ipergravità e microgravità hanno dimostrato avere effetti opposti sulla variazione della **densità ossea** e sulla **massa muscolare**, in particolare la massa di entrambi i tessuti è risultata aumentata quando i soggetti sono sottoposti ad una accelerazione di gravità superiore a quella terrestre (2g), avvalorata da un'aumentata espressione di geni correlati al processo di ossificazione (*Bone Morphogenetic Protein-2 (Bmp2)*, *Osterix (Osx)* e di miogenesi (*Myogenic differentiation 1 (MyoD)* e *Myosin heavy chain 1 (Myh1)*) [9].

L'interesse è rivolto principalmente al sistema muscolo-scheletrico degli arti, dimostrando un

incremento di densità ossea di omero, femore e tibia e di massa muscolare di soleo, tibiale anteriore e gastrocnemio. Come conseguenza, un'esposizione prolungata all'ipergravità induce una variazione della composizione corporea a favore di un aumento di massa magra e diminuzione di massa grassa, con una diminuzione complessiva del peso corporeo [9]. Nel soleo è stata dimostrata anche una deposizione di fibre di dimensioni maggiori e di fibre di tipo I in sostituzione a quelle di tipo II [10]. Al contrario condizione di microgravità ha indotto una considerevole perdita di massa ossea e muscolare [9]. Effetti simili sono stati riscontrati anche su cardiomiociti HL-1: l'ipergravità ha indotto rimodellamento cardiaco in conseguenza all'aumento di calcio citosolico, che a sua volta porta all'attivazione della segnalazione della proteina chinasi II dipendente dalla calmodulina/istone deacetilasi 4 (*CaMKII/HDAC4*) e alla sovraregolazione dei geni fetali ANP e BNP. Inoltre, la proliferazione e le dimensioni dei cardiomiociti sono aumentati in condizioni di ipergravità. Risultati opposti sono stati ottenuti sottoponendo le stesse cellule a microgravità [11].

In topi sottoposti a centrifugazione è stata inoltre riscontrata un aumento della frequenza cardiaca per un aumento dell'attività del tono del simpatico con conseguente aumento dei livelli di catecolamine riscontrati a livello urinario [12]. Questo risultato è in linea con le conclusioni ricavate dallo studio sopra citato riguardo l'aumento delle dimensioni del miocardio. Inoltre le catecolamine sono responsabili dell'induzione di stati stress, condizioni più frequenti in topi soggetti a centrifugazione.

L'ipergravità è stata testata come possibile contromisura per il trattamento di topi affetti da osteoartrite, dimostrando una diminuzione di espressione genica locale di  $TNF\alpha$  e dell'attività osteoclastica con conseguente aumento di osso trabecolare e diminuzione della deposizione di gocce lipidiche. Si riscontrano quindi effetti positivi simili a quelli indotti dagli esercizi di resistenza per la tipologia dell'osso trabecolare e del muscolo scheletrico, ma effetti negativi per l'osso corticale [10]. Gli stimoli meccanici indotti dall'ipergravità modulano il rimodellamento e il riassorbimento osseo anche attraverso aumentati livelli di *Osteopontin (OPN)* negli osteoblasti facilitando l'assemblaggio dell'adesione focale, rafforzando i fasci di actina e aumentando l'espressione di *Runx2*<sup>1</sup> [13].

Un altro studio ha evidenziato come gli effetti sul compartimento scheletrico dipendano dal livello di ipergravità. Effetti positivi sono stati riscontrati a 2g sul femore e sulla vertebra L2 di topi di 7 settimane: aumento del volume e dello spessore trabecolare, miglioramento della microarchitettura, diminuzione della superficie osteoclastica e aumento di quella mineralizzata supportato da un'aumento di espressione di *Dentin Matrix Acidic Phosphoprotein 1 (DMP1)* e diminuzione di *Sclerostin*.(Sost). Inoltre, nella metafisi del femore distale risultano aumentati il numero e il volume dei vasi sanguigni. Condizioni di ipergravità a 3g invece hanno causato conseguenze deleterie sullo sviluppo scheletrico dei topi: diminuzione di massa corporea e rallentamento della crescita ossea, assottigliamento dell'osso e aumento della superficie osteoclastica [14].

---

<sup>1</sup> Fattore di trascrizione cruciale nella differenziazione degli osteoblasti.

Il livello di gravità ha dimostrato influire anche sull'induzione degli **stati di stress** e sulla **disregolazione immunitaria**. Il comportamento di ansia e aumentati livelli di corticosterone in topi sottoposti a centrifugazione a 3g per 21 giorni sono stati responsabili di una diminuzione del peso corporeo, situazione non riscontrata a 2g; inoltre è stata rilevata una più marcata alterata risposta linfocitaria al LPS e una diminuita produzione di chemochine pro-infiammatorie (MCP-1 e IP-10) e citochine Th1 (IFN $\gamma$  e IL2) in topi sottoposti a 3g. Le citochine prodotte dai linfociti Th2 (IL4 e IL5) non hanno dimostrato una significativa variazione, mentre la citochina immunosoppressiva IL10 è risultata leggermente aumentata nei topi 3g. Infine, nei topi a 2g rispetto ai controlli, la concentrazione sierica di IgG e IgA è aumentata, mentre le IgM sono rimaste invariate. Nessuna differenza di tali isotipi è stata osservata nel gruppo 3g. [15].

Anche i **parametri ematologici** e la **funzione linfocitaria** risultano coinvolti nel processo di adattamento all'ipergravità: entro il 21° giorno di centrifugazione a 2g e a 3g sono risultati ridotti la conta degli eritrociti, l'ematocrito (Hct), l'emoglobina (Hb), la concentrazione media corpuscolare di emoglobina (MCHC) e il volume corpuscolare medio di emoglobina (MCV). Al contrario è stato riscontrato un picco precoce e transitorio nella conta dei trombociti nel gruppo 3G. La durata della centrifugazione (e non il livello di gravità) hanno indotto delle fluttuazioni al di sopra e al di sotto del normale nella blastogenesi spontanea delle cellule del sangue e della milza. Gli splenociti sono risultati essere meno attivi in risposta a LPS e fitoemoagglutinina e la loro produzione di citochine è stata principalmente influenzata durante la prima settimana di centrifugazione: IL-2, IL-4 e TNF $\alpha$  sono aumentati, mentre IFN $\gamma$  è diminuito [16].

Il conteggio dei **globuli bianchi**, il numero di **linfociti** nel sangue periferico e il numero di linfociti nella milza e nel timo si è ridotto in seguito all'esposizione a 1,6g in confronto a topi di controllo a 1g, mentre non sono state registrate variazioni significative nel numero di monociti e neutrofili, ad eccezione di un aumento temporaneo del numero di quest'ultimi che ha raggiunto il picco il settimo giorno. Anche i topi di controllo hanno subito una iniziale riduzione del conteggio delle cellule del sangue che però è stata ristabilita poco dopo l'inizio dello studio, a differenza del gruppo sottoposto a ipergravità in cui la soppressione funzionale del midollo osseo è persistita anche al termine dello studio [17]. La diminuzione dei globuli bianchi circolanti indotta dall'ipergravità è correlata anche alla riduzione delle cellule infiammatorie e dei linfociti nel parenchima polmonare di modelli murini con **asma allergico e rinite** attraverso la regolazione dei geni coinvolti nelle vie antiossidanti e proapoptotiche, suggerendo un possibile impiego di macchinari che simulano condizioni di ipergravità per il trattamento di disturbi respiratori allergici [18].

Le **cellule timiche** murine CD4+CD8+ (DP) e le cellule epiteliali timiche medullari mature (mTEC) si sono ridotte in seguito a centrifugazione a 2g per 3 giorni, mentre sono aumentate le cellule epiteliali timiche positive K5+K8+ che rappresentano i progenitori TEC. Mentre la riduzione di DP è stata recuperata da un'esposizione di 14 giorni al 2g, la riduzione degli mTEC maturi e l'incremento di K5+K8+ TEC hanno persistito, effetti che sono stati inibiti in topi con lesione vestibolare

dell'orecchio interno. L'espressione genica di Aire e RANK che sono critici per la funzione e lo sviluppo di mTEC è stata inizialmente up-regolata dall'esposizione di 3 giorni e successivamente down-regolata dall'esposizione di 14 giorni al 2G. A differenza del numero di cellule timiche, questo cambiamento dinamico nell'espressione del gene mTEC è risultato in modo inaspettato indipendente dall'apparato vestibolare [19].

Il **sistema vestibolare** è stato dimostrato essere coinvolto anche nella variazione di espressione genica dell'apparato muscolo scheletrico sottoponendo dei topi con lesioni vestibolari a ipergravità 2g, suggerendo che un carico di 2g per 2 settimane migliora la differenziazione degli osteoblasti in parte attraverso il sistema che regola l'equilibrio e il coordinamento dei movimenti contribuendo all'orientamento spaziale [20]. Le lesioni vestibolari invece hanno attenuato gli aumenti delle masse muscolari e ossee indotti dall'ipergravità [21].

Uno studio differente ha indagato il ruolo del sistema vestibolare in topi sottoposti a ipergravità nella regolazione dell'espressione genica dei neuropeptidi ipotalamici legati al **comportamento dell'alimentazione**, rivelando che lesioni vestibolari (VL) inducono un miglioramento delle condizioni di ipofagia transitoria indotta da ipergravità. Dopo 2 settimane di esposizione all'ipergravità, topi VL hanno dimostrato una minore produzione di ormoni anoressigeni (soprattutto CRH e POMC) in confronto a topi Sham<sup>2</sup> operati. Dopo 8 settimane, i livelli dei neuropeptidi ipotalamici correlati all'alimentazione erano comparabili tra topi Sham e topi VL [22].

Le conseguenze del vettore gravitazionale sono state indagate anche sul **testicolo** di topo, tessuto molto sensibile alle alterazioni ambientali e variazioni fisiologiche. Lo stress provocato dall'ipergravità ha indotto una riduzione dell'espressione dei recettori degli androgeni e dei recettori dell'ormone stimolante delle cellule interstiziali, un'alterazione morfologica dell'architettura dei tubuli seminiferi dei testicoli, nonché un'espressione alterata dei fattori coinvolti nei complessi giunzionali delle cellule di Sertoli, risultati che suggeriscono un deterioramento delle normali funzioni fisiologiche come la riduzione del numero degli spermatozoi e della risposta endocrina [23]. Altri studi hanno evidenziato una ridotta motilità degli spermatozoi in conseguenza ad alterazioni strutturali del citoscheletro principalmente a carico della proteina tubulina. Ne deriva pertanto una progressiva riduzione di fertilità dell'animale [24]. Questi risultati sono supportati da un ulteriore studio in cui sono stati messi a confronto dei campioni di sperma di topo sottoposti a microgravità e a ipergravità. Ciò che è emerso è che le condizioni di ipergravità hanno portato a cambiamenti più significativi rispetto alle condizioni di microgravità simulate: dopo 1 ora gli spermatozoi hanno ridotto la velocità del movimento e dopo 3 ore è diminuito anche il numero di cellule in grado di muoversi. Gli spermatozoi sottoposti a microgravità non hanno dimostrato una variazione della velocità di movimento, ma gli spermatozoi mobili sono diminuiti dopo 6 ore di esposizione. Questi cambiamenti sono probabilmente riconducibili a un cambiamento strutturale dei microtubuli, principali responsabili della genesi del movimento [25].

---

<sup>2</sup> In ambito medico, un trattamento Sham è un trattamento fasullo, idealmente identico al trattamento convenzionale ma che omette la procedura necessaria alla risposta biologica.

Gli effetti della centrifugazione sono stati riscontrati anche a livello della **barriera ematoencefalica** (BBB), interfaccia cruciale tra il SNC e il sistema vascolare. L'immunoistochimica ha rivelato il passaggio delle IgG dal sangue all'ippocampo dei topi centrifugati a 2g per 1 o 50 giorni, mentre brevi esposizioni a una maggiore gravità (5g) che imitano i profili di atterraggio e decollo del volo spaziale non hanno avuto effetti. Questi risultati suggeriscono che la centrifugazione prolungata per tempi maggiori di 24 ore a 2g ha indotto una perdita di BBB [26] [27]. Analogamente le vibrazioni prolungate a cui sono sottoposti i topi a 2g per un periodo di oltre un mese ha provocato lo stravasamento delle IgG nel parenchima ippocampale, mentre un progressivo aumento delle stesse da 0,5g a 2g per il medesimo lasso di tempo non è stato in grado di influenzare il passaggio delle IgG attraverso la BBB. Nel complesso, questi risultati suggeriscono che la permeabilità della BBB è sensibile alle accelerazioni esterne prolungate, ma che non risulta alterata se i protocolli di sperimentali prevedono un'esposizione progressivamente crescente alla centrifugazione [26].

Gli studi in merito all'ipergravità sono andati aumentando a partire dagli anni 2000 anche grazie all'avanzamento tecnologico. Alla luce di ciò, appare chiaro come un aumento dell'accelerazione di gravità induca notevoli cambiamenti fisiologici finalizzati all'adattamento alle nuove condizioni ambientali. Inoltre, le conseguenze dell'ipergravità sono tanto più evidenti quanto maggiori sono la durata dell'esposizione, consentendo di distinguere cambiamenti cronici da quelli acuti, la massa corporea, determinando il cosiddetto *effetto del ridimensionamento*, la velocità di rotazione e il livello di gravità risultante [12].

La Biologia Spaziale non solo cerca di aiutare ad acquisire nuove conoscenze sulla funzionalità dell'essere vivente e sulla nostra capacità di vivere e lavorare nello Spazio, ma esplora anche questioni fondamentali sul ruolo della gravità nel processo di formazione, evoluzione, sviluppo e invecchiamento della vita sulla Terra. La Biologia Spaziale ha dunque l'obiettivo di utilizzare questo ambiente quale strumento per la comprensione dell'influenza della gravità nei processi biologici fondamentali focalizzando l'attenzione non solo su piccoli modelli animali, ma anche su cellule, su piccoli organismi e vegetali.

La Medicina Spaziale guarda invece all'uomo, alle modificazioni fisiologiche che si riscontrano nel volo spaziale e allo sviluppo di possibili mezzi atti a contrastarle [28].

### 3. Ratio dello studio e scopo

Molti studi sono stati condotti in condizioni di microgravità, essendo note le numerose alterazioni indotte dall'assenza di gravità che colpiscono gli astronauti durante il volo nello spazio. Gli organi principalmente coinvolti sono il cuore, le ossa, i muscoli, i polmoni, il cervello, il sistema sensoriale e dell'equilibrio, il sistema immunitario e il ritmo sonno veglia. [29] Al contrario è quindi auspicabile che condizioni di ipergravità possano indurre altrettante variazioni biologiche come conseguenza dell'alterazione della produzione di macromolecole come proteine e lipidi che influiscono sui pathway intracellulari. Questi cambiamenti, seppur meno noti, potrebbero portare alla scoperta di marcatori di infiammazione e degenerazione utili per prevenire e curare disturbi che accomunano gli astronauti al ritorno dallo spazio è la popolazione terrestre a causa dell'invecchiamento.

Questo progetto nasce dalla collaborazione tra i laboratori interni del Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica (DISIT) dell'Università del Piemonte Orientale, sede di Alessandria, il CBA di Genova, l'Università di Verona e il Centro Medico e Universitario di Leiden (LUMC) situato nei Paesi Bassi nell'ambito di un progetto ASI-ESA. L'obiettivo di questa tesi è quello di evidenziare gli effetti indotti della variazione del modulo del vettore gravità confrontando le risposte fisiologiche, in termini di variazioni dell'assetto proteomico, di 11 topi presenti all'interno di specifiche gabbie automatizzate denominate *Mice Drawer System (MDS)* che sono state inserite all'interno della *Large Diameter Centrifuge (LDC)* situata presso l'ESTEC (European Space Research and Technology Center) per l'induzione di un campo gravitazionale superiore a quello terrestre (3g) per il periodo di tempo compreso tra il 9 febbraio 2023 e l'8 marzo 2023, in confronto a un gruppo di controllo di 12 topi introdotti in MDS e a un gruppo di 12 topi inseriti in gabbie metaboliche Vivarium, entrambi situati presso LUMC.

Il comportamento dei topi in MDS è stato monitorato per osservazione diretta da parte del personale del LUMC e tramite valutazione delle riprese video interne alle MDS nella LDC. Inoltre, sono stati valutati il consumo di acqua, i valori di temperatura e di umidità dell'ambiente circostante sia presso le MDS-LDC sia nelle MDS di controllo. Un ulteriore parametro preso in considerazione riguarda le variazioni di peso dei topi a 3g in confronto a quelli sottoposti alla forza di gravità terrestre.

L'analisi proteomica è stata effettuata con approccio *label free quantification* con spettrometria di massa tandem accoppiata a un sistema Ultimate 3000 nano-UHPLC, seguita da *functional enrichment analysis* con ClueGO e analisi della rete di interazione proteina-proteina tramite la piattaforma STRING.

## 4. Materiali e metodi

Di seguito vengono descritti i materiali e i metodi di analisi impiegati per la valutazione dei parametri vitali e per lo studio della componente proteica plasmatica dei topi sottoposti a ipergravità per mezzo della LDC.

### 4.1. Topi

Questo esperimento fa parte di uno studio registrato presso LUMC e risiede sotto la licenza della Centrale Commissie Dierproeven (Commissione Nazionale Olandese per gli Studi sugli Animali). I topi della linea C57BL vennero creati a partire dal 1921 incrociando topi denominati “57” e “52” dallo stock di Miss Abbie Lathrop, studiosa e appassionata di roditori che tra la fine dell’800 e gli inizi del ‘900 mise a punto modelli animali per la ricerca sullo sviluppo e sul cancro [30]. L’attuale linea C57BL/10J utilizzata in questo studio è stata infine stabilita come ceppo indipendente presso il Jackson Laboratory nel 1948 [31].

Si tratta di topi della specie *Mus musculus*, chiamati anche “topo comune”, da cui per incroci consanguinei controllati è stato creato il sottoceppo specifico C57BL/10J (Black 10), il quale risulta molto simile alla linea di topi più utilizzata in assoluto per gli studi sperimentali C57BL/6J, con alcune differenze in varianti alleliche e caratteristiche fisiologiche.

L’aspetto del C57BL/10J è molto simile a quello del C57BL/6J, con una pelliccia marrone scuro/nera, i reni piccoli per il loro peso corporeo, i cuscinetti plantari molto irti e code più spesse e una massa complessiva superiore a quella dei topi B6. I topi adulti misurano una ventina di centimetri, di cui la metà o poco meno spetta alla coda; il peso invece oscilla fra i 10 e i 25 grammi. La vita media dei topi B10 maschi è significativamente superiore a quella dei maschi del ceppo B6, mentre la durata di vita delle femmine di entrambi i ceppi è molto simile (circa 700 giorni).

I topi sono stati inviati alla struttura per animali del Centro Medico Universitario di Leiden il 9 gennaio 2023 per consentire loro un adeguato adattamento alle condizioni ambientali dell’esperimento e per permettere di selezionare gli animali da inviare all’ESTEC per gli studi di ipergravità. 11 esemplari sono stati riuniti nel gruppo denominato “3G” e sono stati inviati all’Agenzia Spaziale Europea a Noordwijk, mentre i 12 topi del gruppo “Vivarium” e i 12 topi del gruppo Training Cage (TC) in MDS di controllo sono rimasti presso Leiden.

### 4.2. The Large Diameter Centrifuge

L’ipergravità è stata ricreata per mezzo della Centrifuga a Largo Diametro (LDC), situata presso il *Life and Physical Sciences Instrumentation and Life Support Laboratory (LIS)* collocato nel Centro



Europeo di Ricerca e Tecnologia Spaziale (ESTEC) dell'Agenzia Spaziale Europea (ESA) a Noordwijk, nei Paesi Bassi.

