

Nefropatia cronica del trapianto: focus sul ruolo della microinfiammazione

Trapianto renale

Gianluigi Zaza

Unità di Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università Degli Studi di Foggia.



Gianluigi Zaza

Corrispondenza a:

Prof. Gianluigi Zaza, MD, PhD
Associate professor in Nephrology
Department of Medical and Surgical Sciences
University-Hospital of Foggia
Via L. Pinto n.1, 71122, Foggia, Italy
Tel:+39-0881-732610

ABSTRACT

La nefropatia cronica del trapianto è una condizione patologica multifattoriale presente in una larga percentuale di reni trapiantati la cui comprensione è stata accelerata dall'estesa applicazione della biologia molecolare e dall'impiego della biopsia protocolle in molti centri nefro-trapiantologici. Grazie a queste innovazioni, si è compreso che questo processo può comparire molto precocemente nel post-trapianto e che la microinfiammazione parenchimale gioca un ruolo chiave. Molte condizioni patologiche, anche precoci (come il danno da ischemia/riperfusion, la presenza di rigetti cellulari e umorali, e le infezioni virali e batteriche) possono contribuire alla genesi della fibrosi renale. Da un punto di vista prettamente biologico, il danno cronico infiammatorio-mediato del graft è orchestrato da cellule immunitarie (principalmente macrofagi, cellule dendritiche, linfociti) e cellule effettrici che mediano la deposizione di matrice extracellulare (ECM) e la fibrosi. Molti degli elementi chiave di questi pathway biologici potrebbero rappresentare in futuro ottimi bersagli terapeutici. Al momento, però, non esiste una terapia specifica per arginare questa condizione, ma appare evidente che l'impiego di una immunosoppressione sostenibile (utilizzo combinato di più farmaci alle più basse dosi possibili) e l'attenzione alle comorbidità (dedicando sufficiente tempo al follow-up clinico e incrementando il network multi-specialistico) sia la via da perseguire per ottenere un accettabile rallentamento della progressione delle lesioni croniche del graft e una sua maggiore sopravvivenza.

PAROLE CHIAVE: Nefrologia, Trapianto renale, Microinfiammazione, Fibrosi, Immunosoppressione

Introduzione

Sebbene la sopravvivenza ad un anno del rene trapiantato sia significativamente migliorata, quella a lungo termine è ancora non ottimale con un'incidenza di perdita del graft dopo 15-20 anni di circa il 40-50% [1].

Per anni la genesi del danno cronico del rene trapiantato è stata attribuita principalmente agli inevitabili e cronici effetti nefrotossici degli inibitori della calcineurina (CNI, ciclosporina e tacrolimus).

Questo assioma è stato ampiamente validato dallo Studio Symphony che ha sottolineato come l'utilizzo di basse dosi di CNI (principalmente tacrolimus) fosse associato ad una migliore sopravvivenza del graft a 3 anni [2]. Questi risultati avevano innescato nella comunità trapiantologica internazionale la tendenza a minimizzare la terapia immunosoppressiva (spesso anche in pazienti a maggiore rischio immunologico).

Tuttavia, negli ultimi anni, grazie all'utilizzo della biologia molecolare (in particolare delle scienze omiche) [3] e allo sviluppo di programmi di biopsie protocollari [4], si è compreso che questa strategia aveva importanti limitazioni e il danno cronico da CNI coinvolgeva un numero di pazienti meno ampio rispetto a quanto si pensasse in passato e non tendeva ad evolvere molto rapidamente [5]. Inoltre, si è chiarito che il danno cronico del graft può comparire anche molto precocemente nel post-trapianto e avere connotazioni fisiopatologiche molto complesse [6].

Infatti, la fibrosi del rene trapiantato (meglio definita come infiammazione interstiziale/atrofia tubulare, IF/TA) non rappresentava più una semplice "cicatizzazione parenchimale", ma un processo complesso, inevitabile, dinamico e progressivo indotto da molti fattori patologici e caratterizzata da un significativo rimodellamento dell'interstizio associato ad un'eccessiva produzione/deposizione di matrice fibrillare extracellulare (ECM) [7] con conseguente alterazione della normale architettura del tessuto renale e della microperfusion che portava allo sviluppo di insufficienza d'organo (fino all'end-stage renal disease).

