

Inibitori della calcineurina e trapianto renale

Articoli Originali

Claudio Ponticelli

Ex direttore Nefrologia, IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico Milano

Corrispondenza a:

Claudio Ponticelli

E-mail: ponticelli.claudio@gmail.com



Claudio Ponticelli

ABSTRACT

Gli inibitori della calcineurina (CNI) hanno rivoluzionato i risultati del trapianto d'organo e sono tuttora i farmaci immunosoppressori più usati nel trapianto. I CNI inibiscono un sistema di fosfatasi necessario per consentire la translocazione nel nucleo di un fattore di trascrizione da cui dipende la sintesi di interleuchina-2. Questo passaggio è fondamentale per la successiva proliferazione e differenziazione delle cellule T. In questo articolo vengono brevemente riassunte le caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche di CNI, i loro potenziali effetti collaterali renali ed extra-renali ed i risultati ottenuti con CNI nel trapianto renale. Per prevenire eventi avversi le dosi di CNI dovrebbero essere ridotte in presenza di insufficienza renale o ipertensione severa, l'uso di farmaci nefrotossici dovrebbe essere evitato quando possibile, molta attenzione dovrebbe essere posta nell'usare farmaci che interferiscono con l'attività del citocromo P450 o della glicoproteina P. Inoltre, non va fatto troppo affidamento ai livelli ematici di CNI, che non riflettono la concentrazione intracellulare, che è molto superiore e molto più importante di quella plasmatica.

I due inibitori della calcineurina (CNI) attualmente in commercio sono ciclosporina (CsA) e tacrolimus (TAC). CsA è un polipeptide ciclico composto da circa 11 aminoacidi derivato dal fungo *Tolypocladium inflatum gams*. TAC è un antibiotico macrolide derivato dal fungo *Streptomyces tsukubaensis*. I due CNI hanno una struttura molecolare diversa, ma entrambi hanno simili caratteristiche farmacologiche ed un simile meccanismo d'azione consistente nell'inibizione della calcineurina intra-cellulare.

I due CNI originali sono stati sostituiti rispettivamente da una nuova microemulsione per la CsA (Neoral) e da una formulazione che consente una mono-somministrazione giornaliera per il TAC (Adavagraf). Sono anche disponibili formulazioni generiche.

Farmacocinetica

Dopo somministrazione orale e riassorbimento nel piccolo intestino, il 60% dei CNI si lega nel sangue agli eritrociti, il 33% a lipoproteine ed una minima frazione circola libera. CNI sono metabolizzati nel fegato e nell'intestino da isoenzimi del citocromo P-450 (CYP450). Fattori che inibiscono l'attività di CYP450 aumentano la biodisponibilità di CNI, mentre induttori di CYP450 diminuiscono la biodisponibilità di CNI (1). I metaboliti sono eliminati principalmente con la bile ed in piccola parte con le urine. Rispetto alla formulazione originale la microemulsione di CsA (Neoral) ha un assorbimento più completo e rapido. Numerose variabili possono influenzare la biodisponibilità e la farmacocinetica di CNI (Tab 1).

Inibiscono CyP450	Biodisponibilità	Attivano CyP450
Aumentata		Diminuita
Età avanzata		Età pediatrica
Obesità		Malnutrizione
Fumo		Diversione biliare
Epatopatia		Diarrea
Pompelmo		Anticomiziali
Antifungini azolici		Nafcillina
Macrolidi		Oxacillina
Chinoloni		Rifampicina
CCB non diidropiridinici		Rifabutina

Tabella 1. Fattori che inibiscono o attivano gli isoenzimi del citocromo P450 (CYP450) aumentando o riducendo la biodisponibilità dei CNI

Farmacodinamica

I CNI sono farmaci lipofili e penetrano facilmente attraverso le membrane cellulari. La loro azione si esercita all'interno delle cellule. La concentrazione intracellulare è regolata dalla glicoproteina-P (o ATP-binding cassette ABC B1 o multi-drug resistance protein). Questa proteina limita una eccessiva concentrazione intracellulare di tossine e farmaci, inclusi CNI, favorendo l'efflusso dalle cellule e aumentando la concentrazione ematica. Oltre a possibili mutazioni genetiche, numerosi fattori possono inibire o stimolare l'attività della glicoproteina P (Tab 2).

Inibitori di Pgp (Riduzione nel plasma. Aumento intracellulare)	Induttori di Pgp (Aumento nel plasma, Riduzione intracellulare)
Antibiotici macrolidi (eritromicina, claritromicina) Inibitori pompa protonica (omeprazolo, lansoprazolo) Calcio antagonisti (verapamil, diltiazem, felodipina, nifedipina) Antiarritmici (amiodarone, chinidina) Antidepressivi (paroxetina, sertralina) Antifungini (chetoconazolo e derivati) Ciclosporina Fenofibrati	Antiepilettici (carbamazepina, fenobarbital, fenitoina) Glucocorticoidi (Desametasone) Rifampicina e derivati Tenofovir Antidepressivi (nefaxodone, trazodone) Alfa-bloccanti (prazosina) Doxorubicina