Si tratta di uno strumento di grandi dimensioni posto al servizio della comunità scientifica e tecnologica di tutta Europa, presso il quale è possibile condurre studi riguardanti l'impatto della gravità nei diversi ambiti, da quello biologico, biochimico, microbiologico, a quello della scienza dei materiali, fluidodinamica, geologia e indagini di fisica ottica e del plasma, per periodi da 1 minuto fino a sei mesi consecutivi [32].

La struttura della LDC è composta da un asse centrale di rotazione (Carry hub) collegato a terra nel quale si trova il motore, i freni a disco, i connettori elettrici per il trasferimento di segnali, i sensori di velocità e vibrazione; oltre che alla struttura al quale sono attaccati i quattro bracci rotanti, per un diametro totale di 8 metri. A ogni braccio possono essere agganciate fino a due cabine (gondole) ciascuna delle quali sopporta un carico massimo di 80 kg. Tuttavia, il numero massimo di gondole utilizzabili è di 6, più la gondola centrale situata al di sopra dell'asse di rotazione, nella quale generalmente vengono inseriti i campioni di controllo o di riferimento, essendo questa sottoposta a rotazione ma alla normale accelerazione di gravità ( $\sim 1g$ ). Le gondole hanno una dimensione di 580 mm  $\times$  650 mm  $\times$  810 mm, sono dotate di uno sportello apribile per l'introduzione dei campioni e sono equipaggiate di un sistema per l'approvvigionamento di liquidi/gas, un sistema per riprese video interne e ventilazione forzata. Le gondole rappresentano l'interfaccia con l'apparato sperimentale e sono equipaggiate di sensori di temperatura, accelerometri, collegamenti internet e video e raccordi per l'entrata di aria/liquidi a seconda delle necessità dell'esperimento stesso. L'alloggiamento per eventuali contenitori o taniche per liquidi o gas si trova accanto alla gondola di controllo.

Il campo di ipergravità che si genera all'interno delle gondole per azione della forza centripeta consente di sottoporre i campioni a valori fino a 20 volte superiori a quelli della gravità terrestre. Tutte le componenti della centrifuga sono interconnesse da un sistema ethernet che consente il dialogo delle strutture con la cabina di controllo per l'acquisizione dei dati. Al di sopra della cabina centrale è presente un PC desktop (Experimental Control Equipment) il cui scopo principale è controllare i dispositivi installati nelle gondole, raccogliere dati e inviarli alla stazione scientifica o salvarli sul disco rigido locale.



Figura 1. LDC presso ESA- ESTEC. [32]

Al di fuori del locale dedicato alla centrifuga è presente la cabina di controllo (Control Room), riservata al personale formato dall'ESA, dalla quale è possibile visionare il funzionamento della LDC e dove sono presenti i PC e le stazioni di controllo e comando del macchinario (Operation Control Station); è inoltre presente una stazione operativa scientifica (Science Station) equipaggiata di un computer collegato alla gondola dal quale si possono inserire dati scientifici di gestione degli esperimenti. La Science Station è dotata anche di una stazione video (Video Station) dalla quale è possibile visionare l'interno delle gondole durante l'esperimento.

Il flusso dei dati operativi fluisce verso la Operation Control Station, la quale gestisce e scambia i dati con la stazione di controllo elettronica (Control Electronics) e con la Science Station.

È possibile avere accesso ai dati della LDC in tempo reale attraverso software sviluppati ad hoc, oppure vengono forniti dal personale dell'ESA al termine dello studio.

La rotazione della LDC genera un campo di accelerazione artificiale che provoca l'oscillazione delle gondole verso l'esterno, consentendo così di sottoporre i campioni ad una accelerazione differente da quella di gravità.

Essendo l'accelerazione un'entità vettoriale, per mezzo di una centrifuga è possibile produrre una "gravità artificiale" cambiando la direzione del vettore: la rotazione induce sul campione un movimento con velocità costante, ma essendo che l'orientamento (la direzione del vettore) cambia costantemente, l'oggetto viene accelerato.

Questa accelerazione è definita come:

$$a_c = \omega^2 r$$

Dove:

$a_c$  = accelerazione centripeta (m/s<sup>2</sup>)

$\omega$  = velocità angolare (rad/s)

$r$  = raggio (m)

Da cui è possibile calcolare la forza centripeta ( $F_c$ ):

$$F_c = ma_c = m\omega^2 r$$

L'accelerazione gravitazionale generata dipende quindi sia dalla velocità di rotazione, sia dalla distanza del campione rispetto al centro di rotazione. Essendo l'accelerazione centripeta dipendente dal raggio, i campioni vengono generalmente posti nelle gondole più esterne in cui si verifica un livello  $g$  di circa due volte superiore rispetto a quelle interne.

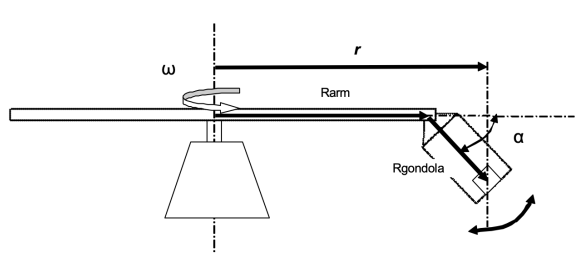


Figura 2. Inclinazione delle gondole rispetto l'asse di rotazione. [32]

Il campione è sottoposto a un'accelerazione artificiale (chiamata accelerazione sperimentale,  $a_e$ ) che è la risultante vettoriale dell'accelerazione di gravità terrestre ( $g$ ) e dell'accelerazione centripeta.

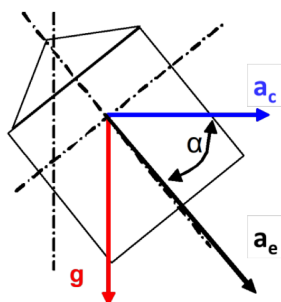


Figura 3. Accelerazioni applicate al baricentro della gondola. [32]

L'accelerazione sperimentale può essere anche calcolata come:

$$a_e = a_c / \cos(\alpha)$$

Dove l'angolo  $\alpha$  è dato da:

$$\text{tg}(\alpha) = g/a_c$$

Ne consegue che con l'aumentare della velocità di rotazione, l'angolo della gondola si riduce progressivamente fino a  $\alpha = 2.86^\circ$  all'accelerazione massima di 20g. Per raggiungere la massima inclinazione possibile, inoltre sarebbe auspicabile avere il baricentro della gondola posizionato centralmente e il più basso possibile.

## ARTEFATTI

Trattandosi di un'accelerazione dovuta alla rotazione, e non un'accelerazione che avviene con moto lineare, interviene sul sistema un fenomeno che può essere interpretato come un ritardo del moto dell'oggetto rispetto a quello della LDC. Si tratta dell'accelerazione di Coriolis che induce una sorta di deflessione della traiettoria degli oggetti in movimento all'interno di un sistema rotante come la Terra o una centrifuga, influenzando sulla gravità generata da un sistema rotante.

Questa accelerazione influisce particolarmente su organismi in libero movimento come i pesci, o nei fenomeni di galleggiamento come la risalita di bolle d'aria nei liquidi soggetti a campi ipergravitazionali. Negli esseri umani o negli animali, questa accelerazione potrebbe essere responsabile del mal di movimento e del mal di spazio mentre si muovono in un campo rotante, mediato dall'azione sui canali semicircolari delle orecchie interne. La definizione di questa accelerazione in g è:

$$a_{\text{coriolis}} = (2v \times \omega) / g$$

Dove:

$a_{\text{coriolis}}$  = accelerazione di Coriolis espressa in g's

$v$  = velocità dell'oggetto in movimento (m/s)

$\omega$  = velocità angolare (rad/s)

$g$  = accelerazione di gravità ( $\text{m/s}^2$ )

La stessa equazione può essere espressa utilizzando come velocità angolare i giri al minuto (rpm):

$$a_{\text{coriolis}} = (2\pi v / 30 \times g) \times \text{rpm}$$

L'impatto della forza di Coriolis su un campione dipende dagli assi lungo i quali si muove l'oggetto rispetto agli assi di rotazione ed è maggiore quando il campione si trova su un piano a  $90^\circ$  rispetto agli assi di rotazione; inoltre è tanto maggiore quanto rapida è l'accelerazione angolare. Tuttavia, due sistemi rotanti con raggi diversi ma stessa velocità angolare genererebbero le stesse accelerazioni di Coriolis.

Ulteriori artefatti sono indotti dalla generazione di forze di taglio inerziali. Infatti se una massa adesiva a una superficie subisce un'accelerazione in direzione non perfettamente perpendicolare alla superficie stessa, il campione viene sottoposto a delle forze che tenderebbero a farlo scivolare via dalla superficie.

Il livello di taglio inerziale dipende dal raggio della centrifuga ed è tanto più influente quanto minore è il raggio della centrifuga. Il diametro della LDC con una completa oscillazione delle gondole raggiunge gli 8 metri, dimensione che consente di trascurare l'influenza di queste forze, sebbene sia consigliabile posizionare i campioni tangenzialmente rispetto all'asse di rotazione e il più vicino possibile al pavimento della gondola per sfruttare al meglio la geometria della LDC.

Nel presente progetto i topi sono stati sottoposti a ipergravità a partire dal giorno 9 febbraio 2023. Per consentire un adeguato adattamento, il primo giorno gli animali sono stati portati da un valore di 1g a 3g in due ore, seguito da un valore di 2g per l'intera giornata successiva. A partire dal terzo giorno fino al 8 marzo 2023 è stata mantenuta un'accelerazione pari a 3g.

Per consentire il rifornimento di acqua e cibo, la LDC è stata fermata per pochi minuti al giorno 8, 15 e 26. Il ritorno a 3g è sempre avvenuto in modo graduale in un arco di tempo di 2 ore.

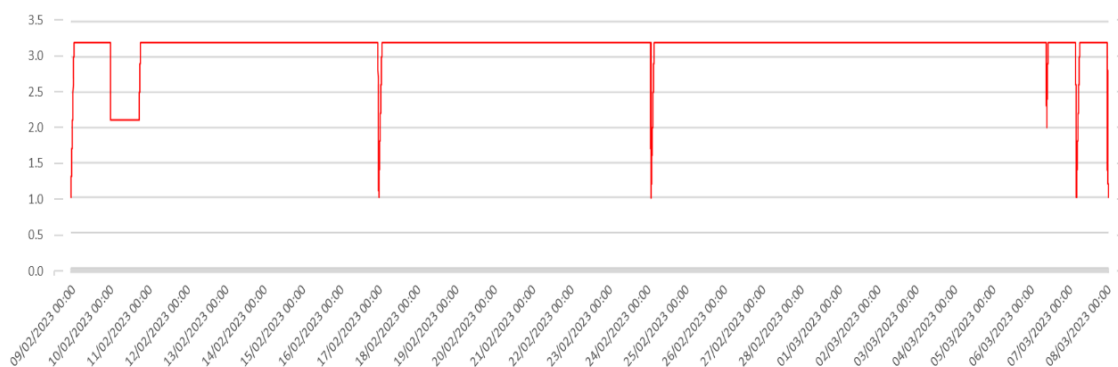


Figura 4. Esposizione complessiva all'accelerazione di gravità durante lo studio MDS-LDC. Da notare che il livello di g indicato nel grafico equivale a 3,2g in quanto misurato sul fondo della gondola. A livello dei topi è di 3g. Il rallentamento della gondola il giorno 25 è stato dovuto a un problema del rifornimento di cibo risolto in seguito da remoto [33].

### 4.3. The Mice Drawer System Payload

L'Agenzia Spaziale Italiana, in accordo con le proprie strategie scientifiche e il Piano Nazionale di Utilizzo della Stazione Spaziale Internazionale (ISS), ha incaricato Thales Alenia Space Italia di progettare e realizzare un payload per la ricerca sui roditori sulla ISS, noto come Mice Drawer System (MDS). MDS è stato progettato per operare autonomamente per oltre 3 mesi, richiedendo l'intervento dell'equipaggio solo per le attività di manutenzione [34].

Il primo lancio con il MDS è avvenuto nel 2009, e ha consentito la permanenza dei topi nello spazio per il periodo di tempo più lungo mai registrato.

L'obiettivo iniziale del programma MDS era sviluppare una struttura per condurre ricerche sulla formazione e sui cambiamenti del tessuto osseo indotti dalla microgravità e sviluppare, di conseguenza, contromisure specifiche per contrastare l'osteoporosi. Tuttavia, il payload MDS, realizzato da Thales Alenia Space Italia (stabilimento di Milano), è stato progettato come una

struttura di uso generale, personalizzabile e utilizzabile nella ISS da numerosi scienziati per esperimenti di lunga durata con topi nei diversi campi di ricerca. Nella configurazione standard, l'MDS può ospitare 6 topi, ciascuno nella propria gabbia, per un periodo di 100 giorni, con la possibilità di estendere la durata fino a 180 giorni.

L'MDS è costituito da vari sottosistemi integrati in un contenitore esterno di dimensioni 516×421×480 mm: la camera per i topi (MC), il sistema di gestione dei liquidi (LHS), il sistema di distribuzione del cibo (FDS), il sistema di condizionamento dell'aria (ACS), il sistema di illuminazione (ILS), il sistema di osservazione (OSS) e l'unità di controllo del payload (PCU).

- La camera dei topi è costituita da due habitat, ciascuno dei quali include gli elementi necessari per fornire i servizi di base a 3 topi alloggiati ciascuno nella propria gabbia. La configurazione utilizzata in occasione del primo volo era costituita da tre gabbie metalliche delle dimensioni di 116×98 mm, al cui interno si trovavano le confezioni di cibo, un sistema per l'erogazione dell'acqua, telecamere per l'osservazione video, LED bianchi e a infrarossi per l'illuminazione e sensori per monitorare la composizione dell'aria (temperatura, umidità relativa, CO<sub>2</sub> e NH<sub>3</sub>). Le gabbie sono dotate di griglie su tutte e quattro le pareti, consentendo il contatto olfattivo ma non fisico tra gli animali. In base alle necessità scientifiche, ogni habitat può essere configurato come un'unica gabbia di circa 364×98 mm per un gruppo di topi o come due gabbie di circa 178×98 mm per due coppie di topi.
- Il sistema di gestione dei liquidi, collegato a un serbatoio principale di circa 0,5 litri di capacità, fornisce acqua potabile a ogni singola gabbia tramite valvole di abbeveraggio azionate a stelo. L'acqua viene fornita senza limiti con una stima di consumo giornaliero di 7 ml per topo. Ogni dieci giorni circa, è necessario provvedere al riempimento del serbatoio principale per consentire la sopravvivenza degli animali per tutta la durata dell'esperimento.
- Il sistema di distribuzione del cibo fornisce automaticamente due barrette a ogni gabbia per un peso complessivo di circa 90 grammi. La composizione delle barrette alimentari dipende dal protocollo dell'esperimento e, se ritenuto necessario, contestualmente all'alimentazione vengono somministrati farmaci o additivi. La quantità di cibo e il timing della somministrazione possono essere personalizzati per ogni gabbia in base al protocollo scientifico. Dopo il loro utilizzo, le vecchie barrette di cibo vengono sostituite con le nuove tramite aperture localizzate a livello del pannello frontale dell'MDS.



*Figura 5. Interno di una gabbia MDS. [34]*

- Il sistema di condizionamento dell'aria consente di regolare la velocità costante del flusso d'aria attraverso le gabbie, eliminando la CO<sub>2</sub> prodotta e fornendo l'O<sub>2</sub> consumato. Per mantenere le concentrazioni adeguate dei gas, viene scambiato circa il 5% dell'aria totale circolante ogni 2 minuti con la cabina ISS all'interno dell'MDS. I filtri HEPA filtrano i flussi d'aria espulsi e iniettati per prevenire la contaminazione microbiologica tra la cabina della ISS e l'MDS. Il sistema di condizionamento ha anche la funzione essenziale di eliminare i rifiuti (urina, feci, peli, resti di cibo, ecc.) dalle gabbie. I materiali di scarto estratti dall'aria vengono raccolti in filtri posizionati sotto ciascuna gabbia che vengono sostituiti mensilmente. In condizioni standard l'ACS mantiene una temperatura compresa tra 25 e 30°C ed un'umidità tra il 40% e il 70%, che può, quest'ultima, variare in base all'umidità relativa dell'aria proveniente dalla cabina ISS e dalle necessità del protocollo sperimentale.
- Il sistema di illuminazione consente di impostare cicli di luce e buio programmabili ogni 5 minuti durante le 12 ore di luce e le 12 ore di buio previste. Durante i periodi di illuminazione, la luce è diffusa senza nessun punto luminoso e la luminosità può essere regolata a seconda delle esigenze dell'esperimento. Inoltre, è possibile monitorare i topi durante i periodi di buio grazie a luci infrarosse.
- Il sottosistema di monitoraggio permette di osservare i topi sia di giorno sia di notte, grazie alla dotazione di una telecamera per gabbia, con lo scopo di monitorare lo stato di salute, il comportamento dei topi, le condizioni della gabbia e la presenza di cibo. Le tempistiche e la durata di ogni sessione di osservazione possono essere pianificati secondo il protocollo scientifico e i video possono essere trasferiti in tempo reale o salvati a bordo per essere poi inviati in un secondo momento ai gruppi di ricerca.

- L'unità di controllo del payload garantisce una grande autonomia e limita al minimo il coinvolgimento dell'equipaggio nell'esecuzione dell'esperimento. I compiti principali della PCU includono l'esecuzione dei comandi, l'acquisizione e la trasmissione dei dati, il monitoraggio dello stato dell'esperimento, il controllo delle condizioni ambientali per i topi e la gestione delle interfacce con la ISS e l'equipaggio.

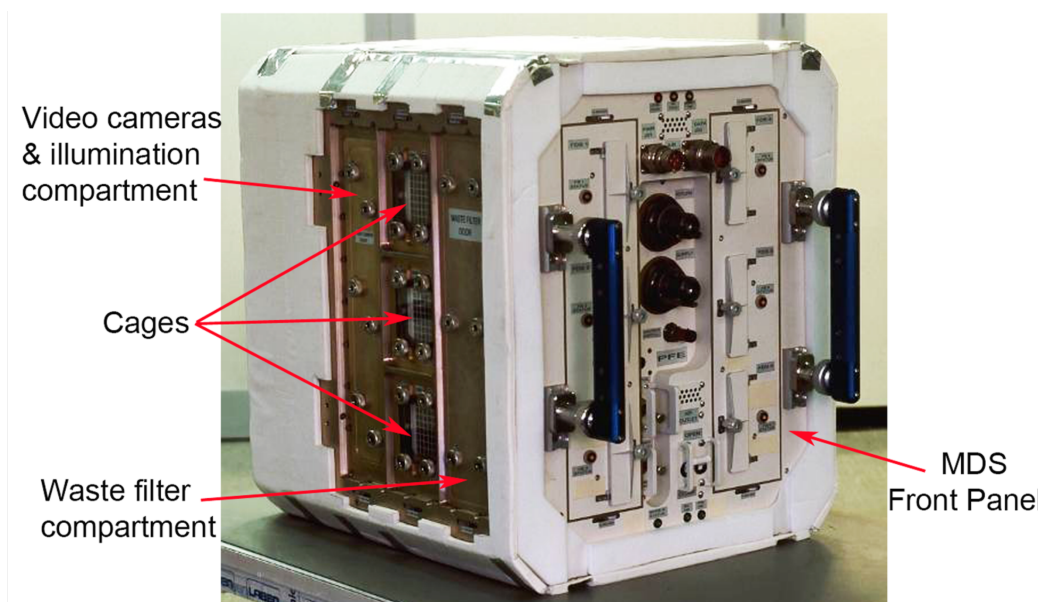


Figura 6. Componenti dell'MDS. [34]

Dopo un breve periodo di adattamento compreso tra il 23 gennaio al 7 febbraio, sono stati individuati i topi più adeguati alla sopravvivenza in MDS che, successivamente, sono stati inviati all'ESTEC. Gli 11 topi da sottoporre a ipergravità, denominati gruppo 3G, sono stati suddivisi in due moduli MDS (MDS-1 e MDS-2), ciascuno nella propria gabbia. Considerando che ogni MDS è costituita da sei gabbie singole, la gabbia numero 2 dell'MDS-2 è rimasta vuota.