L'IF/TA è diagnosticabile istologicamente in circa il 40% dei reni trapiantati 3-6 mesi dopo il trapianto [8, 9] e coinvolge circa il 65% degli organi a 2 anni [10].

Dati della letteratura hanno poi sottolineato che questa condizione ha un drammatico impatto sull'outcome. Infatti, la sopravvivenza del trapianto a 10 anni è del 90-95% nei pazienti con istologia normale, dell'80-85% nei pazienti con IF/TA (senza vasculopatia) e del 40-45% nei pazienti che sviluppano IF/TA associata a vasculopatia [4].

In questo contesto fisiopatologico, inoltre, la microinfiammazione dell'organo svolge un ruolo chiave e può contribuire ad accelerare lo sviluppo delle lesioni parenchimali croniche e del danno funzionale dell'organo trapiantato [11].

L'infiammazione nelle aree cicatriziali/fibrotiche è stata ampiamente riconosciuta dalla classificazione Banff che ha coniato il termine di IF/TA con infiammazione (i-IF/TA). In particolare, i-IF/TA rispecchia il grading di Banff i (con soglie uguali), ma viene applicato solo al parenchima corticale cicatrizzato [12].

Questa condizione, segnalata per la prima volta nel 2009, è associata ad una peggiore sopravvivenza dell'organo trapiantato e rappresenta una risposta al danno tissutale acuto derivante da molte forme di insulto parenchimale (come rigetti acuti e cronici mediati da cellule T e anticorpi) innescato spesso da uno stato di sotto-immunosoppressione farmacologica [13,14].

Cenni di biologia del danno fibrotico del rene trapiantato associato alla microinfiammazione parenchimale

Da un punto di vista prettamente biologico, nel danno fibrotico associato alla micro-infiammazione, le lesioni iniziali coinvolgono diversi tipi cellulari (come macrofagi, cellule dendritiche, linfociti) [15] e implicano il coinvolgimento di cellule effettrici che mediano la deposizione di matrice extracellulare (ECM) e la fibrosi come i miofibroblasti (derivati da cellule mesenchimali residenti), i fibroblasti, i fibrociti (derivati dal midollo osseo), le cellule epiteliali, le cellule endoteliali e i periciti attivati da citochine pro-fibrotiche e fattori di crescita secreti dai linfociti dopo danno dell'endotelio [16, 17].

I fattori alla base dello sviluppo rapido di questa condizione sono molteplici, tra cui: 1) gli inevitabili effetti del danno da ischemia-riperfusione; 2) le infezioni virali (principalmente BK virus) e batteriche (spesso ricorrenti); 3) l'insorgenza e il numero di episodi di rigetto acuto cellulare ed umorale (anche forme subcliniche e borderline).

Come ampiamente riportato in letteratura [15, 17, 18], il processo fibrotico dell'organo trapiantato è indotto da una rete biologica multifattoriale e finemente regolata. Nella fase iniziale l'infiammazione intra-parenchimale, parte integrante dei meccanismi di difesa dell'ospite in risposta al danno, si attiva e, se non risolta, può portare allo sviluppo di un danno fibrotico [19]. In questo contesto, diverse citochine pro-infiammatorie, pro-fibrotiche e molecole di adesione vengono prodotte/secrete causando cambiamenti del microambiente locale e inducendo un reclutamento di cellule immuno-infiammatorie che, interagendo con diversi tipi cellulari nel rene, possono perpetuare la risposta fibrotica [19]. Inoltre, gli infiltrati infiammatori (inclusi neutrofili, macrofagi e linfociti T e B), potenziano il processo fibrotico e, attivando le cellule endoteliali capillari peritubulari, possono facilitare il reclutamento di nuove cellule mononucleate [11] che, infiltrando i tessuti, secernono citochine fibrotiche (come il TGF- β 1).