Tabella 2. Fattori che possono alterare l'attività della glicoproteina P (Pgp) ed influenzare la farmacodinamica di CNI

Limiti del monitoraggio dei CNI

Attualmente il dosaggio di CNI viene regolato sulla base dei livelli ematici, il cosiddetto therapeutic drug monitoring (TDM). Tuttavia, vi è una notevole variabilità non solo tra soggetto e soggetto ma anche nel singolo individuo in diverse situazioni fisiologiche o patologiche. Inoltre, entrambi i CNI

sono sotto l'influenza di polimorfismi genetici. Pertanto, è difficile stabilire una correlazione tra dosi ematiche e rigetto o tossicità. Nell'esperienza quotidiana si possono osservare rigetti acuti in pazienti con elevati livelli ematici di CNI o viceversa, dimostrando che i livelli ematici di CNI non correlano con l'effetto farmacologico [2]. Di fatto, il livello ematico non riflette la concentrazione di CNI nei linfociti, dalla quale dipende l'attività immunosoppressiva. Vi sono pochi dati sulla concentrazione intracellulare di CNI, generalmente focalizzati sul ruolo di polimorfismi genetici [3,4]. Uno studio sulla farmacocinetica di TAC nei pazienti con trapianto renale ha dimostrato che i) esisteva una correlazione relativamente lineare tra TAC ematico ed intracellulare se la funzione del trapianto era stabile; ii) il sesso, l'ematocrito, e la durata del trapianto avevano una influenza importante sul rapporto ematico-intracellulare, che risultava più elevato nel sesso femminile, nei pazienti con basso ematocrito e nei pazienti con breve durata del trapianto; iii) non vi era correlazione tra rapporto ematico-intracellulare e andamento clinico o polimorfismo genetico [5]. Al momento, non è prudente fidarsi nei livelli ematici di CNI per prendere decisioni cliniche. Sono necessari nuovi studi per valutare l'importanza delle concentrazioni intracellulari di CNI in diverse circostanze cliniche, quali rigetto, infezioni e tossicità da CNI.

Meccanismi d'azione

CNI sono farmaci lipofili e possono agevolmente penetrare nelle cellule. All'interno della cellula il CNI si lega al suo recettore specifico, ciclofilina per CsA e FKBP-12 per TAC. Il complesso farmaco-recettore inibisce l'attività fosfatase della calcineurina, un complesso proteico appartenente alla superfamiglia di serin-treonina fosfatasi, che esplica un ruolo chiave nella risposta cellulomediata. Quando il linfocita è attivato dal contatto tra i fattori di co-stimolazione della cellula presentante l'antigene (CD 80-86 e CD40) e i fattori di co-stimolazione del linfocita (CD28 e CD154), si ha una forte produzione intracellulare di ioni calcio. Questi attivano la calcineurina, una proteina-fosfatasi-3 calcio- e calmodulina-dipendente che defosforila una famiglia di fattori di trascrizione, chiamata nuclear factor of activated T cells (NFAT), consentendone la translocazione nel nucleo. I membri di NFAT hanno una regione omologa che media il contatto con DNA. NFAT1, NFAT2, e NFAT4 partecipano all'attivazione trascrizionale di geni e partecipano quindi alla codificazione e alla sintesi di alcune citochine, tra cui interleuchina-2 (IL-2), che dopo essersi legata al suo recettore stimola, insieme a IL-15, una cascata di chinasi governata dalla PI3K (fosfatidilinositolo chinasi 3) con la mediazione di mTORc1 (mammalian target-of-rapamycin complex 1). Queste chinasi propagano i segnali necessari per la proliferazione e differenziazione dei linfociti T in Th1 e Th17. Inibendo la produzione di IL-2, CNI non solo prevengono la differenziazione delle cellule T, ma possono anche inibire l'attivazione delle cellule B, interferendo sulla cooperazione T-B [6]. Possono, inoltre, modulare alcune molecole di superficie delle cellule dendritiche e alterare quindi la presentazione dell'antigene alle cellule T [7]. Infine, inibiscono la sintesi del macrophage-activating factor, prevenendo la sintesi di macrofagi e monociti. Questi effetti intervengono rapidamente, sono dose-dipendenti e reversibili [8]. Oltre alla loro attività immunosoppressiva CNI possono anche prevenire danni podocitari, bloccando la defosforilazione da parte della calcineurina della sinaptopodina, una proteina fondamentale per la sintesi e la regolazione dei filamenti actinici che compongono il citoscheletro podocitario. Questo meccanismo è stato dimostrato per la CsA [9] ma è verosimile che sia operante anche col TAC.

Effetti collaterali

Il limite maggiore di CNI è rappresentato dal loro basso indice terapeutico (rapporto tra dose tossica e dose efficace). Ne consegue una frequente incidenza di effetti collaterali, generalmente correlati

al dosaggio o all'interferenza con altri farmaci che possono alterare la funzione del CYP 450 o della glicoproteina P. Molti di questi effetti collaterali sono comuni ai due farmaci, ma la loro incidenza e gravità può essere diversa.