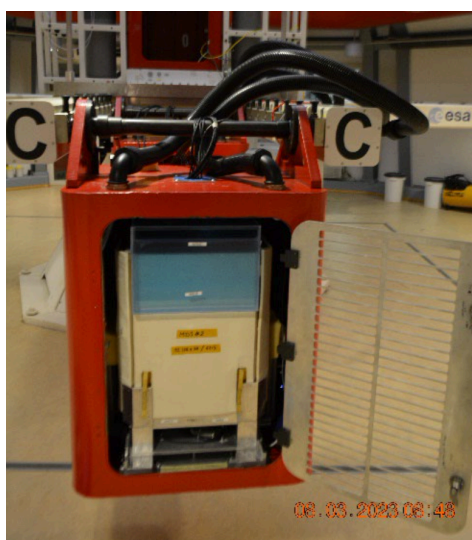


Figura 7. MDS-2 all'interno della gondola. [33]



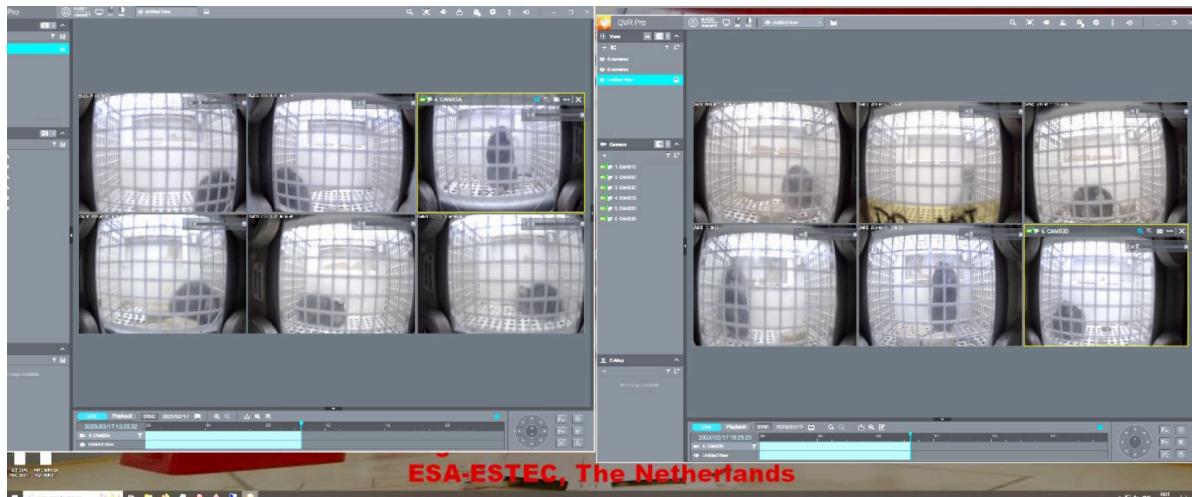


Figura 8. 11 topi in MDS presso ESA-ESTEC durante rotazione a 3g. [33]

Il set-up dei 12 topi controllo in MDS (gruppo Training Cage) presso l'Università di Leiden ha previsto il sistema di abbeveraggio e rifornimento cibo completamente automatizzato equivalente a quello dell'MDS a 3g.

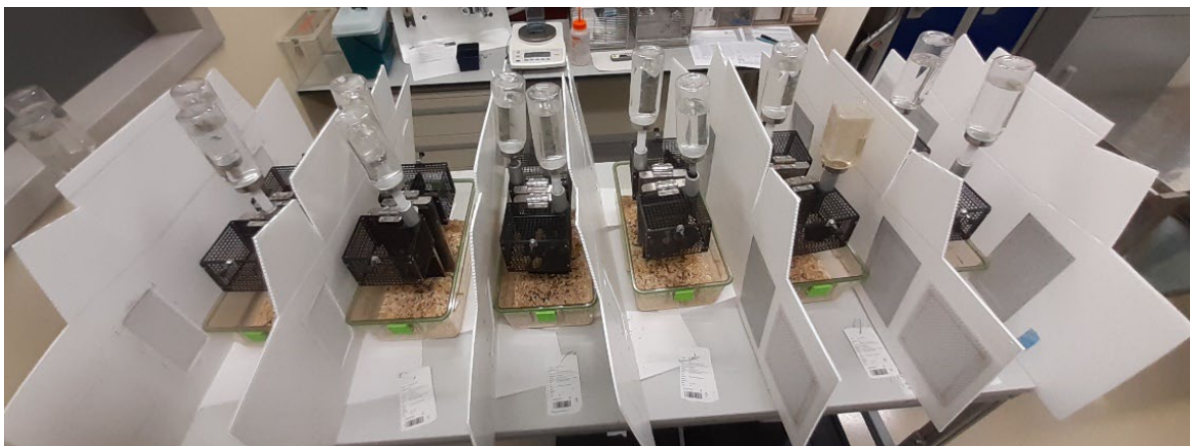


Figura 9. Set-up dei topi controllo in MDS presso l'Università di Leiden. [33]

Due giorni prima del termine dell'esperimento a 3g, il 6 marzo, sono stati dissezionati 2/3 topi del gruppo Training cage. Successivamente sono stati sacrificati giorno per giorno 6 topi del gruppo Vivarium, l'intero gruppo di topi 3G, tutti gli animali del gruppo TC e infine i restanti 6 topi del gruppo Vivarium nell'ambito del progetto *Tissue Sharing Programme*, un piano di condivisione dei tessuti dei topi sottoposti a voli spaziali con lo scopo di consentire la massima diffusione dei dati sperimentali tra i gruppi di ricerca partecipanti al progetto stesso, a vantaggio di una riduzione del numero di animali da sacrificare e una diminuzione dei costi degli esperimenti.

L'11 e il 12 marzo sono stati preparati i campioni da inviare all'Università di Verona per gli studi di proteomica. Gli studi di statistica sono stati condotti presso l'Università del Piemonte Orientale.

#### 4.4. Vivarium cages

Si tratta di gabbie progettate per soddisfare i requisiti di ricerca e minimizzare le variazioni sperimentali dovute a fattori ambientali, certificate secondo le norme CE. Tali gabbie vengono impiegate al fine di riprodurre il più possibile le condizioni in cui l'animale si trova in natura, fornendo loro degli spazi più ampi nei quali muoversi riducendo al minimo lo stress indotto dai protocolli sperimentali. I requisiti minimi di spazio per l'alloggio degli animali vengono definiti dalle linee guida per le strutture per gli animali da laboratorio da parte dell'organizzazione governativa interessata, rappresentata in Europa dalla direttiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 settembre 2010 sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici.

A seconda del numero di animali che alloggiano possono essere di diverse dimensioni, sono costituite da materiale plastico impermeabile e resistente, di solito polipropilene o policarbonato, compatibile al contatto con gli alimenti. Devono essere facilmente manipolabili e stoccabili e l'igienizzazione avviene generalmente per mezzo dell'autoclave. La griglia superiore è in acciaio inossidabile e comprende gli alloggiamenti per il pellet di alimentazione e per la bottiglia d'acqua; inoltre garantisce una perfetta visibilità e ricambio di aria e consente di creare un ambiente chiuso dal quale gli animali non possono fuoriuscire [35].



*Figura 10. Gabbia Vivarium per topi [35].*

A differenza della gabbia MDS, il consumo di acqua è ad libitum, mentre il cibo viene fornito sempre tramite barrette alimentari. Il gruppo di controllo Vivarium situato presso LUMC è rappresentato da 12 topi wild type esposti a 1g per 30 giorni. Ogni animale è stato inserito nella propria gabbia ed è stato nutrito con il medesimo pellet alimentare utilizzato per gli altri gruppi.

## 4.5. Analisi proteomica e statistica

### *Rimozione di proteine ad alta abbondanza mediante tecniche di immunoaffinità*

Le tre proteine più abbondanti nel plasma di topo, ovvero albumina, IgG e transferrina, sono state rimosse utilizzando una Multiple Affinity Removal Spin Cartridge Mouse-3 (Agilent Technologies, USA) seguendo il protocollo raccomandato dal produttore. 25  $\mu\text{L}$  di plasma sono stati miscelati con 175  $\mu\text{L}$  di tampone di deplezione A (Agilent Technologies, USA) e filtrati attraverso un filtro centrifugo in acetato di cellulosa 0,22 mM (Agilent Technologies, USA) centrifugando a 100 x g per 2,5 minuti a temperatura ambiente. Il plasma eluito è stato poi conservato a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  fino alla successiva analisi. Successivamente, la concentrazione di proteine totali dei campioni di plasma è stata quantificata con il Microplate BCA Protein Assay Kit (Pierce), un metodo colorimetrico che a differenza dei saggi a base di coloranti come il Blue Coomassie (metodo Bradford), è compatibile con campioni che contengono fino al 5% di tensioattivi (detergenti) ed è influenzato molto meno dalle differenze di composizione delle proteine. La curva standard è stata costruita utilizzando campioni di albumina sierica bovina (BSA).

### *Digestione delle proteine e analisi proteomica basata su LC-MS/MS*

La digestione in soluzione e l'analisi LC-MS/MS sono state effettuate seguendo un metodo validato per l'analisi proteomica [36] che ha previsto in primo luogo la riduzione del campione proteico con ditiotreitolo e poi l'alchilazione con iodoacetamide. Successivamente, sono stati digeriti con una miscela tripsina-Lys-C (Thermo Fisher Scientific, USA), purificati con colonne Pierce C18 Spin (Thermo Fisher Scientific, USA) e quindi essiccati con un sistema speedVac. In seguito, la concentrazione di peptidi di ciascun campione digerito è stata quantificata mediante il saggio fluorometrico quantitativo Pierce (Thermo Fisher Scientific) e un'aliquota di ciascun campione, corrispondente a 200 ng di peptidi, è stata sottoposta ad analisi LC-MS/MS.

I campioni di peptidi sono stati analizzati con un approccio *label free*<sup>3</sup> (label free quantification, LFQ) su uno spettrometro di massa Orbitrap Fusion Lumos Tribrid (Thermo Fisher Scientific, USA) accoppiato a un sistema Ultimate 3000 nano-UHPLC (Thermo Fisher Scientific). I peptidi sono stati eluiti in 90 minuti utilizzando un gradiente di acetonitrile dal 4% al 50%.

Durante l'acquisizione MS, lo strumento è stato configurato per l'acquisizione dei frammenti con rapporto m/z da 375 a 1500 Da, con una risoluzione di 120.000 (a 200 m/z). Per la MS/MS, la risoluzione era di 30.000 (a 200 m/z), concentrandosi sugli ioni precursori con intensità superiore a  $3,0 \times 10^4$  e cariche comprese tra +2 e +5, applicando un'esclusione dinamica di 45 secondi. I campioni bianchi (75% ACN in acqua) e un controllo di qualità (digest del lisato HeLa) sono stati iniettati

---

<sup>3</sup> Metodo di spettrometria di massa utilizzato per quantificare proteine senza l'uso di etichette chimiche, metaboliche o enzimatiche o la premiscelazione dei campioni da confrontare.

ogni quattro campioni durante la corsa.

I dati grezzi della spettrometria di massa sono stati elaborati con il software Proteome Discoverer (v2.5), con una tolleranza di massa di 10 ppm per MS1 e 0,02 Da per MS2. Le masse dei peptidi sono state confrontate con il database delle sequenze proteiche UniProt utilizzando impostazioni che includevano la digestione con tripsina, fino a due scissioni mancate, la modifica fissa della cisteina carbamidometilazione e le modifiche variabili come l'ossidazione della metionina e l'acetilazione N-terminale. L'intervallo di confidenza è stato valutato utilizzando l'algoritmo Percolator con un FDR di 0,01 sia per le proteine che per i peptidi.

#### *Analisi bioinformatica dei dati proteomici*

L'analisi dell'arricchimento funzionale o *functional enrichment analysis*<sup>4</sup> è stata condotta utilizzando ClueGO, un plugin per Cytoscape (programma a libero accesso utilizzato per decifrare le reti di interazione genica e dei pathway molecolari) insieme all'analisi della rete di interazione proteina-proteina tramite la piattaforma STRING [37] seguendo i metodi descritti nello studio condotto da Di Carlo, C., Sousa, B.C., Manfredi, M. et al. del 2021 [38], con lo scopo di identificare i processi biologici GO<sup>5</sup> (Gene Ontology) significativamente arricchiti e i pathway KEGG<sup>6</sup> e Reactome<sup>7</sup>.

La restrizione del pathway è stata impostata su un valore di  $p < 0,05$  e per specificare i termini GO è stato utilizzato un intervallo dell'albero GO con un minimo di 4 e un massimo di 5. Il numero minimo di geni in un percorso è stato fissato in un intervallo di 5. Il numero minimo di geni in un GO è stato fissato a 4, mentre la copertura è stata impostata su almeno il 5% del set di geni. Successivamente, la rete di interazione proteina-proteina è stata costruita con un livello di confidenza medio (punteggio 0,4), concentrandosi solo sulle interazioni validate sperimentalmente e su quelle derivate da database curati.

---

<sup>4</sup> Metodo per identificare classi di geni o proteine che sono sovrarappresentati in un ampio insieme di geni o proteine e possono avere un'associazione con diversi fenotipi. È un protocollo computazionale di analisi di nuove regioni genomiche rispetto ai termini della Gene Ontology e rispetto a pathway attivati in diverse condizioni fisiologiche e patologiche.

<sup>5</sup> Gene Ontology è un progetto bioinformatico atto a unificare la descrizione delle caratteristiche dei prodotti dei geni in tutte le specie. Risorsa bioinformatica più ampia al mondo di informazioni sulla funzione dei geni.

<sup>6</sup> KEGG è una delle più importanti banche dati bioinformatiche, realizzata dall'Università di Kyōto. Contiene informazioni sui pathway metabolici della cellula, focalizzando l'attenzione anche sulle variazioni delle vie metaboliche tra diversi organismi viventi.

<sup>7</sup> Open source e open access pathway database. Fornisce strumenti bioinformatici intuitivi per la visualizzazione, l'interpretazione e l'analisi dei pathway per supportare la ricerca di base e clinica, l'analisi del genoma, la modellazione, la biologia dei sistemi e l'istruzione.

## 5. Flusso di lavoro

Il programma di base per lo studio in MDS-LDC ha previsto il flusso di lavoro rappresentato nello schema seguente.

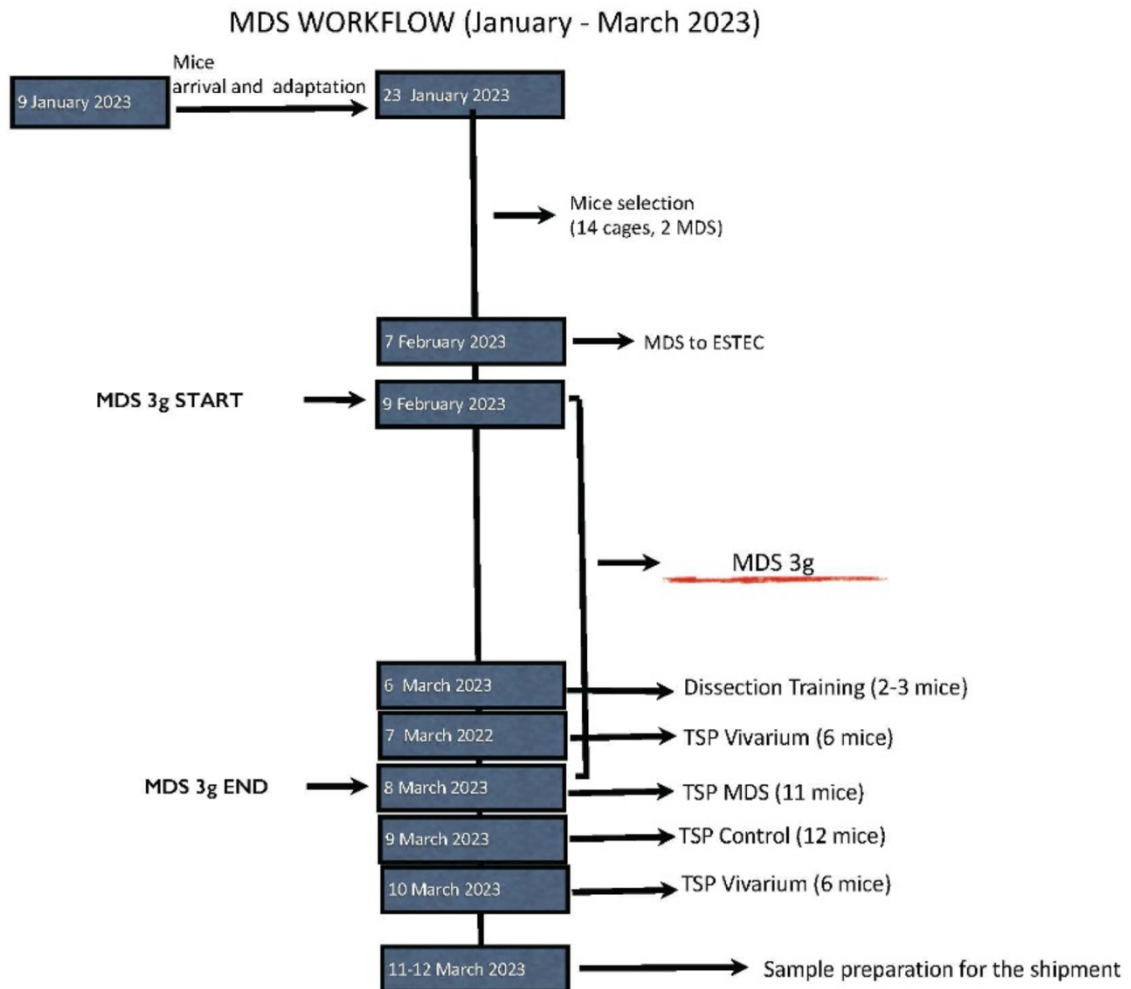


Figura 11. Tempistiche di riferimento per lo studio in LDC.

## 6. Risultati

### 6.1. Parametri sperimentali

I valori di temperatura, umidità e rifornimento di acqua sono stati costantemente monitorati in entrambi i moduli MDS-LDC e nella LUMC MDS di controllo in accordo con il piano sperimentale [33].

A partire dall'8 febbraio 2023 (giorno precedente all'inizio dell'esperimento a 3g) fino al 8 marzo 2023 (ultimo giorno in iperfuga), sono stati calcolati giorno per giorno i volumi cumulativi di acqua fornita ad ogni animale all'interno dell'MDS-1 e dell'MDS-2. I ml somministrati sono andati in crescendo in modo proporzionale per ogni animale, a indicarne un progressivo consumo.