Altre citochine coinvolte nel reclutamento di cellule infiammatorie sono: la proteina chemiotattica dei monociti-1 (MCP-1), la proteina infiammatoria dei macrofagi-1 (MIP-1) e la proteina infiammatoria dei macrofagi-2 (MIP-2) [20]. La sovra-espressione di queste molecole rilasciate dalle cellule tubulari danneggiate crea un gradiente di infiltrazione di monociti/macrofagi infiammatori e cellule T nei siti interessati dal processo patologico che alimenta il pathway immuno-infiammatorio (e pro-fibrotico).

In una successiva fase di attivazione, il network biologico descritto porta all'attivazione dei miofibroblasti, un ampio gruppo di cellule coinvolte nella produzione di componenti dell'ECM e che derivano da molteplici fonti, tra cui fibroblasti, fibrociti, cellule epiteliali renali che subiscono transizione mesenchimale (EMT) e periciti [16].

Durante questa condizione, poi, le cellule subiscono profondi cambiamenti morfologici e funzionali tra cui: iper-espressione dei marcatori mesenchimali (vimentina, α -actina del muscolo liscio, fibronectina), rilascio di metalloproteinasi della matrice (MMP) -9 e -2, aumento della motilità, riduzione della citocheratina e della E-caderina [21] e cambiamento nella composizione dei proteoglicani eparan solfato (HSPG) [22].

L'HSPG più abbondante nelle cellule epiteliali tubulari renali è il sindecano-1 che promuove la riparazione e la sopravvivenza tubulare renale dopo danno, e la cui funzione sembra essere correlata al miglioramento funzionale nel trapianto renale sottoposto a danno da I/R [23]. Diversi fattori possono modulare il sindecano-1, tra cui l'eparanasi (HPSE), un'endo- β -D-glucuronidasi che scinde le catene di eparan solfato in frammenti da 4 a 7 kDa e che è stata implicata nella patogenesi di diverse malattie renali [24] tra cui la nefropatia diabetica e la patologia cronica del graft [25].

Come recentemente dimostrato dal nostro gruppo, l'HPSE risulta iper-espressa e attivata dopo danno da I/R ed è in grado di rimodellare la matrice extracellulare, di indurre EMT e di controllare alcune delle complesse interazioni tra cellule tubulari renali e macrofagi (principalmente pro-infiammatori M1) che si infiltrano nel trapianto dopo il danno [26-29]. Questo crosstalk tra i macrofagi M1 e le cellule epiteliali tubulari renali, che coinvolge anche l'apoptosi, la produzione di pattern molecolari associati al danno (DAMP) e l'up-regulation del Toll-Like Receptor (TLR)-2 e TLR-4 nelle cellule epiteliali tubulari e le cellule endoteliali vascolari [30,31], promuove il rilascio di mediatori proinfiammatori, facilita la migrazione e l'infiltrazione dei leucociti, attiva le risposte immunitarie innate e adattative e potenzia la fibrosi renale [32].

Nella genesi e progressione del danno fibrotico infiammatorio-mediato del graft, come nel rene nativo, comunque, entrano in gioco anche le principali comorbidità (come malattia cardiovascolare, diabete, dislipidemia, obesità) che direttamente, o attraverso l'attivazione del pathway infiammatorio intra-parenchimale, possono indurre fibrosi e danno cronico del graft.

Potenziali approcci terapeutici

Strategie attuali

Per poter garantire una migliore sopravvivenza del graft e rallentare la progressione del danno cronico (soprattutto infiammatorio-mediato) è necessario gestire in maniera ottimale la terapia immunosoppressiva.

Nell'ultimo ventennio, una serie di studi clinici ha analizzato l'impatto della terapia immunosoppressiva (in particolare dei CNI) sulla genesi della fibrosi del rene trapiantato e sullo sviluppo della disfunzione cronica del trapianto (CAD) [33]. Tuttavia, l'esatto meccanismo biologico alla base del danno fibrotico farmaco-indotto non è stato ancora completamente definito.