Alcune importanti complicazioni, come infezioni e neoplasia, sono riferibili all'immunosoppressione e non sono specifiche. Altri effetti collaterali sono invece riferibili all'azione selettiva dei farmaci. Tra questi i più frequenti sono nefrotossicità, ipertensione arteriosa, dislipidemia, diabete, neurotossicità, difetti estetici.

Nefrotossicità. Dal punto di vista fisiopatologico e clinico è possibile riconoscere due tipi di nefrotossicità: acuta e cronica.

La nefrotossicità acuta è caratterizzata clinicamente da riduzione della filtrazione glomerulare (GFR), aumento di creatininemia, azotemia ed uricemia. Istologicamente, possono essere presenti sia lesioni tubulari che arteriolari. Nelle fasi iniziali, la ridotta GFR non è associata ad alcuna alterazione istologica, ma è legata alla vasocostrizione renale indotta da CNI. Questi farmaci favoriscono una ridotta attività di molecole vasodilatatrici, come ossido nitrico, prostaciclina, prostaglandina E2 ed una aumentata espressione di agenti vasocostrittori, come angiotensina II, endotelina 1, trombossani e leucotrieni [10]. Le lesioni tubulari consistono in vacuolizzazione isometrica, microcalcificazioni e mitocondri giganti. Sono più frequenti con CsA che con TAC, ma non sono patognomoniche e sono reversibili se il dosaggio di CNI viene ridotto. Le lesioni arteriolari sono caratterizzate da necrosi focale dei miociti nella media delle arteriole [11]. Anche le lesioni arteriolari sono potenzialmente reversibili, se le dosi di CNI vengono diminuite, ma, in presenza di reni con precedenti alterazioni parenchimali o sottoposti al danno da ischemia-riperfusion, CNI possono favorire lo sviluppo di nefropatia tubulare con insufficienza renale acuta o anche microangiopatia trombotica [12].

La nefrotossicità cronica è caratterizzata da riduzione progressiva di GFR causata da lesioni tubulo-interstiziali, glomerulosclerosi e vasculopatia obliterante. La fibrosi interstiziale è l'alterazione istologica dominante. È causata da produzione eccessiva di matrice extra-cellulare nell'interstizio con accumulo di collagene e altre molecole correlate ed è sempre associata ad atrofia tubulare, da qui l'acronimo IFTA (Interstitial Fibrosis Tubular Atrophy). Diverse cellule e mediatori sono coinvolti nella patogenesi di IFTA. Le cellule includono fibroblasti, fibrociti, miofibroblasti e monociti/macrofagi. I mediatori molecolari sono bone morphogenic protein (BMP), platelet-derived growth factor (PDGF), hepatocyte growth factor (HGF) e transforming growth factor beta 1 (TGF-β1), che è considerato il mediatore chiave [13], favorendo lo sviluppo di fibrosi interstiziale attraverso la transdifferenziazione di cellule endoteliali ed epiteliali a cellule mesenchimali e la produzione di matrice extracellulare [14]. Nella sua forma latente il TGF-β fa parte di un macro-complesso con altri polipeptidi. L'arteriopatologia da CNI aggravata dalla vasocostrizione produce ipossia, uno stimolo importante per l'attivazione di fattori che slatentizzano TGF-β dal suo grande complesso intracellulare. Sotto l'effetto di trombospodina 1, TGF-β si lega al suo recettore II che subisce una rotazione ed un riarrangiamento delle chinasi citoplasmatiche favorendo l'attivazione del recettore I di TGF-β [15]. Questi propaga il segnale a piccole proteine (SMAD), che regolano la crescita, la differenziazione e l'apoptosi cellulare [16]. SMAD 1,2,3,5,8 sono chiamate regolatrici (R-SMAD), SMAD 4 (co-SMAD) collabora con R-SMAD mentre SMAD 6 e 7 inibiscono il segnale di attivazione [17]. R-SMAD si legano a co-SMAD ed entrano nel nucleo dove attivano promotori e cofattori di trascrizione causando la trascrizione di DNA. Aumentati livelli di angiotensina II possono contribuire allo sviluppo di IFTA, sia interferendo direttamente sulla matrice extra-cellulare che aumentando l'espressione di TGF-β, PDGF, tumor necrosis factor, plasminogen activator inhibitor (PAI) e osteopontina [18].

CNI possono produrre IFTA con diversi meccanismi. L'ipossia, indotta dall'ischemia renale, sopprime la crescita delle cellule epiteliali tubulari e favorisce la loro apoptosi ed atrofia aumentando l'espressione di TGF- β 1 e altri fattori profibrotici [19]. CNI aumentano l'espressione del PAI che favorisce il reclutamento di cellule interstiziali e di microRNA TGF- β 1 nelle cellule tubulari [20]. L'angiotensina II, attivata da CNI, favorisce il rilascio di aldosterone, stimola il trasporto tubulare di molecole infiammatorie e profibrotiche e l'ulteriore produzione di TGF- β 1 [21]. CNI possono produrre necrosi della muscolatura liscia che viene rimpiazzata da depositi ialini nodulari nella parete di arteriole afferenti (ialinosi nodulare) con ostruzione del lume vascolare [22]. Il danno vascolare contribuisce con la fibrosi interstiziale e l'atrofia tubulare nel determinare lesioni istologiche irreversibili. Oltre al danno endoteliale CNI favoriscono l'aggregazione piastrinica e l'attivazione del PAI, esercitando così un'attività protrombotica [23].