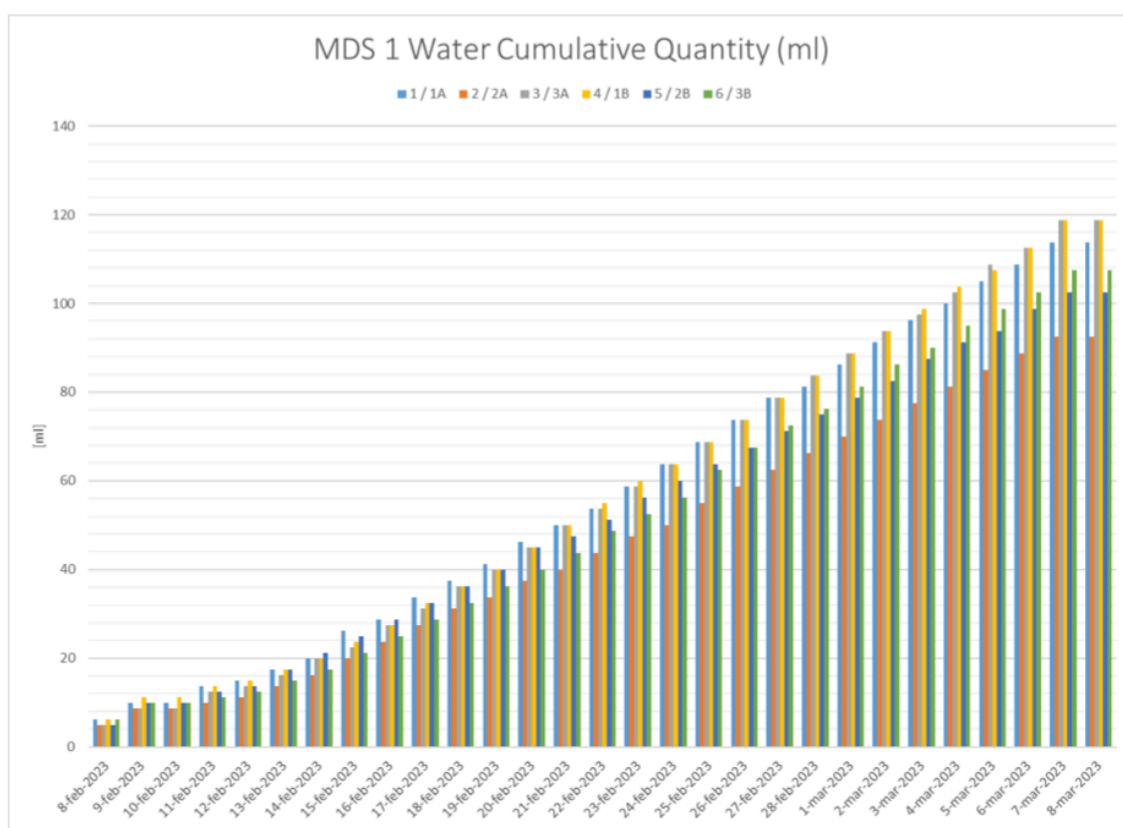


Figura 12. Quantitativo cumulativo di consumo di acqua nell'MDS-1 dal 08/02/23 al 08/03/23.

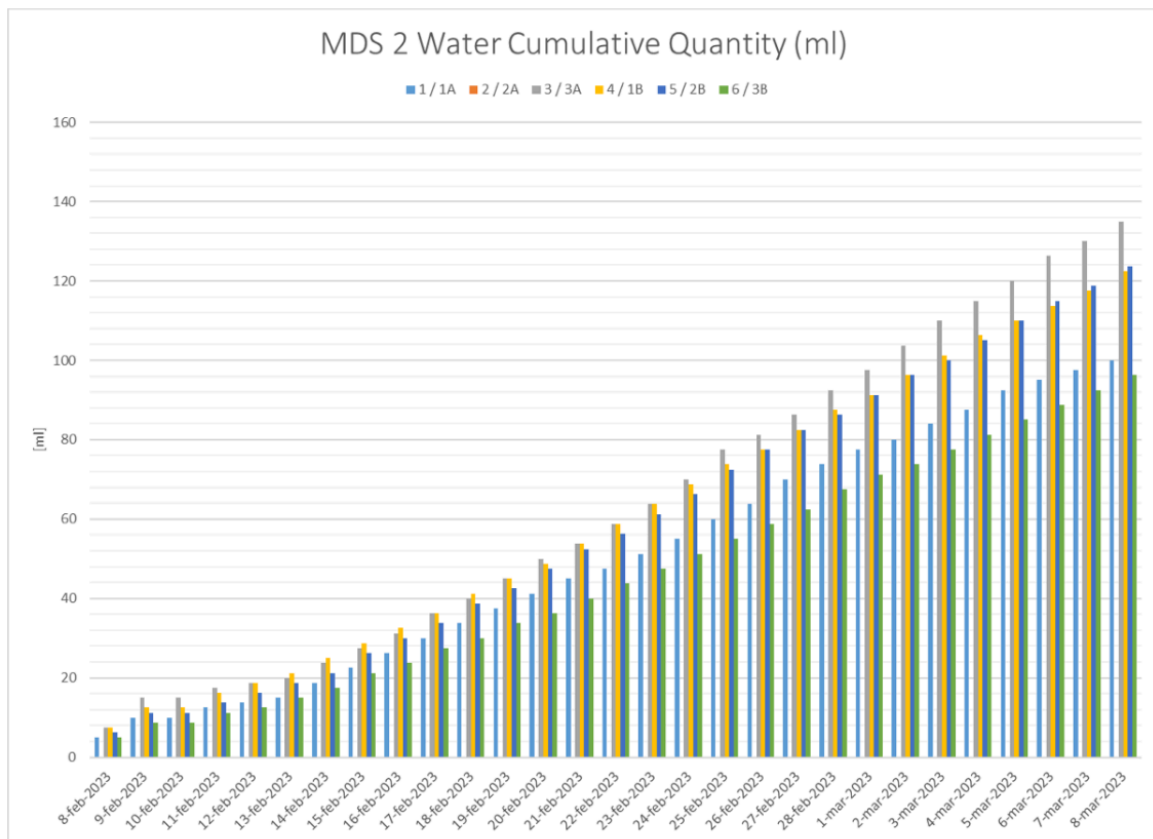


Figura 13. Quantitativo cumulativo di consumo di acqua nell'MDS-2 dal 08/02/23 al 08/03/23.

Nell MDS-1 la temperatura media interna alle gabbie è stata di 24,9° C, mentre nell'MDS-2 è risultata di 25,1° C, entrambi i parametri rientrano nell'intervallo di valori definito dal piano di ricerca. Il mantenimento della telecamera accesa in MDS-2 per l'intera notte del 8 febbraio ha causato un temporaneo aumento di temperatura che non ha influito sulla temperatura media. Il set-up è stato poi corretto il giorno seguente.

La temperatura media del laboratorio che ospitava le MDS di controllo era di 24,76° C.

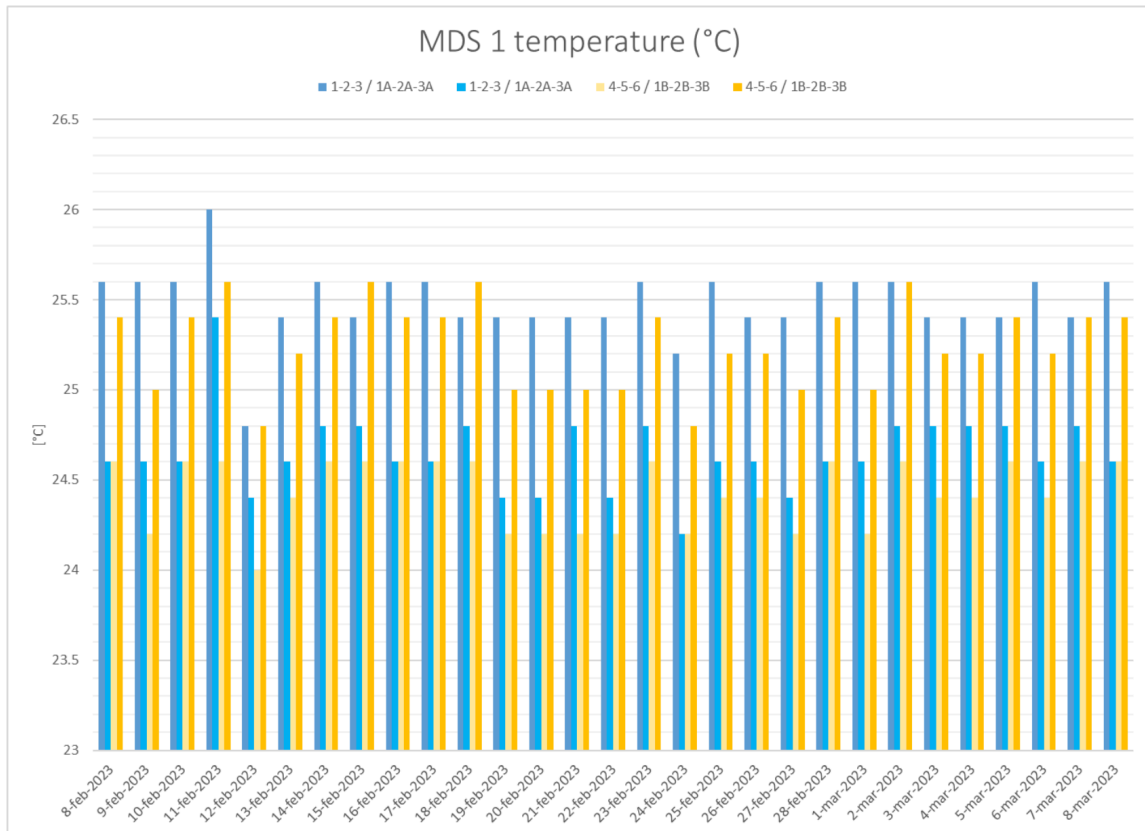


Figura 14. Temperatura in MDS-1 negli habitat 1 (gabbia 1-3) e 2 (gabbia 4-6). Le temperature sono rimaste all'interno dell'intervallo di  $25^{\circ}\text{C} \pm 3$  come indicato nel piano di ricerca. La temperatura media nell'MDS-1 per tutta la durata dell'esperimento è stata di  $24,9^{\circ}\text{C}$ .

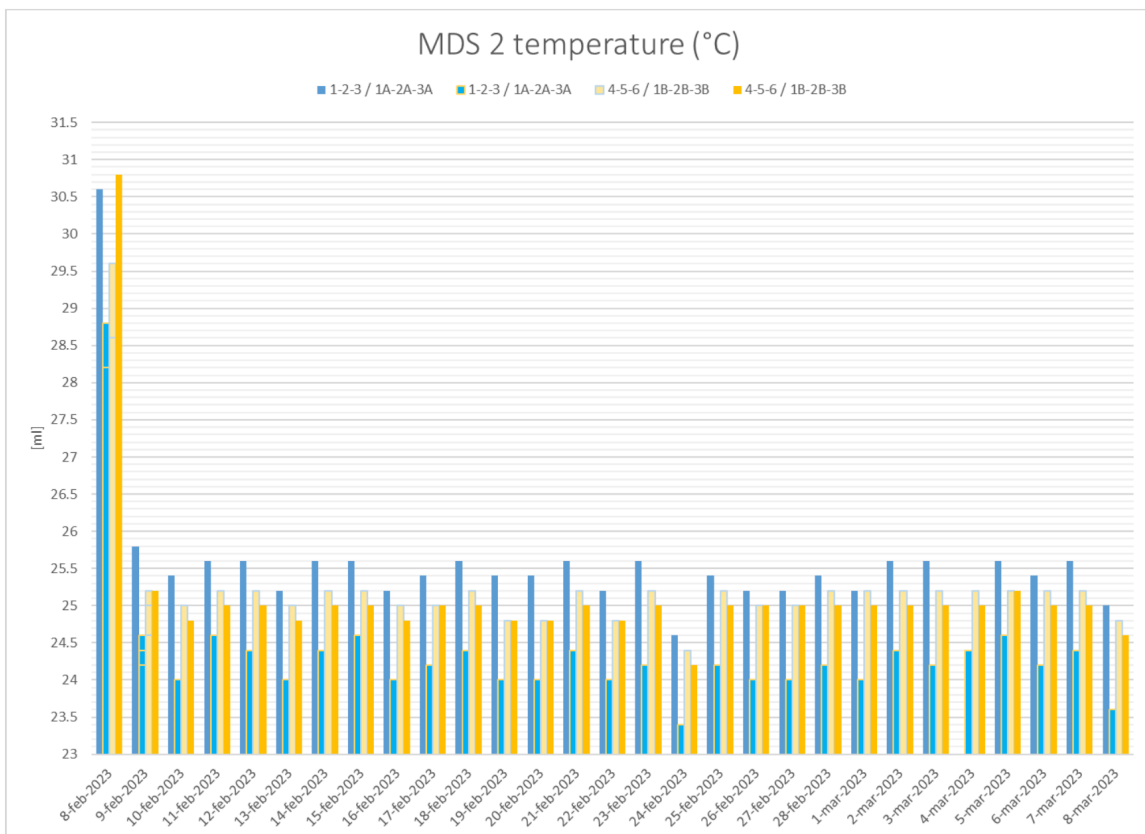


Figura 15. Temperatura in MDS-2 negli habitat 1 (gabbia 1-3) e 2 (gabbia 4-6). Le temperature rientrano nell'intervallo di  $25^{\circ}\text{C} \pm 3$  come indicato nel piano di ricerca. L'aumento della temperatura dell'8 febbraio è dovuto alla videocamera



rimasta accesa durante la notte, errore che non ha influito sul valore medio di temperatura dell'intera durata dell'esperimento (25,1 °C). Da notare l'annotazione errata della scala sull'asse delle y.

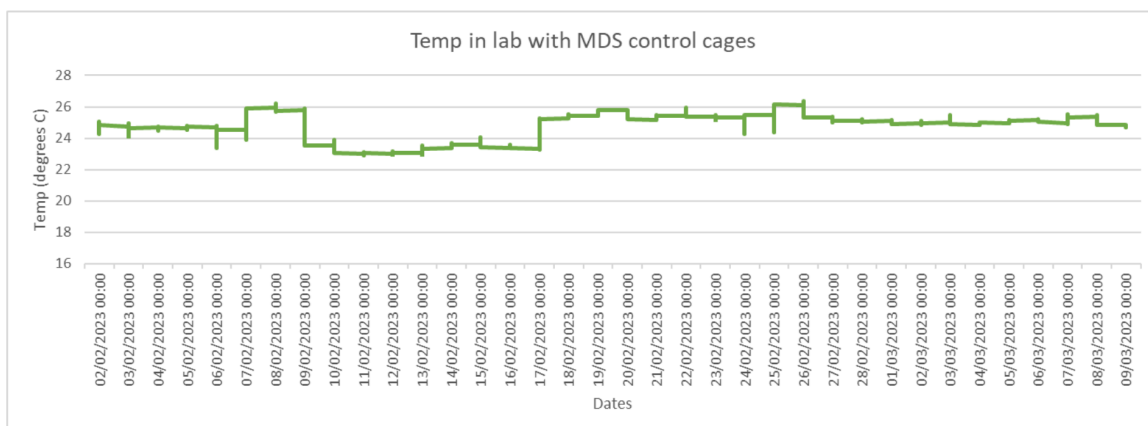


Figura 16. Temperatura giornaliera del laboratorio in cui erano alloggiate le MDS di controllo.

L'umidità media per l'intero periodo in MDS-1 è stata del 59% mentre in MDS-2 ha raggiunto il 47%. Entrambi i parametri, sebbene entro i limiti definiti dal protocollo sperimentale, sono stati superiori alla percentuale di umidità del laboratorio delle MDS di controllo che è risultata del 36,74%. La differenza sostanziale di umidità tra MDS-1 e MDS-2 non è nota ma può essere ricondotta a una differenza di funzionalità dei sensori.

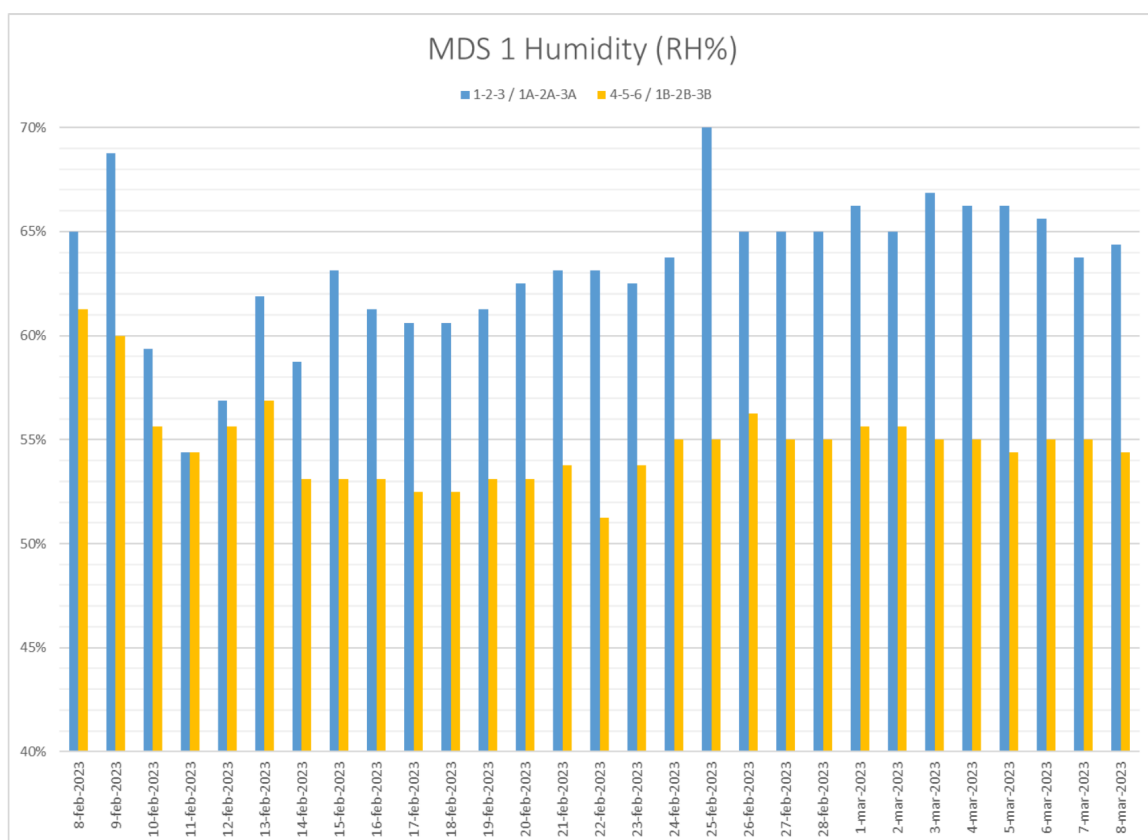


Figura 17. Umidità in MDS-1 negli habitat 1 e 2. I valori di umidità sono conformi al piano di ricerca del 55% ±15%. L'umidità media per l'intera durata dell'esperimento in MDS-1 è stata del 59%.

