

1. L'endotelio riveste tutti i vasi, linfatici e non e proprio la sua localizzazione all'interfacie fra torrente circolatorio e tessuti sottesi ne spiega alcune sue peculiarità. Infatti, come un Giano bifronte, l'endotelio è esposto alle variazioni di 2 microambienti
2. come un dispositivo input-output l'endotelio accumula, rielabora ed integra in una risposta non lineare una serie di informazioni che traduce cambiando morfologia, l'espressione di molecole e/o la loro distribuzione.
3. paradossalmente, l'endotelio, che è quiescente, è realmente sempre attivo, sempre vigile, non attivato ad è estremamente plastico e dinamico
4. per mantenere la propria omeostasi, non diventare attivato o addirittura disfunzionale e quindi non partecipare ad una pletora di patologie che vanno dall'infiammazione alle patologie autoimmuni al tumore
5. ho detto che l'endotelio integra le informazioni in maniera non lineare. Infatti, la risposta endoteliale non è mai tutto/niente ma si esprime potenzialmente in uno spettro di risposte che pertanto non sono mai né prevedibili né stereotipate.
6. ancora, data la sua localizzazione l'endotelio incontra molti microambienti che ne determinano l'eterogeneità morfologica/strutturale e funzionale: sappiamo che la barriera emato encefalica è impermeabile, mentre i capillari renali sono fenestrati ed i vasi tumore associati hanno caratteristiche uniche. Ed influenza anche la risposta ai farmaci.
7. Per il nostro studio abbiamo utilizzato HUVEC primarie, perché messe in coltura possono mimare il microambiente/fisiopatologia originale, con l'aggiunta di terreni condizionati e di altri tipi cellulari e perché la loro morfologia in vitro ben ricapitola quella descritta in vivo,

PERTANTO; LA POSSIBILITA' DI INIBIRE l'attivazione endoteliale E/O RICONDURRE L'ENDOTELIO VASCOLARE ALLA QUIESCENZA, PUÒ rappresentare UNA INTERESSANTE STRATEGIA TERAPEUTICA

12. L'ambiente ipossico è tratto comune a molte patologie e la risposta cellulare all'ipossia è molto ben conservata e mediata dall'hypoxic inducible factor HIF . Nell'endotelio, la traslocazione di HIF induce la trascrizione di geni che conducono all'angiogenesi alla generazione di ROS che a loro volta attivano l'endotelio, rompendo la continuità di barriera
13. La cellula endoteliale è un fine sensore delle fluttuazioni di O₂ e noi abbiamo dimostrato che coltivando le cellule in ambiente ipossico, o in presenza di mimetici dell'ipossia, viene ingaggiata una risposta che risulta in angiogenesi ed aumentata espressione del recettore del glucosio
14. facendoci concludere che l'attivazione di HIF contribuisce allo switch angiogenico e come conclusione generale che HIF media una risposta cellulare adattativa che permette alla cellula di sopravvivere anche in carenza di O₂
- 22 HUVEC ed ECV coltivate in vitro per 24 ore con concentrazioni crescenti di CF non vanno incontro a morte, come risulta da analisi citofluorimetrica con annessina e PI. A supporto di ciò, le cellule crescono in aderenza, voglio sottolineare che quando perdono aderenza al substrato le cellule endoteliali vanno incontro a morte, i nuclei non sono picnotici e le cellule crescono fino al raggiungimento della confluenza
- 23 Abbiamo misurato la capacità respiratoria utilizzando l'elettrodo di Clark modificato da Alessandro Fulgenzi, per adattarlo a cellule che crescono in aderenza. Dopo pochi minuti di respirazione, veniva aggiunti CF e veniva monitorato il consumo di O₂, espresso come percentuale di ossigeno consumato. L'aggiunta di CF migliora la capacità respiratoria e va in parallelo con l'attività mitocondriale, apprezzata al microscopio confocale, che viene conservata nel tempo. Veniva anche misurata la capacità respiratoria di cellule coltivate in vitro per 8 giorni in presenza/assenza di CF aggiunto in dose progressive, come suggerito

dalla casa ed indicato dal diagramma. Ai tempi indicati, veniva misurato il consumo di ossigeno per 15min, che migliorava nel tempo. Ancora, i mitocondri sono perfettamente funzionali.

- 24 Come dimostrato dalla dia successiva, in cui la produzione di ATP viene conservata, in alcuni punti addirittura migliorata rispetto al controllo. Non si assiste alla produzione di acido lattico, prodotto della glicolisi, facendo pensare allo shift metabolico verso la respirazione mitocondriale
- 25 In ambiente ipossico come agisce CF? Come atteso, in ipossia c'è produzione di ROS, misurate come incremento rispetto al controllo; tale incremento è abrogato dall'aggiunta di CF. Il dato quantitativo è confermato dall'analisi citofluorimetrica. Per comprendere il meccanismo abbiamo preso in considerazione l'attività di MNSOD mitocondriale . L'analisi al confocale è qualitativa e ci permette di dire che l'attività enzimatica antiossidante è bene espressa in tutte le cellule, suggerendo l'efficienza di un meccanismo anti-ossidante.
- 26 L'ipossia è mediata da HIF la cui espressione e traslocazione al nucleo è evidente in ipossia in tutte le cellule. In maniera davvero sorprendente, e viene inibita dall'aggiunta di CELLFOOD. In parallelo anche l'espressione di Glut-1 come risposta adattativa viene inibita.