Iperensione arteriosa. La vasocostrizione renale indotta da CNI sulle arteriole afferenti preglomerulari produce una riduzione di GFR e natriuresi, con ritenzione di acqua e sodio. Questa è aggravata dall'inibita secrezione di ormone natriuretico da parte dell'angiotensina II e dall'attivazione dei co-trasportatori Na-K-2Cl nell'ansa ascendente e Na-Cl nel tubulo distale da parte di CNI [24]. Ne consegue un'espansione dei liquidi extracellulari con aumento della gettata cardiaca. Anche valori di renina-angiotensina apparentemente normali risultano essere elevati in presenza di ipervolemia e contribuiscono ad un aumento delle resistenze vascolari e allo sviluppo d'ipertensione arteriosa [25]. L'impressione clinica è che l'ipertensione sia meno grave con TAC rispetto a CsA, forse per la minore interferenza del TAC con la reattività delle cellule muscolari lisce [26].

Dislipidemia. Elevati livelli serici di LDL-colesterolo e VLDL-trigliceridi sono frequenti in pazienti trattati con CsA. La patogenesi di queste alterazioni è probabilmente multifattoriale. CsA inibisce la 26-idrossilasi riducendo la sintesi di acidi biliari da parte del colesterolo [27] e inibendo l'escrezione intestinale di colesterolo [28]. Inoltre, CsA può aumentare i livelli di proproteina convertasi subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9), un enzima che degrada il recettore LDL, favorendo una ridotta presenza di questi recettori sulla membrana della cellula epatica [29]. Una ridotta attività della lipoproteinlipasi può poi favorire un aumento delle VLDL circolanti. La dislipidemia è meno frequente e meno grave con TAC che con CsA.

Diabete. CNI possono produrre intolleranza al glucosio attraverso diversi meccanismi, come ridotta secrezione insulinica [30] ed aumentata resistenza all'insulina [31]. Il diabete è molto più frequente con TAC, che aumenta il riassorbimento di glucosio a livello del digiuno [32] e potenzia la glicolipotossicità delle cellule beta, riducendone la proliferazione [33]. Nei ratti Zucker TAC riduce la proliferazione di cellule beta e l'espressione del gene *Ins2* [34]. L'infezione da HCV, la predisposizione familiare, il genere maschile, e l'obesità possono significativamente aumentare il rischio di diabete. TAC non dovrebbe essere usato in queste circostanze.

Neurossicità. Tremori, parestesie e cefalea sono dose-dipendenti e molto più frequenti con TAC. Nei casi più gravi, si possono sviluppare allucinazioni, convulsioni, atassia cerebellare e leucoencefalopatia posteriore, forse dovuta all'alterata attività della barriera emato-encefalica con passaggio di CNI nell'interstizio cerebrale, disfunzione dei mitocondri e alterazioni elettrofisiologiche dei neuroni [35]. Sono stati segnalati rari casi di sordità o otalgia.

Alterazioni dermatologiche. CsA può causare ipertricosi, lesioni pilosebacee e ipertrofia gengivale. L'ipertricosi, molto disturbante nei bambini e nelle giovani donne, è dose-dipendente ed è più frequente in soggetti con capelli scuri. E' probabilmente correlata ad una aumentata attività dell'alfa-reduttasi che trasforma gli androgeni in deidrotestosterone nei tessuti periferici [36]. Non vi sono alterazioni dermatologiche specifiche prodotte da TAC.