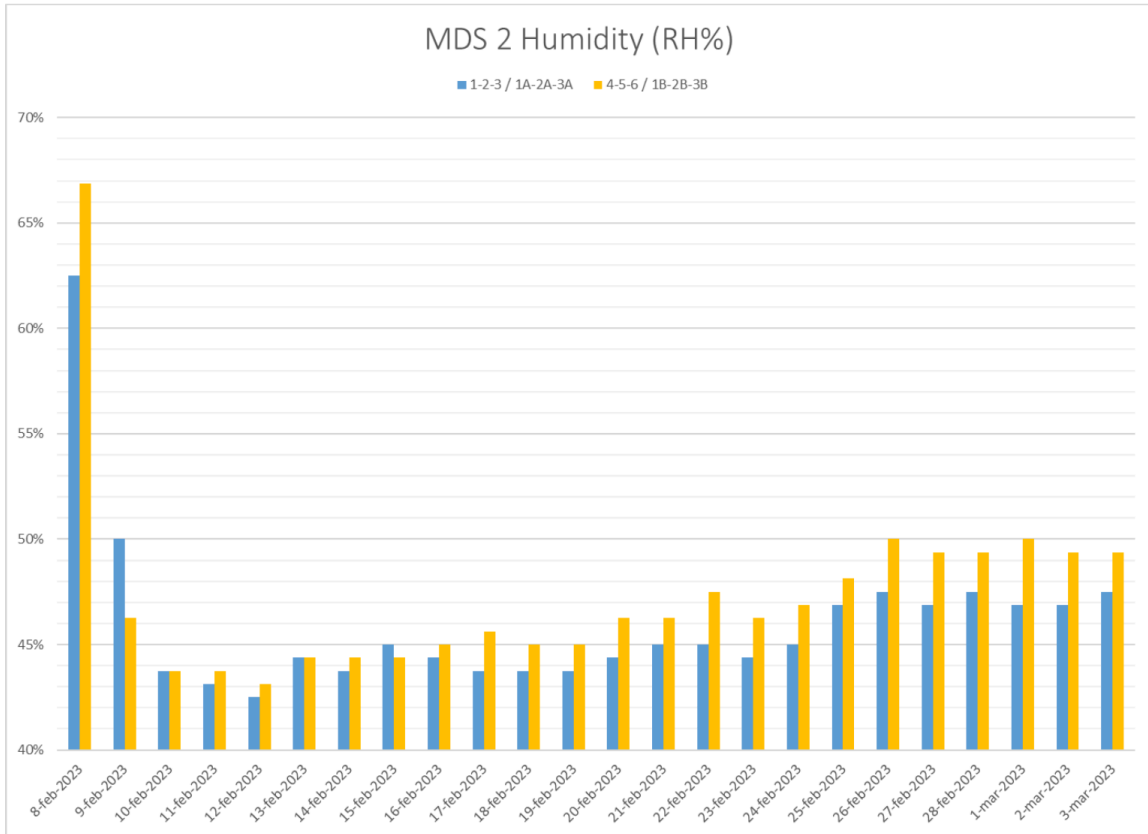


Figura 18. Umidità in MDS-2 negli habitat 1 e 2. I valori di umidità sono conformi al piano di ricerca del 55% ±15%. La ragione principale della differenza tra MDS-1 e MDS-2 non è nota, ma è probabile che sia dovuto a un diverso offset dei sensori. L'umidità media per l'intera durata dell'esperimento in MDS-2 è stata del 47%.

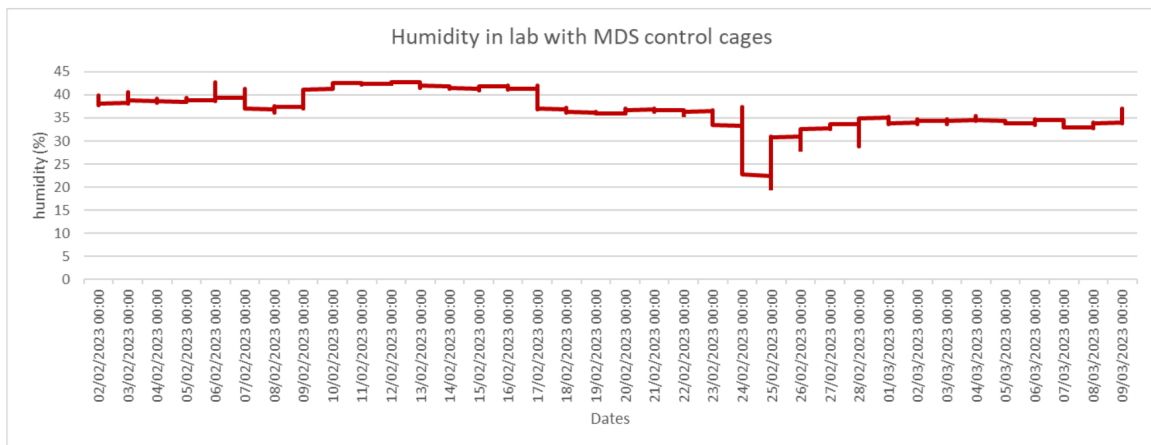


Figura 19. Livelli di umidità nel laboratorio in cui erano ospitati gli animali di controllo MDS. L'umidità media durante l'intero periodo sperimentale è stata del 36,74%.

## 6.2. Benessere animale

La valutazione del benessere animale è stata effettuata esaminando il comportamento, il consumo di acqua, di cibo e il conseguente aumento o diminuzione di peso dei singoli topi oggetto di studio [33].

### 6.2.1. Consumo d'acqua

Per valutare l'adattamento degli animali alle gabbie automatizzate, presso LUMC è stata osservata la capacità degli animali di procurarsi acqua tramite le apposite valvole interne alle gabbie misurando la diminuzione di peso delle bottiglie d'acqua fornite. Dal 23 gennaio 2023 al 13 febbraio 2023 si è registrato giornalmente un progressivo e pressoché costante consumo di acqua per tutti e 12 i topi (figura 20). Il 24 febbraio il consumo medio di acqua calcolato ogni due giorni per ogni animale ammonta a 11,5 ml.

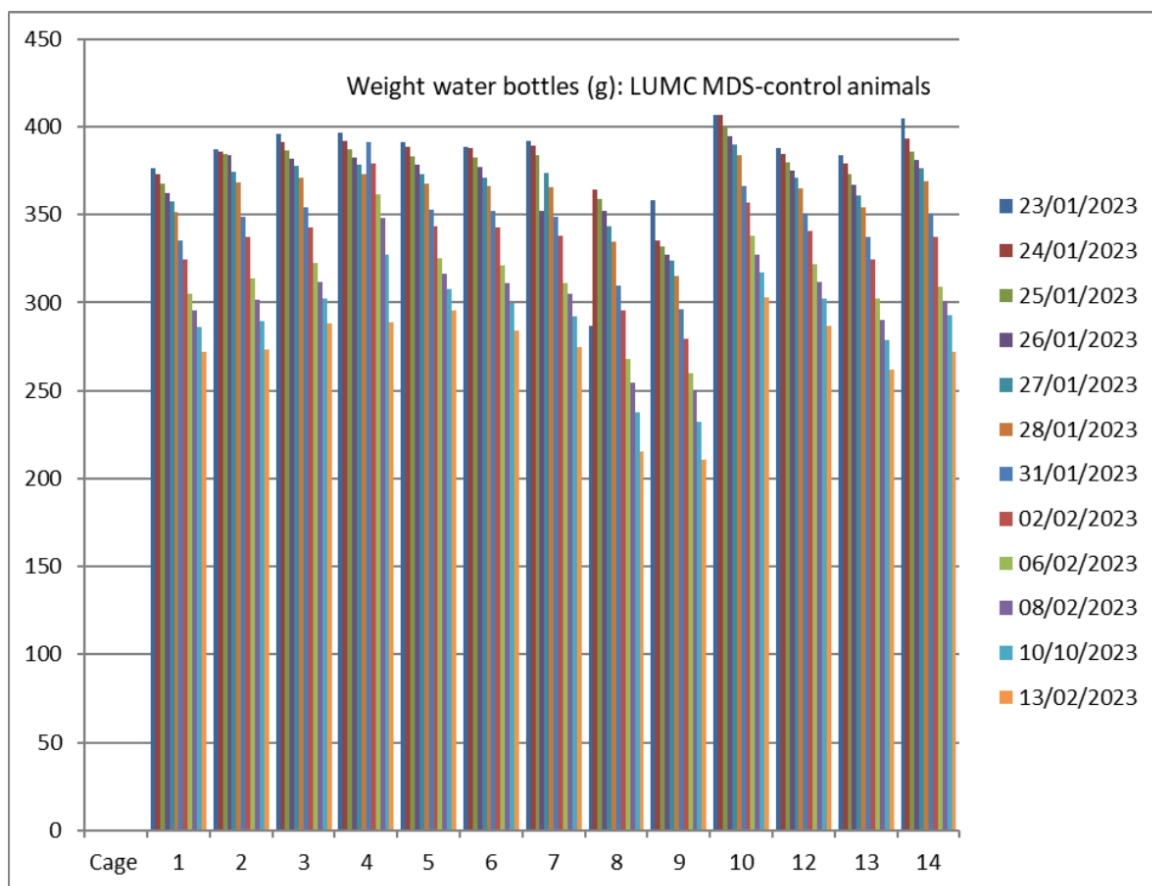


Figura 20. Riduzione del peso delle bottiglie d'acqua fornite ai topi in MDS di controllo presso LUMC dal 23/01/23 al 13/02/23.

Dal 8 febbraio al 8 marzo 2023 i topi in MDS-1 hanno consumato giornalmente quantità di acqua costanti durante l'intero periodo. Prima di essere sottoposti a 3g, il consumo di acqua per 3 topi è stato di 5 ml e per gli altri tre di poco superiore a 6 ml. Il 9 febbraio, primo giorno all'interno della

LDC, l'accelerazione di gravità è stata portata da 1g a 3g in due ore e contestualmente è stata registrata una diminuzione di consumo di acqua: i topi delle gabbie 1 e 6 sono passati da più di 6 ml a meno di 4 ml, i topi numero 2 e 3 da 5 ml a meno di 4 ml, il topo n. 4 da più di 6 ml a 5 ml e il topo n. 5 ha mantenuto invariato il proprio consumo di acqua (5 ml). Il giorno successivo (10 febbraio), nonostante la diminuzione dell'accelerazione a 2g per consentire agli animali di adattarsi, nessun topo ha consumato acqua. Dall'11 febbraio i topi hanno ricominciato a bere benché sia stata ripristinata l'accelerazione a 3g, e il consumo di acqua è andato incrementando fino a stabilizzarsi a valori simili al primo giorno all'interno dell'iperfuga (tra 4 e 5 ml).

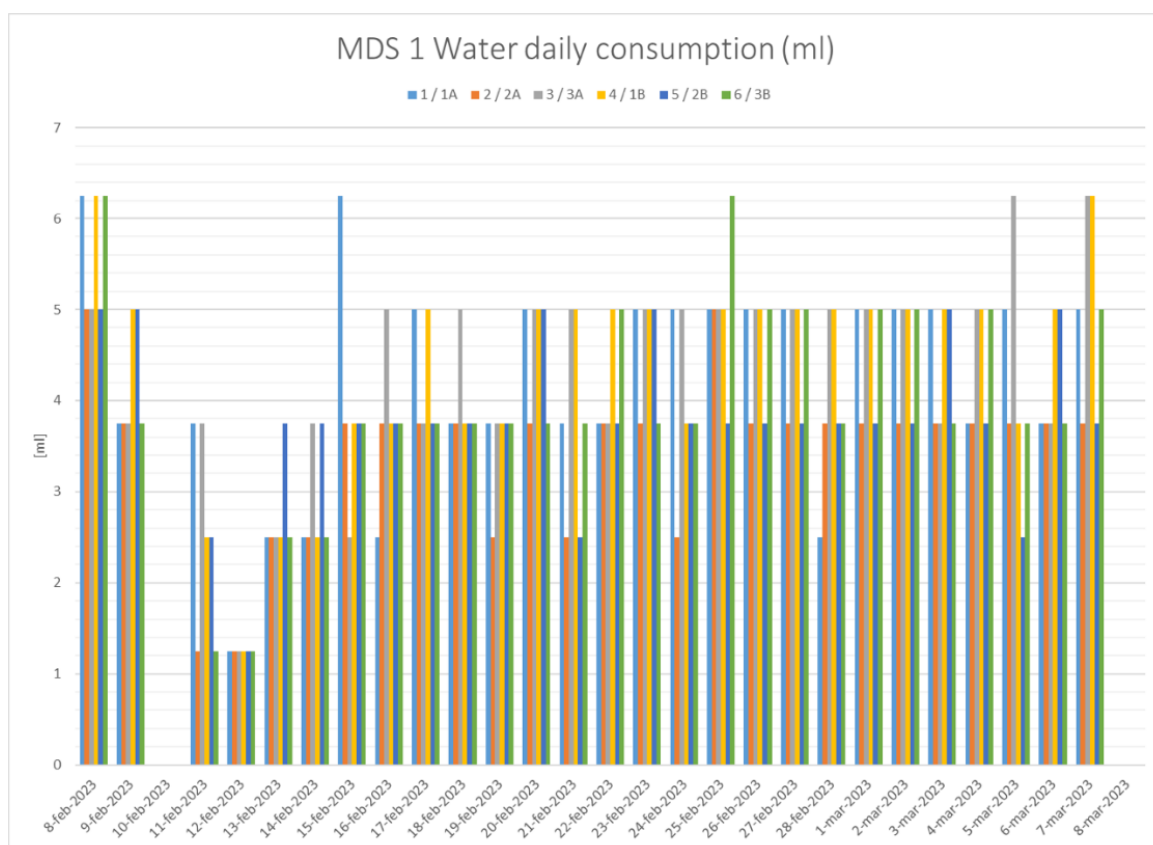


Figura 21. Andamento del consumo individuale d'acqua per i topi in MDS-1.

L'andamento del consumo di acqua nello stesso periodo dei topi in MDS-2 è risultato simile a quelli in MDS-1. Non c'è stato consumo per l'intera giornata a 2g, ma i giorni successivi è stato ripristinato. Solo il topo in gabbia numero 3 a partire dal diciassettesimo giorno ha incrementato il consumo di acqua fino a valori simili a quelli sulla terraferma e comunque superiori rispetto agli altri (figura 22).

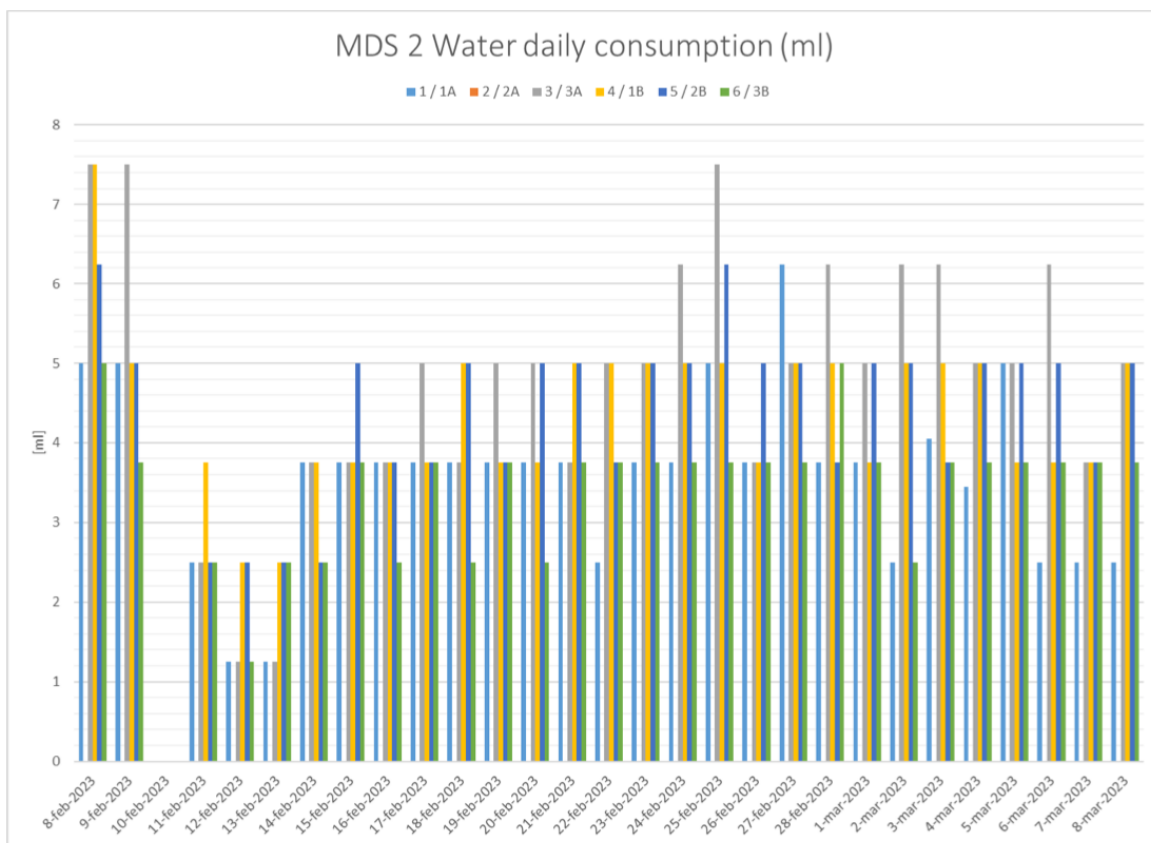


Figura 22. Andamento del consumo individuale d'acqua per i topi in MDS-2.

### 6.2.2. Variazione di peso

Sono state valutate le variazioni di peso di tutti gli animali utilizzati nello studio. Rispetto al peso iniziale degli animali misurato due giorni dopo l'inizio dello studio (11 gennaio 2023), si è registrato un aumento medio di peso del 3.99% per i topi in MDS-LDC, del 3,25% per gli animali da gabbia di addestramento MDS e del 9,92% per i topi in Vivarium.

Rispetto all'ultima misurazione di peso effettuata il 7 febbraio prima di essere inviati all'ESTEC, i topi soggetti a ipergravità hanno manifestato una diminuzione di peso di quasi l'11% nelle prime due settimane di studio, con un range compreso tra l'1,4 e il 21,3%, mentre per l'intera durata dello studio la variazione di peso è stata positiva: la maggior parte dei topi ha acquistato peso nelle seconde due settimane di studio a dimostrazione di un possibile adattamento alle condizioni di ipergravità (figura 23 e 24).

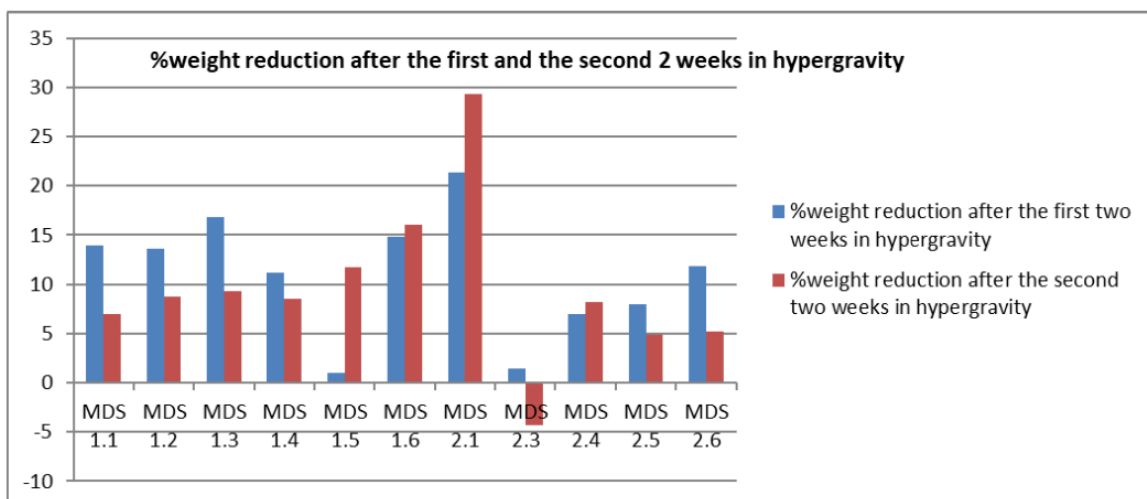


Figura 23. Variazione di peso percentuale nelle prime due settimane e nelle seconde due settimane in ipergravità.

Dal 24 febbraio al 8 marzo otto topi su undici hanno guadagnato peso, due hanno perso circa il 10% del peso corporeo e un topo circa l'1,5% (figura 24).