I CNI sembrano causare fibrosi d'organo inducendo vasocostrizione renale e sistemica attraverso un aumento del rilascio di endotelina-1 [34], l'attivazione del sistema renina-angiotensina, una maggiore produzione di trombossano A2 e una ridotta produzione di vasodilatatori come l'ossido nitrico e la prostaciclina [35].

Questi farmaci possono anche causare stress ossidativo attraverso il disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa mitocondriale, l'inibizione del ciclo di Krebs e l'attivazione della glicolisi anaerobica nel citosol [36]. Inoltre, l'IF/TA associato alla tossicità da CNI è correlato all'aumento dell'espressione di mRNA di TGF- β intrarenale [37]. Il TGF- β può promuovere la fibrosi interstiziale diminuendo la degradazione e aumentando la produzione di proteine della matrice extracellulare [38].

Comunque, i CNI a dosi più elevate rappresentano una possibile soluzione allo sviluppo delle lesioni indotte dal sistema immune e che si concretizzano con la genesi della *chronic active antibody mediated rejection* (CAMR). È evidente, però, che una strategia di potenziamento dei CNI può incrementare lo sviluppo di comorbidità (malattia cardio-vascolare, neoplasie, malattie infettive) riducendo potenzialmente la sopravvivenza del trapianto.

Pertanto, è indispensabile pensare a trattamenti terapeutici multi-farmacologici che permettano la minimizzazione o la sospensione dei CNI. In questa filosofia terapeutica gli inibitori di mammalian target of rapamycin (mTOR-I, Everolimus, Sirolimus) possono avere un ruolo chiave.

Bisogna, però, tenere presente che, anche per questa categoria farmacologica, la dose ha un ruolo chiave. Stanno, infatti, emergendo evidenze cliniche che sottolineano un possibile effetto duale ed opposto dose-correlato degli mTOR-I. Secondo recenti studi biomolecolari, basse dosi di questi

farmaci possano avere effetti protettivi (o neutri) sulla fibrosi del trapianto, mentre a concentrazioni elevate possono indurre fibrosi principalmente attraverso EMT delle cellule tubulari renali [39-41].

Pertanto, visti questi studi, sarebbe auspicabile proporre una strategia terapeutica “sostenibile” che contempra l’uso delle più basse dosi possibili di più farmaci immunosoppressori somministrati contemporaneamente (incluso gli mTOR-I).

Questa filosofia è stata recentemente riportata nello studio Transform [42]. Questo ampio studio osservazionale, prospettico, e retrospettivo, internazionale multicentrico ha dimostrato la non inferiorità del trattamento combinato di mTOR-I a basse dosi con CNI a basse dosi versus la classica triplice terapia immunosoppressiva (Dosi standard di CNI associate a citostatici) e il positivo impatto sullo sviluppo di comorbidità (come le infezioni virali).

Resta implicito che l’impiego di altri preparati farmacologici come il Belatacept possa essere un’utile strategia per raggiungere questo target [43].

In aggiunta, il controllo delle comorbidità (anche attraverso la modulazione della terapia immunosoppressiva) può aiutare a rallentare la progressione della fibrosi. Negli ultimi anni, gli inibitori dei trasportatori sodio-glucosio tipo 2 (SGLT2) hanno mostrato interessanti potenzialità cardio-nefro-protettive candidandosi a possibili nuove armi terapeutiche da sfruttare in ambito trapiantologico [44].