CNI e Trapianto Renale

Prima dell'avvento della CsA la terapia immunosoppressiva del trapianto di rene era basata sull'associazione tra corticosteroidi ed azatioprina. Le forti dosi di questi farmaci non potevano impedire il frequente sviluppo di rigetto acuto, ma causavano anche una elevata mortalità precoce da infezioni ed una cattiva qualità di vita nei pazienti con rene ancora funzionante ad un anno dal trapianto. Le prime sperimentazioni cliniche con CsA condotte da sir Roy Calne in pazienti con trapianto renale da donatore deceduto, dimostrarono la possibilità di ridurre considerevolmente il rischio di rigetto acuto e di ridurre o sospendere i corticosteroidi in alcuni casi [37]. Numerosi altri studi, inclusi tre studi randomizzati [38, 40] dimostrarono una sopravvivenza del paziente e del trapianto significativamente migliore nei soggetti trattati con CsA rispetto a quelli trattati con steroidi ed azatioprina. In breve tempo, CsA divenne il farmaco di elezione per la terapia immunosoppressiva del trapianto. Tuttavia, le dosi usate nelle prime esperienze erano eccessivamente elevate, tra i 15 e i 17 mg/Kg/d nel primo periodo post-operatorio con lenta graduale riduzione a un mantenimento tra i 5 e 7 mg/Kg/d. Queste elevate posologie amplificarono la potenziale tossicità della CsA, soprattutto a livello renale. Biopsie precoci in trapiantati renali trattati con CsA mostravano spesso strisce di fibrosi interstiziale che progressivamente conducevano ad una fibrosi interstiziale diffusa ed atrofia tubulare associate ad insufficienza renale. Dopo oltre un decennio dall'avvento della CsA venne reso disponibile l'uso di TAC. A differenza di CsA i dosaggi erano considerevolmente inferiori (0.2 mg/kg/die per l'induzione, 0.05-0.1 mg/kg/die per il mantenimento). Anche TAC è potenzialmente nefrotossico ed il suo uso prolungato era frequentemente associato a fibrosi interstiziale ed atrofia tubulare. Però la fibrosi interstiziale non è un segno patognomonico di nefrotossicità da CNI; rappresenta infatti lo stadio finale di un complesso processo patologico, comune ad ogni insulto renale cronico. Può essere indotta dal danno da ischemia-riperfusion, da altri farmaci nefrotossici (antibiotici, antivirali, antiinfiammatori etc), da rigetto acuto o cronico, da cattiva qualità del rene donato, da stimoli ipossici, da infezioni batteriche o virali o altri eventi di qualsiasi natura che possono danneggiare il rene [41]. Questi eventi possono produrre transizione epitelio-mesenchimale, arresto del ciclo cellulare, alterato metabolismo cellulare e progressivo deposito di matrice extracellulare con fibrosi renale. Inoltre le cellule tubulari, che sono particolarmente vulnerabili a stimoli tossici, possono attivare i fibroblasti e produrre grandi quantità di matrice extracellulare [42]. Tuttavia, il frequente riscontro di fibrosi interstiziale in pazienti trapiantati in terapia con CNI veniva spesso attribuito alla nefrotossicità del farmaco. Tale convinzione venne apparentemente confermata da uno studio australiano basato su biopsie protocollari in pazienti con trapianto di rene e pancreas trattati a lungo termine con CsA. A 10 anni dal trapianto la nefrotossicità da CsA era presente in quasi tutti i reni, compresi quelli con un quadro istologico eccellente nel breve termine. Sempre a 10 anni, una grave nefropatia cronica documentata istologicamente era presente nel 58.4 % dei pazienti. Nonostante queste gravi lesioni istologiche la sopravvivenza del trapianto renale nella casistica descritta era del 95% a 10 anni [43]. Altri gruppi riportarono eccellente sopravvivenza renale dopo 10 anni o più con creatininemia stabile, anche se superiore ai valori normali [44,45]. I pazienti oggetto di questi studi erano stati trapiantati nei primi anni '90, quando TAC non era disponibile e le dosi di CsA erano molto superiori a quelle usate attualmente. Oggi, nonostante alcuni Autori insistano nel ritenere che l'uso di CNI debba essere limitato a causa della loro nefrotossicità [46], altri ricercatori sottolineano che la responsabilità di CNI nella insufficienza cronica del trapianto renale sia stata esagerata e sopravvalutata rispetto ad altri fattori di rischio, quali il rigetto anticorpo-mediato e la cattiva aderenza alle prescrizioni [47-50]. Le maggiori incertezze riguardano il lungo termine. Solo pochi studi hanno riportato follow-ups di 10 anni [51-54]. Quattro studi hanno studiato le caratteristiche di trapiantati renali seguiti fino a 20 anni, ma la maggior parte dei pazienti

avevano ricevuto terapie basate su azatioprina e corticosteroidi [55-58]. Recentemente, Moroni et al [59] hanno studiato le condizioni cliniche di 173 pazienti con trapianto renale trattati per 20 anni con ciclosporina. All'ultima visita clinica, molti di questi pazienti avevano ipertensione (83%), neoplasie maligne (13%), diabete (9%) e/o malattie cardiovascolari (9%). Tuttavia, nei pazienti con trapianto renale funzionante a 20 anni la creatinina serica mediana era 1,4 mg/dL ed era stabile da anni. Analogamente la proteinuria era stabilizzata a 0.6 g/die. Una chiara dimostrazione che un prolungata somministrazione di CsA non è necessariamente responsabile di un danno renale progressivo.