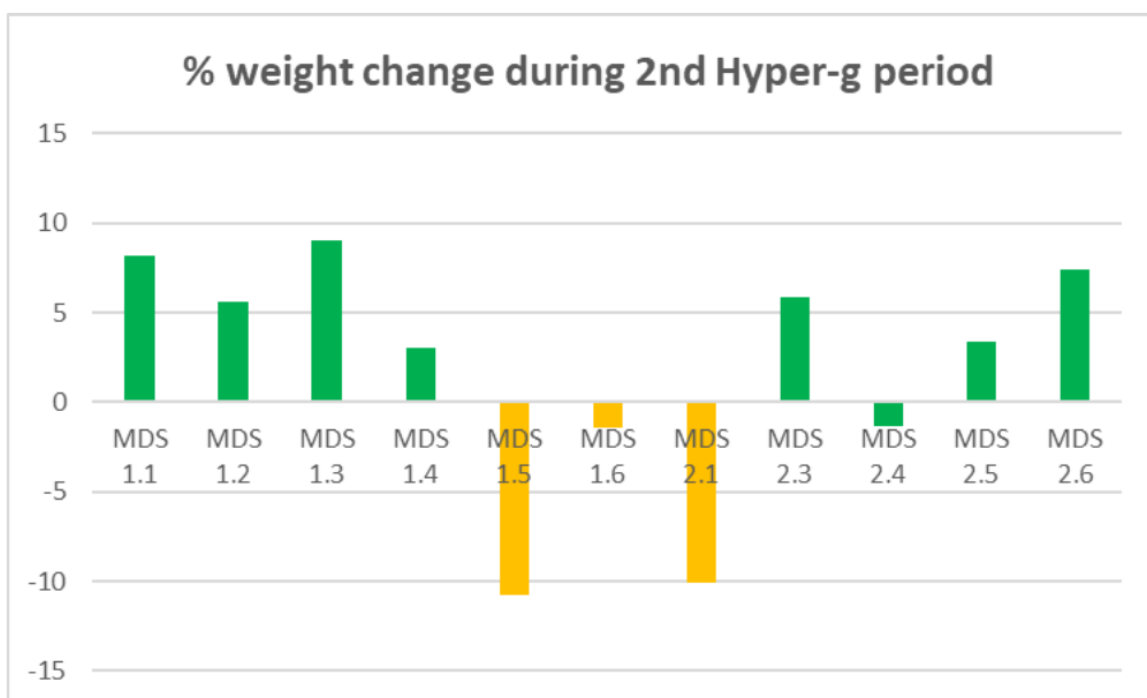


Figura 24. Variazione percentuale di peso dei topi in ipergravità dal 24/02/23 al 08/03/23.

Solamente il topo in MDS-2.1, dopo una riduzione di più del 20% ha continuato a perdere peso anche nel secondo periodo raggiungendo quasi il 30%, condizione rischiosa per la propria sopravvivenza e per questo motivo ritirato dallo studio.

I topi in MDS di controllo sono stati pesati il 2 febbraio e il 9 marzo al termine dello studio (figura 25). Dieci topi su dodici hanno aumentato il loro peso, per un solo topo è rimasto invariato e per un topo invece è diminuito meno del 2% (figure 25 e 26).

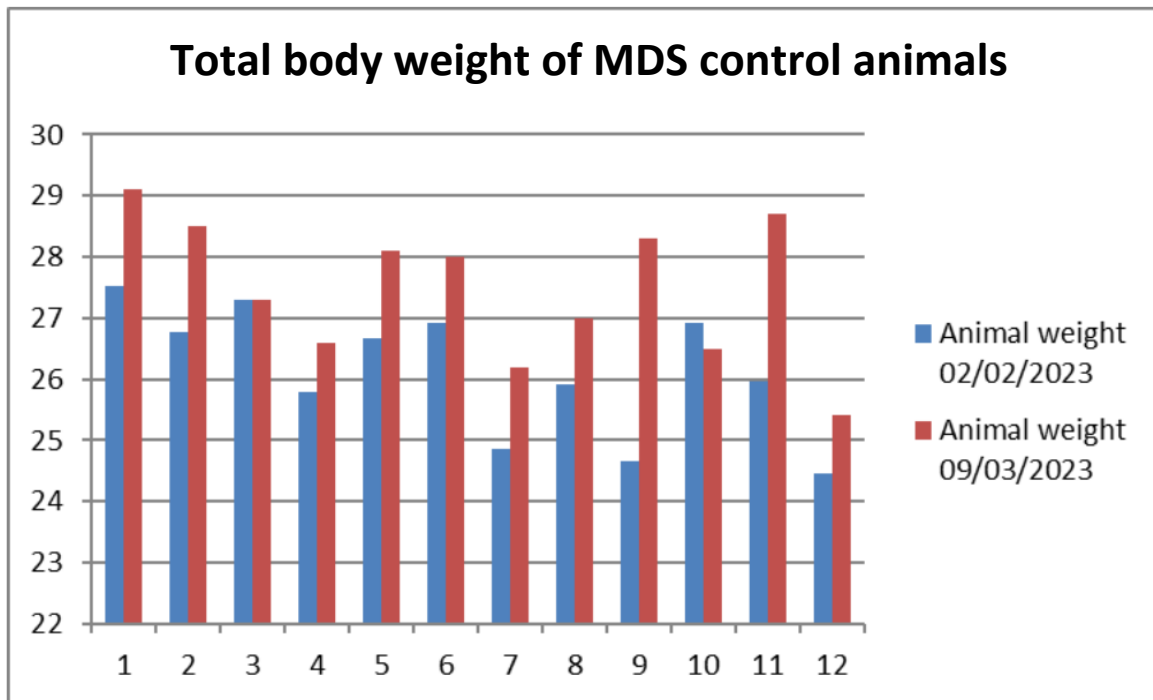


Figura 25. Peso dei topi in grammi in MDS di controllo al 02/02/23 e al 09/03/23.

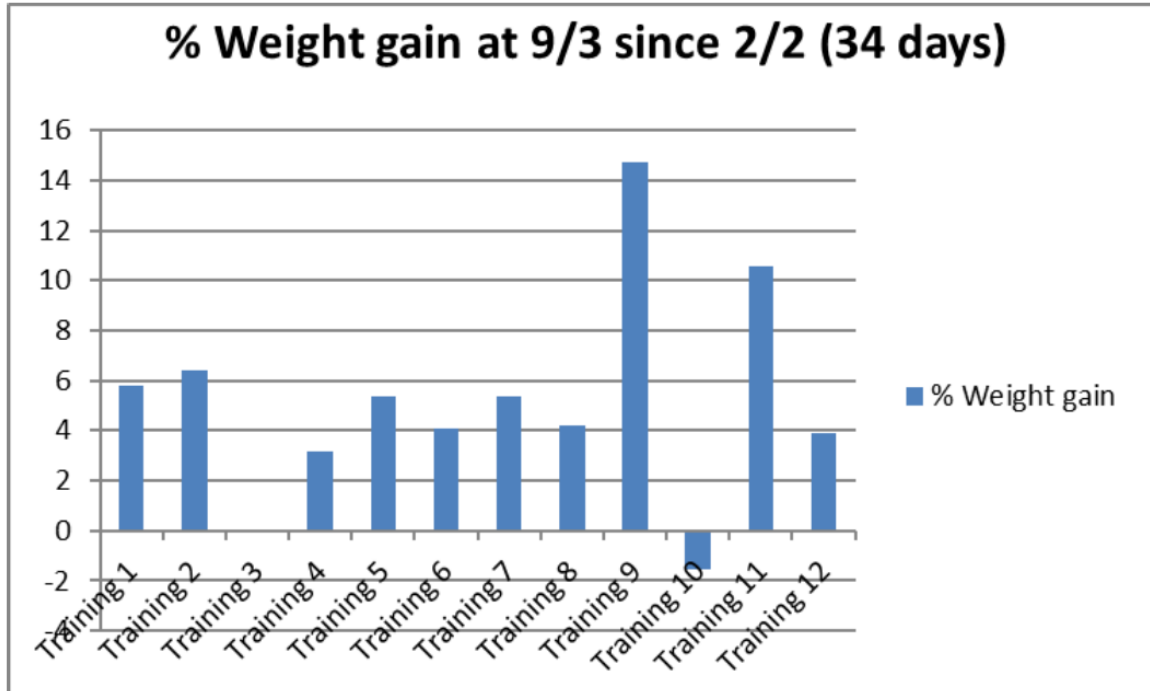


Figura 26. Percentuale di aumento di peso dei topi in MDS di controllo.

## 6.3. Variazioni dell'assetto proteico

### 6.3.1. Confronto tra Training Cage e 3G

Le proteine dimostrate statisticamente deregolate nel gruppo 3G rispetto al controllo Training Cage sono risultate 213. In seguito a *functional enrichment analysis* in Cytoscape e lo studio delle interazioni proteina proteina tramite piattaforma STRING, è risultato chiaro come molte di queste siano coinvolte in più pathway molecolari, in quanto 726 meccanismi di segnalazione cellulare si sono evidenziati come regolati diversamente rispetto al controllo. Ne sono un esempio i processi di risposta allo stress, la coagulazione sanguigna, la regolazione del sistema immunitario umorale e cellulo-mediata, l'attivazione del complemento, il metabolismo glucidico, lipidico, proteico e degli acidi nucleici, l'adesione cellulare, l'attivazione piastrinica, il rimodellamento osseo, la regolazione del citoscheletro e della matrice extracellulare, la risposta ormonale e il differenziamento cellulare. La lista è molto lunga e i meccanismi alla base di queste modificazioni sono da indagare più nel dettaglio, per questo motivo al fine di poter confrontare i risultati ottenuti con informazioni già note in letteratura ci siamo soffermati su quelli più significativi.

Nell'immagine successiva sono rappresentate mediante STRING le interazioni proteina-proteina delle molecole più rappresentative e maggiormente evidenziate in più pathway molecolari.

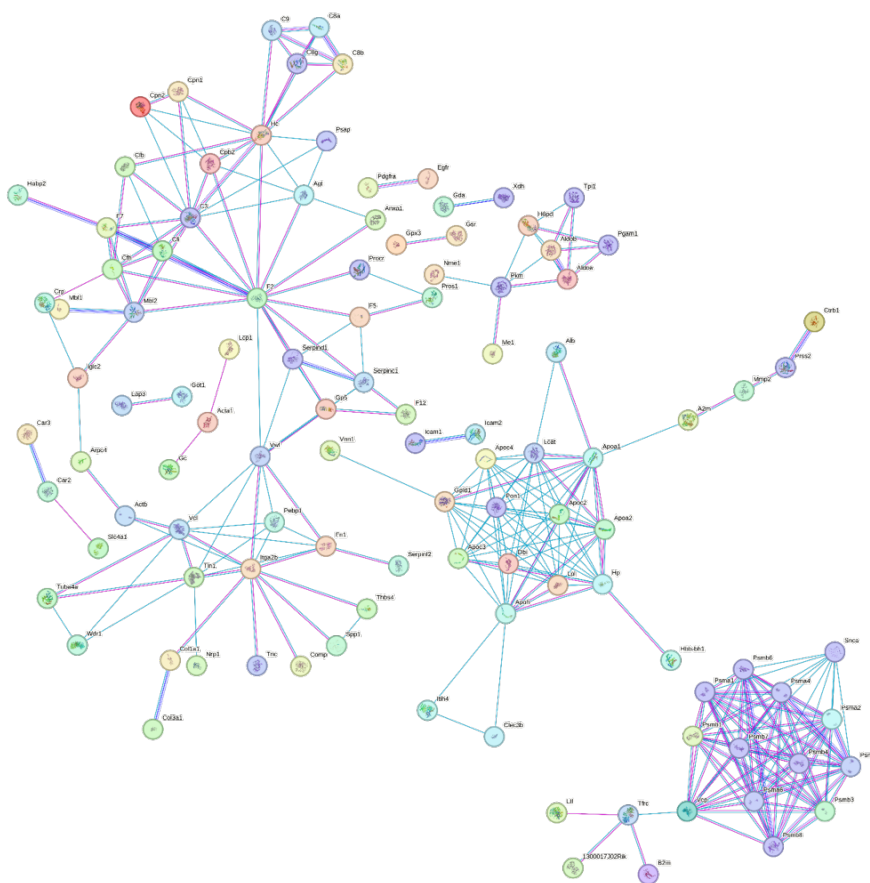


Figura 27. Analisi di interazione basata su STRING (v.12) delle proteine deregolate identificate dalla proteomica. I bordi rappresentano le interazioni proteina-proteina. Le linee blu rappresentano le interazioni note da database curati, mentre le linee rosa rappresentano le interazioni determinate sperimentalmente.



Le proteine più rilevanti hanno mostrato essere coinvolte nei pathway molecolari ottenuti dagli *enriched GO Biological processes terms* (forma a cerchio), dai percorsi KEGG (esagoni) e i percorsi Reactome (ottagoni).

Il termine/percorso più significativo di un gruppo è considerato il termine principale ed è evidenziato nella rete. Il colore dei nodi è proporzionale alla significatività dell'arricchimento (sono visualizzati solo i termini significativamente arricchiti  $p < 0,05$ ).

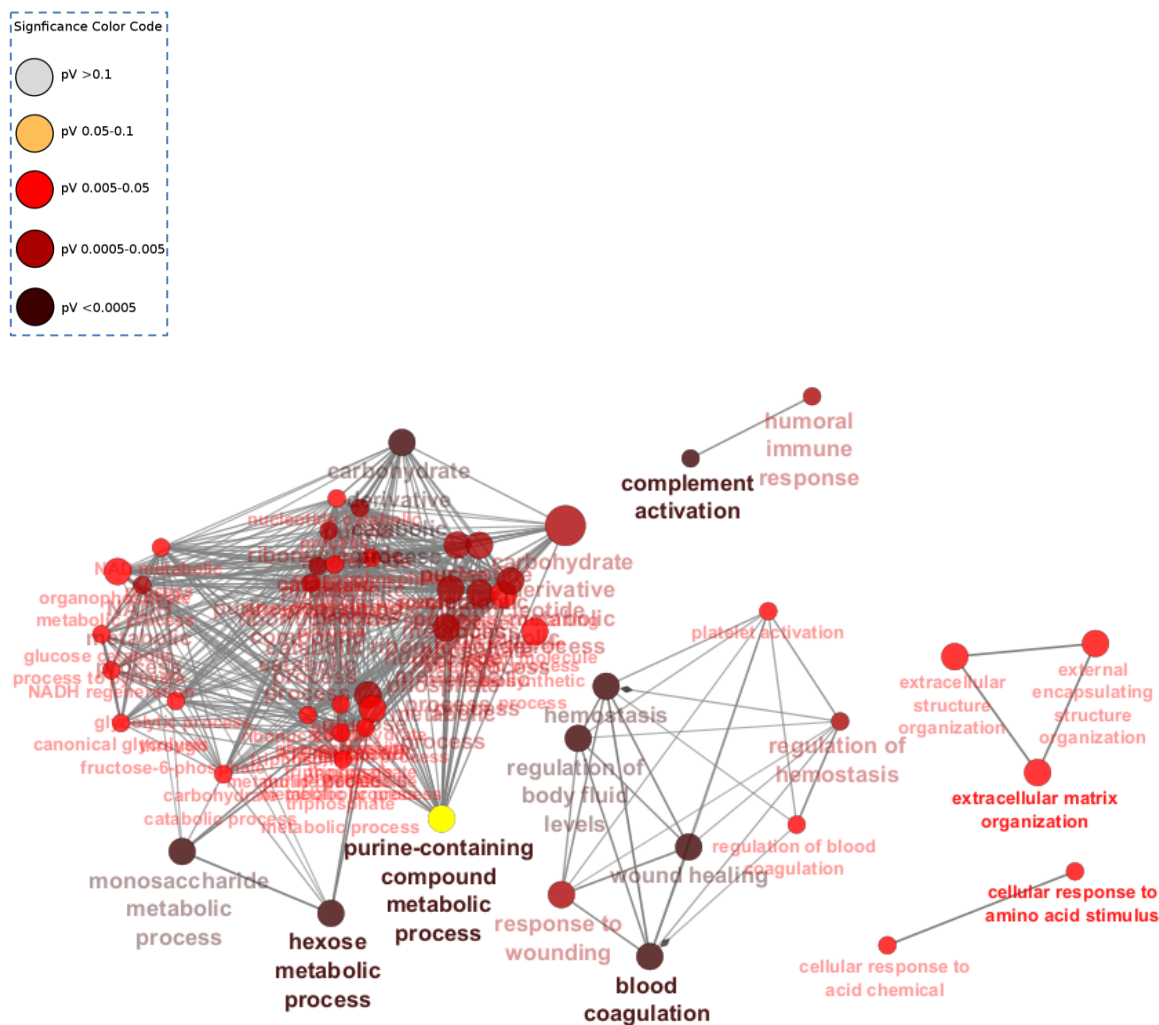


Figura 28. GO biological processes.

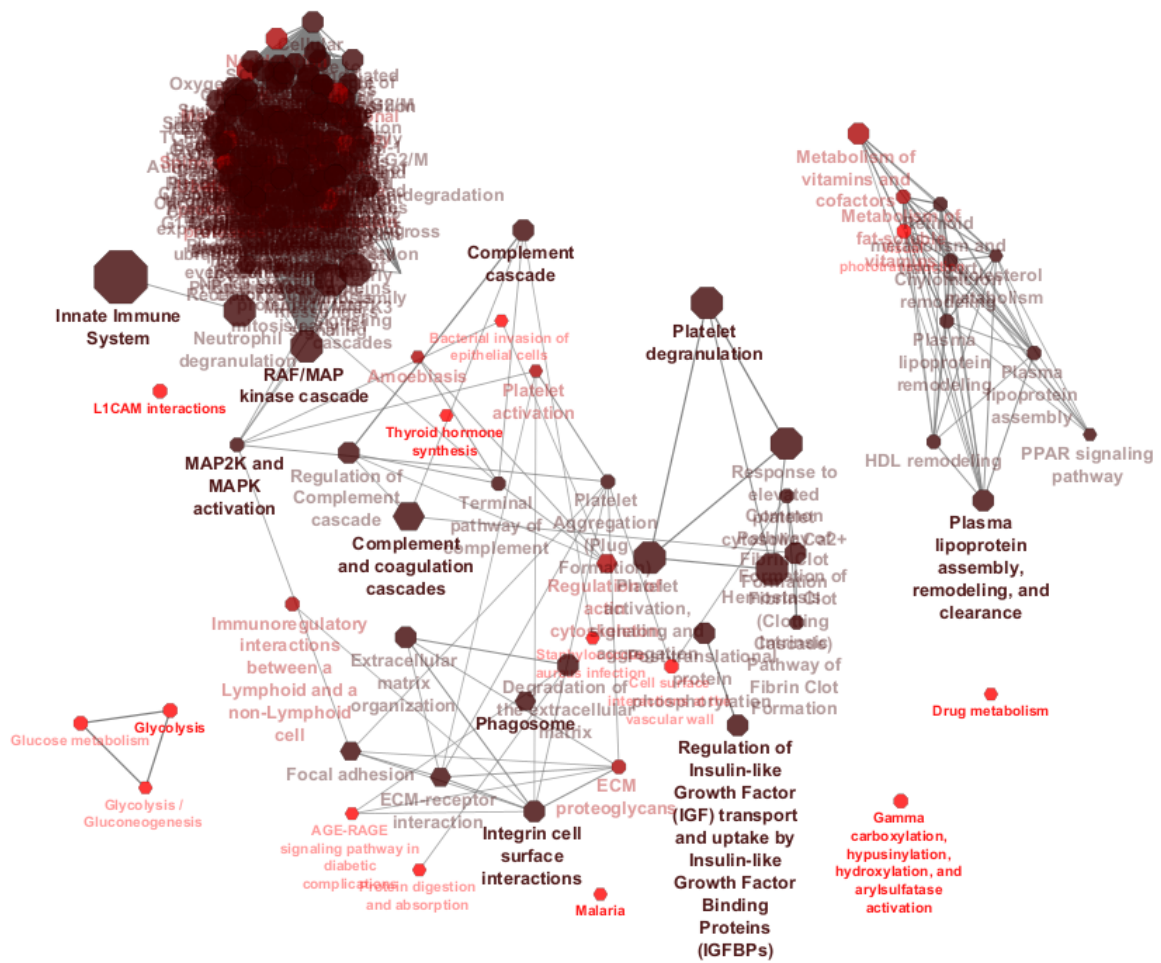


Figura 29. KEGG (esagoni) e REACTOME (ottagoni) pathways.