Conclusioni

CNI rimangono un presidio terapeutico importante nel trapianto di rene. Il loro uso prolungato e ad alte dosi può però esporre a diverse complicazioni e può contribuire alla disfunzione del rene trapiantato. Tuttavia, alcuni accorgimenti possono ridurre il rischio di eventi avversi. In pazienti, con inadeguata ripresa funzionale o ipertensione severa le dosi di CNI (soprattutto ciclosporina) dovrebbero essere minimizzate o il loro uso rimandato di qualche giorno utilizzando globuline anti-timociti per l'induzione. Per quanto riguarda il mantenimento, in pazienti con GFR < 50 ml/min o ipertensione severa le dosi di CNI dovrebbero essere minimizzate associandole con inibitori di mTOR o inibitori della sintesi purinica. Va evitato, nei limiti del possibile, l'uso di farmaci nefrotossici o di farmaci che interferendo con l'attività di CYP450 o glicoproteina P possono alterare la biodisponibilità o la farmacodinamica di CNI. Va ridotto il dosaggio di CNI se la creatinina serica aumenta > 25-30%, senza altre cause individuabili o se il paziente accusa segni di tossicità (tremori, ipertricosi, ipertensione). In caso di nefropatia da BK polyoma virus CNI vanno sospesi e sostituiti da mTOR inibitori che possono esercitare attività sia immunosoppressiva che antivirale [60]. Soprattutto, non vanno interpretate fideisticamente le raccomandazioni riguardanti i livelli ematici. I livelli plasmatici non ci danno alcuna idea della concentrazione intracellulare, che è molto superiore e molto più importante di quella plasmatica [61]. In caso di polimorfismo della glicoproteina P, che può essere presente in 1/3 della popolazione europea [62] o uso di sostanze che inibiscono la sua attività potremmo avere livelli ematici bassi e concentrazioni intracellulari elevate! Vice versa in caso di iperattività della glicoproteina P. Inoltre non è ancora certo se l'azione immunosoppressiva di CNI debba coprire uniformemente 24 ore o debba essere concentrata sulle ore diurne. La migrazione di linfociti dai linfonodi non è continua ma segue un ritmo circadiano. I linfociti rimangono nei linfonodi durante la notte mentre circolano durante il giorno. Vi sono grandi oscillazioni che dipendono da fattori promigranti, come il numero di cellule dendritiche [63], stimoli adrenergici [64], chemochine, citochine e fattori di accrescimento che regolano l'organizzazione funzionale dei linfonodi e l'ingresso dei linfociti [65]. Va comunque sottolineata la possibilità di poter usare i CNI per decenni senza causare un progressivo ed inesorabile peggioramento della funzione renale, alla condizione di rispettare alcune indicazioni: le dosi di mantenimento non devono superare i 2- 3 mg/kg/die con CsA e 0.05- 0.1 mg/kg/die con TAC; i pazienti devono essere monitorati frequentemente e non ogni 6-12 mesi; va evitato un atteggiamento fideistico nei confronti dei livelli ematici, che possono condurre a gravi errori terapeutici. Dopo molti anni di sterili discussioni sul rischio di insufficienza renale irreversibile causata da CNI, va ricordato che la causa più frequente di fallimento di un trapianto non è la nefrotossicità da CNI, ma è il decesso del ricevente. Le cause maggiori di danno cronico renale sono oggi rappresentate dal rigetto cronico anticorpo-mediato, dalla recidiva di malattie renali o sistemiche, dalla cattiva aderenza alle prescrizioni e dalla cattiva qualità dell'organo trapiantato. CNI possono esercitare nefrotossicità, ma questo rischio può essere ridotto da un attento monitoraggio clinico.

BIBLIOGRAFIA

1. De Jonge H, de Loo H, Verbeke K, Vanrenterghem Y, Kuypers DR. In vivo CYP3A4 activity, CYP3A5 genotype, and hematocrit predict tacrolimus dose requirements and clearance in renal transplant patients. *Clin Pharmacol Ther.* 2012; 92: 366–375.
2. Andrews LM, Li Y, De Winter BCM, et al. Pharmacokinetic considerations related to therapeutic drug monitoring of tacrolimus in kidney transplant patients. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2017; 13(12): 1225-1236.
3. Noceti OM, Woillard JB, Boumediene A, et al. Tacrolimus pharmacodynamics and pharmacogenetics along the calcineurin pathway in human lymphocytes. *Clin Chem.* 2014; 60(10): 1336-45.
4. Crettol S, Venetz JP, Fontana M, et al. Influence of ABCB1 genetic polymorphisms on cyclosporine intracellular concentration in transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics.* 2008; 18(4): 307-15.
5. Han SS, Yang SH, Kim MC et al. Monitoring the Intracellular Tacrolimus Concentration in Kidney Transplant Recipients with Stable Graft Function. *PLoS One.* 2016; 11: e0153491.
6. Matsuda S, Koyasu S. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology.* 2000; 47: 119–125.
7. O'Keefe SJ, Tamura J, Kincaid RL, Tocci MJ, O'Neill EA. FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature* 2004; 357: 692–694.
8. Barbarino JM, Staats, Venkataramanan R et al. PhramGKB summary: Cyclosporine and Tacrolimus pathways. *Pharmacogenet. Genomics* 2013; 23: 563-585.
9. Faul C, Donnelly M, Merscher-Gomez et al. The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuria effect of cyclosporine. *Nature Med* 2008; 14:931-938.
10. Olyaei AJ, De Mattos AM, Bennett WM. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: new insight and preventive strategies *Curr Opin Crit Care* 2001; 7: 384-389.
11. Mihatsch MJ, Ryffel B, Gudat F. The differential diagnosis between rejection and cyclosporine toxicity. *Kidney Int* 1995; 48(Suppl 52): S63–S69.
12. Ponticelli C: De novo thrombotic microangiopathy. An underrated complication of renal transplantation. *Clin Nephrol* 2007; 67: 335–34.
13. Farris AB, Colvin RB. Renal Interstitial Fibrosis: Mechanisms and Evaluation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2012; 21: 289-300.
14. Dai C, Yang J, Liu Y. Transforming growth factor-beta1 potentiates renal tubular epithelial cell death by a mechanism independent of Smad signaling. *J Biol Chem.* 2003; 278: 12537-12545.
15. Ponticelli C, Anders HJ. Retarding the progression of kidney disease. Could thrombospondins be therapeutic targets? *Nephrol Dial Transplant* 2017; 32(7): 1084-1089.
16. Meng XM, Tang PMQ, Li J, Lan HY. TGF- β /Smad signaling in renal fibrosis. *Front Physiol.* 2015; 6: 82.
17. Phanish MK, Wahab NA, Colville-Nash P, Hendry BM, Dockrell ME. The differential role of Smad2 and Smad3 in the regulation of pro-fibrotic TGFbeta1 responses in human proximal-tubule epithelial cells. *Biochem J.* 2006; 393: 60160-167.
18. Nogueira A, Pires MJ, Oliveira PA. Pathophysiological Mechanisms of Renal Fibrosis: A Review of Animal Models and Therapeutic Strategies. *In Vivo.* 2017; 31(1): 1–22.
19. Tanaka T. A mechanistic link between renal ischemia and fibrosis. *Med Mol Morphol.* 2017; 50(1): 1-8.
20. Matsuo S, Lopez-Guisa JM, Cai X et al. Multifunctionality of PAI-1 in fibrogenesis: evidence from obstructive nephropathy in PAI-1-overexpressing mice. *Kidney Int.* 2005; 67: 2221-2238.
21. Wolf G: Renal injury due to renin-angiotensin-aldosterone system activation of the transforming growth factor-beta pathway. *Kidney Int* 2006; 70: 1914–1919.
22. Mihatsch MJ, Kyo M, Morozumi K, et al: The side-effects of cyclosporine-A and tacrolimus. *Clin Nephrol* 1998; 49: 356–363.
23. Ponticelli C, Moia M, Montagnino G. Renal allograft thrombosis *Nephrol. Dial. Transplant.* 2009; 24: 1388-1393.
24. Blankenstein KI, Borschewski A, Labes R et al. Calcineurin inhibitor cyclosporine A activates renal Na-K-Cl cotransporters via local and systemic mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2017; 312: F489-F501.
25. Ponticelli C, Cucchiari D, Graziani G. Hypertension in kidney transplant recipients. *Transplant Int* 2011; 24(6): 523-533.
26. Grześk E, Malinowski B, Wiciński M, et al. Cyclosporine-A, but not tacrolimus significantly increases reactivity of vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rep.* 2016; 68: 201-205.
27. Riella LV, Gabardi S, Chandraker A. Dyslipidemia and its therapeutic challenges in renal transplantation. *Am J Transplant.* 2012; 12(8): 1975-1982.
28. Zanotti I, Greco D, Lusardi G, et al. Cyclosporine A impairs the macrophage reverse cholesterol transport in mice by