## 7. Discussione e conclusioni

### 7.1. Comportamento animale

Per due volte al giorno, al mattino e al pomeriggio, e per l'intera permanenza dei topi in LDC, sono stati controllati i parametri di assunzione d'acqua, di cibo, di temperatura e umidità e il comportamento di ogni singolo animale, con annotazione specifica in caso di variazioni [33].

A causa dello stress gravitazionale, i topi hanno bevuto a partire dal terzo giorno di esposizione, mentre la loro capacità di alimentarsi è rimasta invariata per tutta la durata dell'esperimento. Il monitoraggio quotidiano degli animali non ha rivelato alcuna difficoltà nel nutrirsi o bere attraverso il sistema MDS.

Il repertorio comportamentale specie-specifico è stato in gran parte conservato in ipergravità, con alcuni piccoli cambiamenti durante i primi due giorni di studio in cui gli animali hanno privilegiato comportamenti di riposo e con posture distese.

A partire dal terzo giorno, i topi hanno ripreso a toelettarsi (raramente si sono lavati il muso e si sono grattati) e hanno manifestato atteggiamenti perlustrativi camminando all'interno della gabbia, raramente si sono alzati lungo le pareti.

Come ci si aspettava, alcuni comportamenti come il rearing<sup>8</sup>, lo scavo e il bar hold sono stati quasi completamente soppressi durante questo primo periodo di rotazione.

Durante la seconda settimana di esposizione all'ipergravità, tutti i soggetti sperimentali si sono nutriti e hanno bevuto senza difficoltà attraverso il setup MDS. Tuttavia, sono state osservate differenze nella quantità di cibo o acqua consumata dagli animali: l'animale della gabbia 6 MDS-2 ha consumato meno acqua degli altri, mentre l'animale 4 dell'MDS-1 e l'1 e il 5 dell'MDS2 si sono nutriti leggermente meno durante gli ultimi giorni di osservazione.

Da un punto di vista comportamentale, i topi hanno mantenuto comportamenti di self care e hanno mostrato movimenti locomotori per brevi distanze nella gabbia, soprattutto da un angolo all'altro. È bene sottolineare che le azioni di nutrirsi e bere richiedono il mantenimento in piedi sugli arti posteriori a dimostrazione che l'ipergravità non influisce sui loro movimenti verticali.

Nel corso del breve periodo di interruzione della LDC del 24 febbraio per consentire il rifornimento di acqua e cibo e la pesatura degli animali, è stato notato che i topi mantenevano il capo leggermente inclinato, caratteristica non presente durante la rotazione a 3g. Questa variazione, probabilmente riconducibile a delle alterazioni del sistema vestibolare, è stata approfondita mediante la misurazione dettagliata delle dimensioni degli otoliti tramite indagini radiologiche con microtomografia computerizzata (microCT).

---

<sup>8</sup> Movimento di sollevamento sugli arti posteriori, appoggiando alla parete quelli anteriori.

Durante la terza settimana di esposizione all'ipergravità tutti gli animali hanno continuato a cibarsi e a bere senza differenze sostanziali rispetto i giorni precedenti. Hanno inoltre mantenuto l'attività di toelettatura e hanno incominciato a lavarsi il muso e a grattarsi.

I movimenti all'interno della gabbia sono stati rilevati soprattutto da un angolo all'altro o verso i sistemi di distribuzione del cibo o dell'acqua.

Senza considerare le azioni di alimentazione e abbeveraggio, i movimenti verticali di perlustrazione sono stati eseguiti raramente e comunque diretti principalmente verso le pareti della gabbia.

Nel corso della quarta e ultima settimana di esposizione all'ipergravità, i soggetti sperimentali hanno continuato a eseguire comportamenti specifici della specie e si sono nutriti e abbeverati ogni giorno.

Al termine dell'esperimento, mercoledì 8 marzo gli animali sono stati inviati presso l'Università di Leiden e prima di essere sacrificati per lo studio dei loro tessuti, i loro comportamenti sono stati osservati per 5 minuti dopo essere stati trasferiti all'interno di nuove gabbie con particolare attenzione ad eventuali modificazioni dei movimenti dovuti a cambiamenti del sistema dell'equilibrio.

Al termine dell'osservazione comportamentale, i topi sperimentali sono stati pesati. Mediamente è stata riscontrata una minore perdita di peso nella maggior parte dei topi in confronto ai primi 15 giorni di centrifuga con alcune eccezioni: gli animali 5 in MDS 1 e 1 in MDS 2 hanno incrementato la perdita di peso, mentre gli animali 6 in MDS1 e 4 in MDS 2 hanno mostrato una riduzione di peso simile alla precedente. Nel complesso i topi in MDS-LDC hanno aumentato il peso corporeo del 3.99%, risultato comparabile con quello per i topi in MDS di controllo (3,25%). L'aumento di peso dei topi in Vivarium è stato del 9,92%, probabilmente dovuto a un miglior confort degli animali nelle gabbie metaboliche.

Le videoregistrazioni settimanali degli animali di controllo hanno mostrato un profilo comportamentale tipico della specie, gli animali hanno bevuto e si sono nutriti, ma a causa delle registrazioni effettuate durante le fasi di luce diurna, i comportamenti spontanei registrati sono risultati molto limitati.

## 7.2. Proteomica plasmatica

Molte proteine deregolate fanno parte del complesso **sistema di risposta allo stress** [39]. Effettivamente il meccanismo predominante di generazione di ROS (specie reattive dell'ossigeno), tra cui l'anione superossido ( $O_2^-$ ), il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) e i radicali liberi come i radicali idrossilici ( $OH\cdot$ ) in condizioni di microgravità, sembra essere l'upregulation degli enzimi ossidativi (ad esempio, nicotinamide adenina dinucleotide fosfato (NADP+) ossidasi (NOX)) e la

downregulation degli enzimi antiossidanti, tra i quali la superossido dismutasi (SOD) e glutazione perossidasi (GP). In diversi studi, è stato riportato il rilevamento diretto di un aumento delle specie reattive dell'ossigeno o il rilevamento di sostanze prodotte da reazioni ossidative, il che implica che la produzione di sostanze ossidative aumenti nell'ambiente spaziale.

Sebbene le alterazioni indotte dalla microgravità siano maggiormente note, un aumento di produzione delle specie reattive dell'ossigeno è stato riscontrato anche nel cervello di modelli di *Drosophila melanogaster* esposte a ipergravità acuta (3g per 1 ora e 2 ore) rispetto ai campioni di controllo, dati supportati dai cambiamenti significativi nell'espressione dell'mRNA di specifici geni correlati allo stress ossidativo e alla difesa antiossidante [40].

L'ipergravità ha indotto un aumento di stress ossidativo sesso dipendente sul cervello di ratti in via di sviluppo, il quale a sua volta, può contribuire alla diminuzione del numero di cellule di Purkinje e all'alterazione del comportamento motorio [41].

Le cellule e gli organi maggiormente colpiti dalle condizioni pro-ossidative sono gli eritrociti, cellule endoteliali, retina, pelle, cervello, cellule neuronali, fegato e muscoli scheletrici. La generazione aumentata di anione superossido può anche portare a interazioni con l'ossido nitrico ( $\text{NO}\cdot$ ) per formare il perossinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), un potente pro-ossidante. Un eccessivo aumento di specie reattive dell'ossigeno che non viene controbilanciato dal fisiologico sistema antiossidante, sfocia in una serie di danni acellulari a carico principalmente delle proteine, dei lipidi e del DNA.

La perossidazione lipidica è stata osservata su una vasta gamma di aree del cervello, tra cui il tronco cerebrale, il cervelletto, la corteccia frontale, l'ippocampo e lo striato. Negli eritrociti, è stato osservato un aumento della perossidazione dei lipidi dopo il volo spaziale. Lo stress ossidativo è anche coinvolto nel processo di invecchiamento e svolge ruoli importanti nello sviluppo di malattie cardiovascolari tra cui ipertensione, ipertrofia ventricolare sinistra e infarto miocardico.

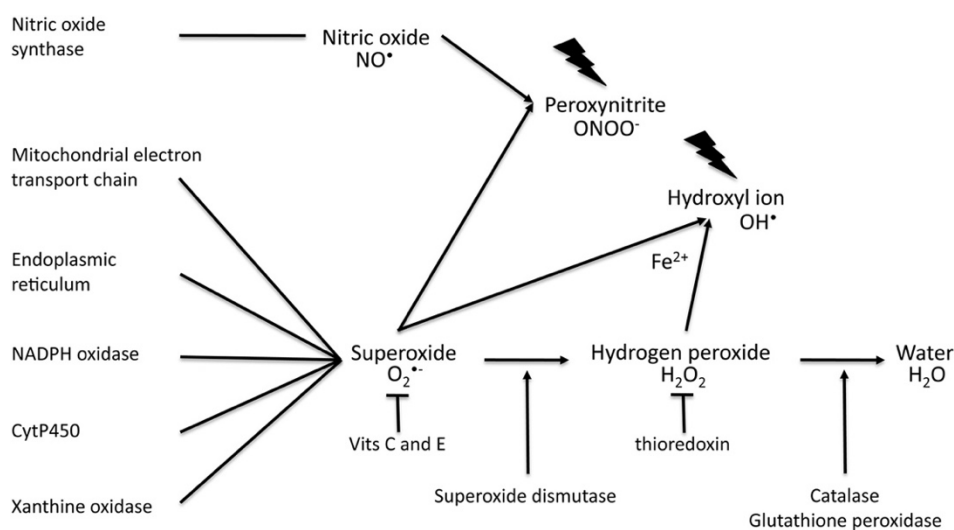


Figura 30. Generazione di specie reattive dell'ossigeno. Fonte: studio di Graham J. Burton MD et al, "Oxidative stress" [42].

A livelli omeostatici, i ROS hanno diverse azioni sulla funzione cellulare, compresa l'attivazione di fattori di trascrizione sensibili al redox e l'attivazione delle proteine chinasi [42].

Attivazione di fattori di trascrizione sensibili al redox, come AP-1, p53 e NF- $\kappa$ B regolano l'espressione di fattori pro-infiammatori e altre citochine, la differenziazione cellulare e l'apoptosi. In condizioni normali NF- $\kappa$ B è tenuto inattivo dal legame della sua subunità inibitoria I $\kappa$ B. Tuttavia, in condizioni di stress, I $\kappa$ B diventa fosforilato e si dissocia da NF- $\kappa$ B, che poi si trasloca nel nucleo e attiva l'espressione di citochine proinfiammatorie e di altre citochine. L'aumento della fosforilazione di I $\kappa$ B è osservato in espianti placentari sottoposti a ipossia-riossigenazione *in vitro*. L'attivazione della via è associata ad un aumento dei livelli tissutali dell'enzima proinfiammatorio COX-2, dell'interleuchina 1 $\beta$ , dell'aumento della secrezione di TNF- $\alpha$  e dell'attivazione della cascata apoptotica come evidenziato dalla scissione della caspasi 3. Tutti questi effetti possono essere bloccati con l'aggiunta di vitamine C, E o sulfasalazina, un inibitore dell'attivazione di NF- $\kappa$ B.

Con l'attivazione delle proteine chinasi, le cellule rispondono a una varietà di segnali extracellulari e stress attraverso una famiglia di chinasi proteiche attivate dal mitogeno (MAPK). Di questa famiglia, l'attivazione indotta da ROS delle chinasi regolate extracellulari (ERK1/2) generalmente promuove la sopravvivenza e la proliferazione cellulare, mentre la stimolazione di p38MAPK (p38) e delle proteine chinasi c-Jun aminochinasi terminali attivate dallo stress (SAPK-JNK) induce principalmente l'apoptosi. p38 e SAPK-JNK sono attivati dalla fosforilazione attraverso una chinasi a monte, chinasi del segnale 1 che regola l'apoptosi (ASK1). In condizioni normali ASK1 è tenuto inattivo legandosi alla tioredossina, ma l'anione superossido è in grado di ossidare i gruppi tiolici di quest'ultimo, portando a un cambiamento conformazionale e al suo rilascio. L'aumento della fosforilazione di p38, ma non di SAPK, si osserva nel termine placenta dopo il travaglio rispetto ai partecipanti di controllo consegnati per taglio cesareo. ASK1 è anche attivato negli espianti esposti all'ipossia-riossigenazione o al perossido di idrogeno ed è inibito dall'aggiunta di vitamine C ed E. L'attivazione è associata ad un aumento dei livelli del recettore solubile per il fattore di crescita endoteliale vascolare (sFlt-1), che è stato implicato nella patogenesi della pre-eclampsia. I livelli di sFlt-1 possono essere ridotti con l'aggiunta di vitamine C ed E, o inibitori della via p38. Possono anche essere ridotti con l'aggiunta di sulfasalazina, che indica notevoli interazioni e rinforzo reciproco tra le vie di segnalazione NF- $\kappa$ B e MAPK nella placenta.

Le risposte di cui sopra possono essere considerate come cambiamenti fisiologici adattivi alle alterazioni dell'ambiente volte a ripristinare l'omeostasi. Un attacco più grave da parte di ROS può portare a danni cellulari più estesi e irreparabili, con conseguente morte cellulare attraverso necrosi o apoptosi. Questi effetti più patologici sono mediati dall'apertura dei canali ionici, dalla perossidazione dei lipidi, dalle modifiche proteiche e dall'ossidazione del DNA.

Gli squilibri di ROS portano alla perdita dell'omeostasi intracellulare di Ca<sup>2+</sup>, con il rilascio di ioni Ca<sup>2+</sup> dal reticolo endoplasmatico e da altre riserve. La concentrazione di calcio all'interno del lumen ER è molto più alta che nel citosol (ordine delle millimoli), mantenuta da pompe appartenenti

alla famiglia delle ATPasi di calcio sarco e reticolo endoplasmatico ed è necessaria per il corretto funzionamento del macchinario di piegatura delle proteine. I ROS sono in grado di attivare i canali di rilascio del calcio nella membrana ER, che includono l'inositolo-1,4,5, recettore del trifosfato (IP3R) e il recettore della rianodina.

Il rilascio risultante di  $\text{Ca}^{2+}$  dall'ER attiverà diversi processi sensibili al  $\text{Ca}^{2+}$  all'interno della cellula, tra i quali la perdita di attività delle proteine chaperone che provocano a loro volta l'accumulo di proteine mal ripiegate all'interno del lume, portando a un'ulteriore generazione di ROS che stimolerà l'apoptosi.

L'aumento della concentrazione di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  citosolici influenzerà anche negativamente la funzione mitocondriale, tra cui un aumento della propria produzione di ROS e l'apertura del poro di transizione (Permeability Transition Pore Complex, PTPC). L'apertura di PTPC sulla membrana è promossa sinergicamente dall'aumento degli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  e dall'ossidazione dei gruppi tiolici delle proteine appartenenti alla membrana mitocondriale interna, provocando il collasso del potenziale di membrana e della sintesi di ATP. Se i mitocondri di tutta la cellula sono colpiti, le concentrazioni di ATP scendono precipitosamente, si perde l'omeostasi ionica e la cellula subisce necrosi primaria. Il coinvolgimento di un numero più limitato di organelli, o l'apertura transitoria del poro, può consentire l'ATP di essere mantenuto a livelli sufficienti a consentire invece l'apoptosi.

Lo stress ossidativo indotto dalla permanenza nell'ambiente spaziale ha un diretto effetto sul **tessuto osseo** [43]. Le specie reattive dell'ossigeno sono generate come normali sottoprodotti del metabolismo aerobico, di solito per perdita dalla catena di trasporto degli elettroni durante la fosforilazione ossidativa nei mitocondri. I ROS a concentrazioni più basse servono come molecole di segnalazione per attivare percorsi fisiologici specifici che controllano diversi processi vitali, mentre livelli elevati di ROS possono danneggiare proteine, lipidi e DNA, alla fine innescare lo stress ossidativo e portare alla morte cellulare. Il danno ossidativo alle macromolecole è stato dimostrato nell'eziologia di un'ampia varietà di malattie acute e croniche, tra cui l'osteoporosi.

L'aumento di ROS negli osteoblasti ne inibisce la differenziazione e favorisce così l'apoptosi cellulare, mediante l'attivazione del pathway intracellulare mediato da  $\beta$ -catenina e Tcf (famiglia dei fattori di trascrizione del fattore di cellule T) che induce l'attivazione del fattore di trascrizione Forkhead box O (FoxO). L'incremento di ROS causato dall'ambiente spaziale antagonista gli effetti scheletrici di Wnt/ $\beta$ -catenin/Tcf deviando la  $\beta$ -catenina da Tcf alla trascrizione mediata da FoxOs. L'attenuazione della via Wnt/ $\beta$ -catenin/Tcf porterà inevitabilmente a una diminuzione dell'osteogenesi.

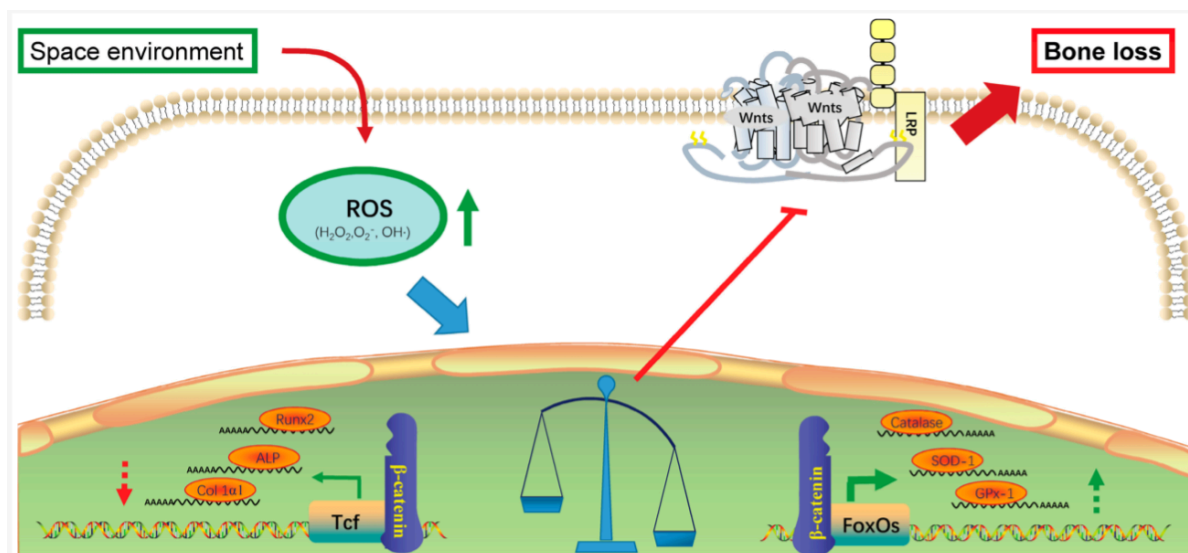


Figura 31. Schema del possibile meccanismo di riassorbimento osseo indotto da ROS.

Al contrario, i ROS svolgono ruoli cruciali nella differenziazione e nella funzione dell'osteoclasto. Aumentando la produzione dell'attivatore del recettore del ligando nucleare fattore-kappa B (RANKL) e attivando ERK/NF- $\kappa$ B/TNF/interleuchina 6, i ROS inibiscono l'apoptosi e promuovono la proliferazione dell'osteoclasto.

Inoltre, è stato riportato che RANKL potrebbe sopprimere l'attività trascrizionale di FoxOs promuovendo la differenziazione e la sopravvivenza degli osteoclasti, poiché l'accumulo intracellulare di  $H_2O_2$  è fondamentale per l'osteoclastogenesi e il riassorbimento osseo. Pertanto, i FoxO sono regolatori cruciali della fisiologia sia degli osteoblasti sia degli osteoclasti e collegano direttamente lo stress ossidativo all'involutione scheletrica.

Un'altra via correlata allo stress ossidativo comprende Nrf2/HO-1, che può anche regolare i ROS cellulari attraverso un interruttore sulla trascrizione genica di diversi enzimi antiossidanti come SOD, Catalasi e GPx. Anche la dinamica mitocondriale, la via dello stress del reticolo endoplasmatico e l'autofagia partecipano alla perdita ossea indotta dallo stress ossidativo.

Le condizioni di microgravità nello spazio causano uno squilibrio del processo omeostatico di ossificazione con un aumento di riassorbimento dell'osso a discapito del processo di deposizione di matrice ossea dovuto principalmente all'aumento di produzione di radicali liberi che provocano danno ossidativo. I risultati delle missioni spaziali reali o dei modelli a terra (random positioning machine e roditori con scarico degli arti posteriori (HLU)) hanno tutti dimostrato un aumento dei marcatori di danno ossidativo e un'attenuazione della capacità antiossidante totale.

Il tasso medio di perdita di densità minerale ossea (aBMD) è dell'1-1,5% al mese, valutato mediante scansioni DXA (dual-energy X-ray absorptionmetry) prima e dopo il volo.

Essendo il **citoscheletro** una delle strutture più importanti della cellula con lo scopo di mantenere la forma delle cellule stesse e di conseguenza dei tessuti, è anche una delle componenti più fortemente



influenzata dalle alterazioni gravitazionali. Molti studi si sono concentrati sugli effetti dell'ipergravità sul citoscheletro [44]. Grute et al. (1995) hanno sottoposto i fibroblasti dermici umani a gravità 1-20 g per 8 giorni, rilevando un riarrangiamento del citoscheletro in una struttura a forma di "stella" invece della normale morfologia rotonda, quando la gravità è superiore a 15 g. Inoltre si è verificata anche una riorganizzazione della tubulina per sostenere meglio il nucleo in condizioni di stress e un aumento della densità delle fibre collagene senza tuttavia influenzarne il numero. In un altro studio sono state evidenziate anche un ispessimento dei filamenti di actina, della fibronectina e della vinculina. Anche altri studi più recenti indicano l'aumento della densità delle fibre di actina, ma non del loro numero, anche in presenza di forze g basse (circa 5 g), risultati in linea con un recente studio condotto su cellule tendinee umane coltivate a 15-20 g per 16 ore.

Sebbene molti studi suggeriscano che il tasso di proliferazione cellulare non sia influenzato dall'aumento della gravità, in alcuni studi sono stati ottenuti risultati contrastanti. Gebken et al. (1999) hanno riportato una leggera riduzione (circa il 20%) del numero di cellule dopo l'incubazione a 13 g per un giorno, mentre Miwa et al. hanno riportato un aumento del tasso di proliferazione degli osteoblasti senza cambiamenti nella loro differenziazione se sottoposti a 5g, probabilmente mediato dalla segnalazione autocrina e paracrina della PGE<sub>2</sub>, come sostenuto da altri studi su osteoblasti e cellule endoteliali.

È stato inoltre dimostrato che l'ipergravità influisce significativamente sulla sintesi di collagene. Gebken et al. (1999) hanno riscontrato un aumento significativo dei livelli di mRNA del collagene tipo Ia<sub>2</sub> in 13 g, mediato da un aumento della fosforilazione della p44/42 MAP-chinasi (ERK1/2). Inoltre, è stato dimostrato che l'attività di trascrizione della lisina idrossilasi e della lisina ossidasi, enzimi fondamentali nella sintesi e nella reticolazione del collagene, aumenta in condizioni di 20 g. Van Loon et al. nel 1995 hanno osservato che l'aumento dello stress ha determinato un aumento della mineralizzazione e del rilascio di calcio in colture in vitro delle ossa lunghe di topi fetali.

Come componente intrinseca del sistema muscolo-scheletrico, anche i mioblasti sono influenzati dall'ipergravità. Uno studio condotto sui mioblasti dei topi ha evidenziato un aumento dell'espressione della miosina e, di conseguenza, del tasso di differenziazione dei mioblasti a 20 g.

Secondo la Legge di Wolff i cambiamenti nella forma e nella funzione delle ossa sono seguiti da cambiamenti nell'architettura interna dell'osso e nel suo aspetto esterno. Le ossa, così come i muscoli e i tendini, hanno la capacità intrinseca di adattarsi al carico a cui sono sottoposte, effetti che sono stati evidenziati su molti studi in vivo condotti prevalentemente sui topi.

Un esperimento condotto da Vico et al. nel 1999 ha evidenziato un aumento della massa ossea, in particolare dell'osso trabecolare nella metafisi tibiale, nei ratti dopo la centrifugazione a 2 g per 4 giorni. Più recentemente, anche Ikawa et al. (2011) hanno dimostrato un aumento della densità minerale ossea nell'osso trabecolare di ratto in condizioni di ipergravità di circa 3 g, attraverso una riduzione sia del riassorbimento che della formazione ossea, come indicato dalle analisi biochimiche e istomorfometriche. Anche i dati dello studio di Canciani et al. del 2015 suggeriscono che

l'esposizione a lungo termine (di circa 3 mesi) a 2 g determina un aumento della formazione e della mineralizzazione ossea. Tuttavia, Gnyubkin et al. (2015) hanno suggerito un intervallo di sicurezza tra 2 e 3 g, poiché dopo una lunga esposizione (di circa 20 giorni) in un ambiente di 3 g è stato osservato un assottigliamento corticale, una ridotta formazione ossea e un aumento della funzione degli osteoclasti. Infine, uno studio sull'uomo condotto su piloti di volo ha indicato che anche le forze gravitazionali tra 2 e 6 g possono aumentare la BMD in modo specifico per ogni regione.

Come accennato nell'introduzione, anche il **sistema immunitario** risulta fortemente coinvolto nelle alterazioni indotte dalla variazione dell'accelerazione di gravità terrestre, sebbene diversi studi abbiano riscontrato che disregolazioni immunitarie dipendevano dal livello di gravità [15].

Inoltre, come evidenziato dalle interazioni GO process, KEGG e Reactome, anche il **sistema del complemento** risulta fortemente deregolato, in quanto componente essenziale del sistema immunitario umorale che coadiuva l'eliminazione di patogeni, ma partecipa anche ai processi di maturazione sinaptica, all'eliminazione degli immunocomplessi, meccanismi di angiogenesi, mobilitazione dei progenitori delle cellule staminali emopoietiche, rigenerazione dei tessuti e metabolismo lipidico. In particolare, si è rivelato essenziale durante il processo di neurulazione e di migrazione delle cellule della cresta neurale durante lo sviluppo embrionale dei vertebrati.

Il ruolo della proteina C3, elemento cardine su cui convergono le vie di attivazione classica, lectinica e alternativa, è stato indagato in condizioni di ipergravità e microgravità, così come in condizioni di stress ambientale indotto da alterati cicli circadiani, radiazioni, isolamento e vibrazioni. Gli studiosi hanno riscontrato che l'ipergravità aumenta l'espressione della proteina C3 murina e simulazione di radiazioni spaziali o la combinazione di microgravità simulata e buio influiscono sulla quantità di proteine C3 nelle larve di *P. waltl* (un anfibio). I livelli di mRNA e proteine umani e murini sono aumentati in seguito a radioterapia mentre l'inclinazione del letto a testa in giù, utilizzata per simulare l'assenza di gravità, non modifica la concentrazione plasmatica del fattore C3 del complemento umano e che la privazione del sonno non influisce sulla fluttuazione circadiana delle concentrazioni plasmatiche di C3 e C4 umane [45].

Il sistema del complemento inoltre svolge un ruolo chiave nel ridurre il processo infiammatorio indotto da ROS. È stato anche dimostrato che i ROS stessi attivano il sistema del complemento inducendo protezione contro lo stress ossidativo da volo spaziale, meccanismo che potrebbe spiegare l'aumento dei meccanismi antinfiammatori nei modelli murini. La produzione di C3 è stata dimostrata essere influenzata anche dalla sintesi delle *heat shock proteins (HSPs)*, la cui espressione è condizionata dal volo spaziale, in tumori trattati con terapia fotodinamica. Si tratta di una famiglia ampia di proteine sintetizzate dalle cellule in condizioni di stress come i processi fisiologici di crescita e differenziamento con lo scopo di proteggere le cellule stesse da stimoli potenzialmente letali, inclusi quelli di tipo termico e chimico. Sono stati trovati infatti siti di legame per le HSPs nei promotori del C3 nell'uomo, nel topo e nel ratto e data la conservazione del C3 nei vertebrati, è molto probabile che anche il promotore del gene C3 di *P. waltl* contenga tali siti di legame.

In conclusione, si può affermare che l'ingresso dell'umanità nell'era spaziale, avvenuto nella seconda metà del XX secolo, ha trasformato completamente il modo in cui percepiamo la gravità. L'aumento del numero di missioni spaziali con equipaggio ha permesso di studiare con più facilità gli effetti di un campo gravitazionale alterato sulla fisiologia umana, evidenziando le molteplici variazioni indotte dalla microgravità, a cui gli astronauti sono esposti durante i voli spaziali. Per comprendere però a pieno lo sviluppo e i cambiamenti fisiologici che si verificano negli esseri viventi, è necessario sottoporre i campioni anche a condizioni di ipergravità. Attualmente si studiano soprattutto valori bassi di gravità (1-10 g), in quanto più rilevanti per il ritorno degli astronauti sulla Terra, tuttavia l'esposizione di cellule umane in condizioni di gravità estrema potrebbe far luce sul modo in cui le cellule si comportano in tali condizioni, ma anche sul meccanismo di adattamento utilizzato da cellule e organismi. La delucidazione degli effetti dell'ipergravità potrebbe anche suggerire possibili metodi terapeutici per la gestione delle alterazioni della fisiologia ossea indotte dalla microgravità durante le missioni di volo spaziale o nell'ambito dell'osteoporosi negli anziani, così come le alterazioni del sistema immunitario in ambito oncologico o in presenza di malattie autoimmuni. Tuttavia, i dati disponibili nella letteratura attuale sono piuttosto variabili e il disegno di ogni studio, in termini di forza gravitazionale raggiunta e di durata dell'esposizione delle colture cellulari o dei soggetti in esame, è praticamente unico, rendendo molto difficile il confronto tra di essi e la letteratura scientifica.

## 8. Bibliografia e sitografia

- [1] L. S. S. G. P. -. Cuneo, «L'uomo e le stelle,» [Online]. Available: [https://liceocuneo.it/ipertesti/1%27uomo-e-le-stelle/aree\\_disciplinari/storica/storia/civilta/osservazione\\_del\\_cielo\\_durante\\_la\\_preistoria.htm](https://liceocuneo.it/ipertesti/1%27uomo-e-le-stelle/aree_disciplinari/storica/storia/civilta/osservazione_del_cielo_durante_la_preistoria.htm).
- [2] L. Robles, E la filosofia scoprì l'America. Incontro scontro tra filosofia europea e culture precolombiane, editoriale Jaca Book, 2003.
- [3] Treccani, «Astronautica,» [Online]. Available: <https://www.treccani.it/enciclopedia/astronautica/>.
- [4] U. Guidoni, «Agenzia Spaziale Italiana,» [Online]. Available: [https://www.asi.it/wp-content/uploads/2019/07/3-Terzo-Capitolo-LISS\\_-\\_ISS.pdf](https://www.asi.it/wp-content/uploads/2019/07/3-Terzo-Capitolo-LISS_-_ISS.pdf).
- [5] Treccani, «Esplorazione dello spazio,» Treccani, [Online]. Available: <https://www.treccani.it/enciclopedia/esplorazione-dello-spazio/>.
- [6] S. U. S. S. Pisa, «santannapisa.it,» [Online]. Available: <https://www.santannapisa.it/it/news/medicina-da-assenza-di-gravita-e-ipergravita-indicazioni-prevenire-e-curare-malattie-sulla>.
- [7] D. H. R. Resnick, Fisica, Milano: Casa editrice Ambrosiana, Seconda edizione italiana, 1970.
- [8] Zanichelli, «La forza di gravità sulla Terra,» [Online]. Available: [https://online.scuola.zanichelli.it/phelanpignocchino-files/17208\\_PHELAN-Terra\\_pag%2044.pdf](https://online.scuola.zanichelli.it/phelanpignocchino-files/17208_PHELAN-Terra_pag%2044.pdf).
- [9] T. T. e. al, «Hypergravity and microgravity exhibited reversal effects on the bone and muscle mass in mice,» 29 April 2019. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31036903/>.
- [10] B. Dechaumet, «Hypergravity as a gravitational therapy mitigates the effects of knee osteoarthritis on the musculoskeletal system in a murine model,» *PLoS One*, 2020.
- [11] C. L. e. al, «Alteration of calcium signalling in cardiomyocyte induced by simulated microgravity and hypergravity,» *Cell Proliferation*, vol. Vol. 53, n. N. 3, 2020.
- [12] C. E. Wade, «Responses across the Gravity Continuum: Hypergravity to Microgravity,» *Advances in Space Biology and Medicine*, vol. Vol. 10, pp. Pag. 225-245, 2005.
- [13] S. Z. e. al, «Effects of Hypergravity on Osteopontin Expression in Osteoblasts,» *PLoS One*, 2015.
- [14] V. G. e. al, «PubMed, "Effects of chronic hypergravity: from adaptive to deleterious responses in growing mouse skeleton",» 15 October 2015. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26228999/>.
- [15] N. G. e. al, «"Stress response and humoral immune system alterations related to chronic hypergravity in mice",» *ScienceDirect*, 2012.
- [16] M. J. P. e. al, «"Hypergravity-induced immunomodulation in a rodent model: hematological and lymphocyte function analyses",» *Journal of Applied Physiology*, 2004.
- [17] J. S. I. Orna Goldstein, «The white blood cell line: changes induced in mice by hypergravity,» *Advances in Space Research*, vol. Vol. 21, n. n. 8-9, pp. Pag. 1333-1343, 1998.
- [18] T. Y. J. e. al, «Hormetic Effect of Chronic Hypergravity in a Mouse Model of Allergic Asthma and Rhinitis,» *Nature*, 2016.
- [19] R. T. e. al, «"Hypergravity Provokes a Temporary Reduction in CD4+CD8+ Thymocyte Number and a Persistent Decrease in Medullary Thymic Epithelial Cell Frequency in Mice",» *PLoS One*, 2015.
- [20] N. K. e. al, «PubMed "Effects of hypergravity on gene levels in anti-gravity muscle and bone through the vestibular system in mice",» September 2018. [Online]. Available:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28884429/>.
- [21] N. K. e. al, «PubMed, "The vestibular system is critical for the changes in muscle and bone induced by hypergravity in mice",» October 2016. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27697847/>.
- [22] S. S. e. al, «ScienzeDirect,» July 2018. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0196978118301025?via%3Dihub>.
- [23] V. B. e. al, «"The importance of gravity vector on adult mammalian organisms: Effects of hypergravity on mouse testis",» *PLoS One*, 2023 Sep 29.
- [24] O. I. e. al, «"Sperm Motility of Mice under Simulated Microgravity and Hypergravity",» *International Journal of Molecular Sciences*, 2020.
- [25] I. V. O. e. al, «Sperm Motility of Mice under Simulated Microgravity and Hypergravity,» *International Journal of Molecular Sciences*, 2020.
- [26] D. D. e. al, «"Effects of centrifugation and whole-body vibrations on blood–brain barrier permeability in mice",» *Nature*, 2020.
- [27] D. D. e. al, «"Hypergravity Increases Blood–Brain Barrier Permeability to Fluorescent Dextran and Antisense Oligonucleotide in Mice",» *Cells*, 2023.
- [28] R. Vittori, «Cellule e Spazio,» *ASI*, 2019.
- [29] D. Hagemester, «Agenzia Spaziale Italiana,» 15 ottobre 2019. [Online]. Available: [https://agenda.infn.it/event/21982/attachments/70824/88571/Doreen\\_Hagemester\\_-\\_Effetti\\_della\\_microgravita.pdf](https://agenda.infn.it/event/21982/attachments/70824/88571/Doreen_Hagemester_-_Effetti_della_microgravita.pdf).
- [30] M. e. a. David P. Steensma, «Abbie Lathrop, the “Mouse Woman of Granby”: Rodent Fancier and Accidental Genetics Pioneer,» *Mayo Clinic Proceedings*, vol. 85, n. 11, p. E83, November 2010.
- [31] T. J. Laboratory, «The Jackson Laboratory,» [Online]. Available: <https://www.jax.org/strain/000665>.
- [32] J. J. v. Loon e e. al, «The European Space Agency,» 14 May 2019. [Online]. Available: [https://esamultimedia.esa.int/docs/edu/LDC\\_Experimenter\\_User\\_manual\\_V.3\\_Rev.0\\_14-May-2019\\_ESA-TECMMG-MAN-014129.pdf](https://esamultimedia.esa.int/docs/edu/LDC_Experimenter_User_manual_V.3_Rev.0_14-May-2019_ESA-TECMMG-MAN-014129.pdf).
- [33] «4th report MDS-LDC study,» 2023.
- [34] R. Cancedda e e. al, «Plos One,» 29 May 2012. [Online]. Available: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0032243>.
- [35] O. Scientific, «Orchid Scientific,» [Online]. Available: <https://orchidscientific.com/product/rat-cage/>.
- [36] G. S. e. al, «Triphenylphosphonium-Conjugated Palmitic Acid for Mitochondrial Targeting of Pancreatic Cancer Cells: Proteomic and Molecular Evidence,» 20 June 2024. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11203427/>.
- [37] G. B. C. a. ELIXIR, «STRING,» 2023. [Online]. Available: <https://string-db.org>.
- [38] C. D. C. e. al, «Integrated lipidomics and proteomics reveal cardiolipin alterations, upregulation of HADHA and long chain fatty acids in pancreatic cancer stem cells,» *Nature*, 2021.
- [39] K. T. e. al, «Effect of Oxidative Stress on Cardiovascular System in Response to Gravity,» *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 18, n. 7, p. 1426, 2017.
- [40] S. B. e. al, «Altered Gravity Induces Oxidative Stress in *Drosophila melanogaster*,» 10 novembre 2015. [Online]. Available: <https://ntrs.nasa.gov/citations/20160001641>.
- [41] E. M. S.-S. e. al, «Potential role of oxidative stress in mediating the effect of altered gravity on the developing rat cerebellum,» *Advance in Space Research*, vol. 40, n. 9, pp. 1414-1420, 2009.
- [42] G. J. B. M. e. al, «Oxidative stress,» *Best Practice & Research Clinical. Obstetrics & Gynaecology*, vol. 25, n. 3, pp. 287-299, june 2011.

- [43] Y. T. e. al, «The Impact of Oxidative Stress on the Bone System in Response to the Space Special Environment,» *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 18, n. 10, p. 2132, 2017.
- [44] C. A. e. al, «Hypergravity and its effects on bones and the musculoskeletal system: a narrative review,» *Journal of Research and Practice on the Musculoskeletal System*, november 2018.
- [45] N. G. e. al, «Modulation of Iberian Ribbed Newt Complement Component C3 by Stressors Similar to those Encountered during a Stay Onboard the International Space Station,» *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, n. 7, p. 1579, april 2019.
- [46] Y. S. o. Medicine, «Proteomics,» 3 March 2022. [Online]. Available: <https://medicine.yale.edu/keck/proteomics/technologies/proteinprofiling/lfq/>.
- [47] K. B. R. Laboratory, «Yale School of Medicine,» 3 March 2022. [Online]. Available: [https://medicine.yale.edu/keck/proteomics/technologies/proteinprofiling/application\\_note\\_5\\_lfq\\_173267\\_284\\_4009\\_v2.pdf](https://medicine.yale.edu/keck/proteomics/technologies/proteinprofiling/application_note_5_lfq_173267_284_4009_v2.pdf).
- [48] G. B. e. al, «ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks,» *Bioinformatics*, vol. Vol. 25, n. Issue 8, p. Pag. 1091–1093, April 2009.