- reducing sterol fecal excretion. *PLoS One*. 2013; 8(8): e71572.
29. Tavori H, Rashid S, Fazio S. On the function and homeostasis of PCSK9: reciprocal interaction with LDLR and additional lipid effects. *Atherosclerosis*. 2015; 238(2): 264-70.
 30. Øzbay LA, Smidt K, Mortensen DM, et al. Cyclosporin and tacrolimus impair insulin secretion and transcriptional regulation in INS-1E beta-cells *Br J Pharmacol*. 2011; 162: 136–146.
 31. Chakkera HA, Kudva Y, Kaplan B. Calcineurin Inhibitors: Pharmacologic Mechanisms Impacting Both Insulin Resistance and Insulin Secretion Leading to Glucose Dysregulation and Diabetes Mellitus. *Clin Pharmacol Ther*. 2017; 101: 114-120.
 32. Li Z, Sun F, Zhang Y, Chen H, et al. Tacrolimus induces insulin resistance and increases the glucose absorption in the jejunum: a potential mechanism of the diabetogenic effects. *PLoS One* 2015; 10: e0143405.
 33. Triñanes J, Rodriguez-Rodriguez AE, Brito-Casillas Y, et al. Deciphering tacrolimus-induced toxicity in pancreatic β cells. *Am J Transpl* 2017; 17: 2829–2840.
 34. Rodriguez-Rodriguez AE, Triñanes J, Velazquez-Garcia S, et al. The higher diabetogenic risk of tacrolimus depends on pre-existing insulin resistance. A study in obese and lean Zucker rats. *Am J Transplant*. 2013; 13: 1665-1675.
 35. Ponticelli C, Campise MR. Neurological complications in kidney transplant recipients. *J Nephrol*. 2005; 18(5): 521-528.
 36. Vexiau P, Fiet J, Boudou Ph, et al. Increase in plasma 5 alpha-androstane-3 alpha, 17 alpha-diol glucuronide as a marker of peripheral androgen action in hirsutism: a side effect induced by cyclosporine A. *J Steroid Biochem* 1990; 35: 133.
 37. Calne RY, White DJ, Thiru S, et al. Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet*. 1978; 2(8104-5): 1323-1327.
 38. European Multicentre Trial Group. Cyclosporin in cadaveric renal transplantation. *Lancet* 1983; 2: 986-989.
 39. Canadian Multicenter Trial Study Group. A randomized clinical trial with cyclosporine in cadaveric renal transplantation. *N Engl J Med* 1986; 1219-1225.
 40. Ponticelli C, Minetti L, Quarto di Palo F et al. The Milan clinical trial with cyclosporine in cadaveric renal transplantation. *Transplantation* 1988; 45: 908-913.
 41. Mengel M, Mihatsch M, Halloran PF. Histological characteristics of calcineurin inhibitor toxicity—there is no such thing as specificity! *Am J Transplant*. 2011; 11(12): 2549-2550.
 42. Zhou D, Liu Y. Understanding the mechanisms of renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 2016; 12: 68-70.
 43. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med*. 2003; 349(24): 2326-2333.
 44. Sijpkens YW, Doxiadis II, Mallat MJ, et al. Early versus late acute rejection episodes in renal transplantation. *Transplantation*. 2003; 75: 204-208.
 45. Ponticelli C, Villa M, Cesana B, Montagnino G, Tarantino A. Risk factors for late kidney allograft failure *Kidney Int* 2002; 62: 1848-1854.
 46. Chapman JR. Chronic calcineurin inhibitor nephrotoxicity—lest we forget. *Am J Transplant*. 2011; 11 (4): 693–697.
 47. Issa N, Kukla A, Ibrahim HN Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: a review and perspective of the evidence. *Am J Nephrol*. 2013; 37(6): 602-612.
 48. Venner JM, Famulski KS, Reeve J, Chang J, Halloran PF. Relationships among injury, fibrosis, and time in human kidney transplants. *JCI Insight*. 2016; 1: e85323.
 49. Sellares J, de Freitas DG, Mengel M, et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant*. 2012; 12(2): 388-399.
 50. Montgomery RA, Loupy A, Segev D. Antibody-mediated rejection: New approaches in prevention and management. *Am J Transplant*. 2018; 18 Suppl 3: 3-17.
 51. Englund MS, Berg UB, Bohlin AB, et al. Ten years' experience of renal transplantation in children in the cyclosporine era. *Transplantation*. 1993; 56(5): 1124-30.
 52. Ota K, Takahashi K, Uchida K, et al. A 10-year follow-up study of renal transplant recipients treated with cyclosporine. *Japanese Cyclosporine Kidney Transplant Study Group. Clin Nephrol*. 2000; 53(3): 182-7.
 53. Montagnino G, Tarantino A, Segoloni G et al. Long-term results of a randomized study comparing three immunosuppressive schedules with cyclosporine in cadaveric renal transplantation *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2163-2169.
 54. Opelz G, Dohler B. Cyclosporine and long-term graft survival. *Transplantation* 2001; 72: 1267-1273.
 55. Matas A, Gillingham K, Humar A, et al. 2,202 kidney transplant recipients with 10 years of graft function: What happens next? *Am J Transplant*. 2008; 8: 2410–2419.
 56. Traynor C, Jenkinson A, Williams Y, et al. Twenty-year survivors of Kidney Transplant. *Am J Transplant*. 2012; 12: 3289–3295.
 57. McCaughan JA, Courtney AE. The clinical course of kidney transplant recipients after 20

- years of graft function. *Am J Transplant.* 2015; 15: 734–740.
58. Rao KV, Kasiske BL, Dahl DC, et al. Long-term results and complications of renal transplantation: The Hennepin experience. *Clin Transplant.* 1997; 119–124.
59. Moroni G, Binda V, Quaglini S et al. Causes of late transplant failure in cyclosporine-treated kidney allograft recipients. *Clin Exp Nephrol.* 2019; 23 (8): 1076-1086.
60. Liacini A, Seamone ME, Muruve DA, Tibbles LA. Anti-BK virus mechanisms of sirolimus and leflunomide alone and in combination: toward a new therapy for BK virus infection. *Transplantation* 210; 90: 1450–1457.
61. Naesens M, Kuypers DR, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4: 481–508.
62. Brinkmann U, Eichelbaum M: Polymorphism in the ABC drug transporter gene MDR1. *Pharmacogenomics J* 2001; 1: 59-64.
63. Druzd D, Matveeva O, Ince L, et al. Lymphocyte Circadian Clocks Control Lymph Node Trafficking and Adaptive Immune Responses. *Immunity.* 2017; 46(1): 120-132.
64. Suzuki K, Hayano Y, Nakai A, Furuta F, Noda M. Adrenergic control of the adaptive immune response by diurnal lymphocyte recirculation through lymph nodes. *J Exp Med.* 2016; 213(12): 2567-2574.
65. Eckert N, Permanyer M, Yu K, Werth K, Förster R Chemokines and other mediators in the development and functional organization of lymph nodes. *Immunol Rev.* 2019; 289(1): 62-83.