Nuovi potenziali agenti anti-fibrotici

Sulla base di recenti osservazioni, un gran numero di farmaci innovativi sono stati proposti per rallentare la progressione della fibrosi renale in nefrologia [45] (anche se scarsamente sperimentati in campo trapiantologico): (a) anticorpi neutralizzanti contro diverse isoforme di TGF- β [46]; (b) pirfenidone (5-metil-1-fenil-2(1H)-piridone), un derivato della piridina disponibile per via orale che inibisce la formazione di collagene e che mostra proprietà antifibrotiche in una varietà di modelli in vitro e animali di fibrosi epatica e renale [47], e usato per trattare la fibrosi polmonare idiopatica [48]; (c) tranilast (e i suoi derivati cinnamoyl antranilati), un farmaco antiallergico che inibisce il rilascio di mediatori chimici dai mastociti [49]; (d) THR-123 (Thrasos Therapeutics, Canada), un piccolo agonista peptidico della bone morphogenetic protein (BMP)-7, somministrato per via orale, funziona attraverso la segnalazione della activin-like kinase (ALK3) per sopprimere l’infiammazione, l’apoptosi e l’EMT, e la fibrosi in diversi modelli murini di danno renale acuto e cronico [50]; (e) pentossifillina, inibitore della fosfodiesterasi (PDE) che ha dimostrato di inibire l’espressione di connective tissue growth factor (CTGF) indotta da TGF- β 1 così come l’espressione di collagene di tipo I e α -SMA [51]; (f) inibitore di Nox1/4, GKT137831 (Genkyotex) che ha soppresso la produzione di ROS e l’espressione genica fibrotica e ha attenuato la fibrosi (principalmente nel modello animale con nefropatia diabetica) [52].

Tuttavia, al momento, nessuno di loro è stato testato nel trapianto di rene. Pertanto, dovrebbero essere intrapresi più studi e sperimentazioni cliniche per valutare meglio la loro efficacia terapeutica e tossicità in questo contesto clinico.

Conclusioni

La nefropatia cronica del trapianto è un evento che può iniziare molto precocemente nel post-trapianto e che, in una larga percentuale dei casi, è associato all’attivazione di un pathway immuno-infiammatorio intra-parenchimale. Al momento, sono in corso una serie di studi finalizzati all’analisi e all’identificazione di nuovi elementi potenzialmente coinvolti nell’ esteso pathway pro-fibrotico del rene trapiantato, ma non dobbiamo dimenticare che fattori come la terapia immunosoppressiva,

l'ipertensione, l'anemia e l'obesità sono ancora implicati nella genesi del danno cronico "non immuno-infiammatorio" del graft. In attesa di innovativi agenti terapeutici, l'utilizzo "ragionato e personalizzato" degli attuali farmaci antirigetto (principalmente CNI+mTOR-I) e l'attenzione alle comorbidità (non dimenticando di dedicare tempo al follow-up e incrementare il network multi-specialistico) è una via da perseguire per ottenere un accettabile rallentamento delle lesioni croniche del graft. Tutte queste considerazioni, affrontate nel Congresso Nefrologico di Grado del 2022, hanno infine fatto emergere che c'è ancora tanto da fare non solo per comprendere le basi fisiopatologiche del danno cronico del rene trapiantato, ma anche per individuare biomarkers predittivi e nuovi target terapeutici utili per arginare l'evoluzione di questa condizione clinica.

BIBLIOGRAFIA

1. Caletti C, Manuel Ferraro P, Corvo A, Tessari G, Sandrini S, Capelli I, Minetti E, Gesualdo L, Girolomoni G, Boschiero L, Lupo A, Zaza G. Impact of 3 Major Maintenance Immunosuppressive Protocols on Long-term Clinical Outcomes: Result of a Large Multicenter Italian Cohort Study Including 5635 Renal Transplant Recipients. *Transplant Proc.* 2019 Jan-Feb;51(1):136-139, <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2018.02.209>
2. Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, Vítko S, Nashan B, Gürkan A, Margreiter R, Hugo C, Grinyó JM, Frei U, Vanrenterghem Y, Daloz P, Halloran PF. ELITE-Symphony Study. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med.* 2007 Dec 20;357(25):2562-75, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa067411>
3. Zaza G, Granata S, Tomei P, Dalla Gassa A, Lupo A. Personalization of the immunosuppressive treatment in renal transplant recipients: the great challenge in "omics" medicine. *Int J Mol Sci.* 2015 Feb 17;16(2):4281-305, <https://doi.org/10.3390/ijms16024281>.
4. Serón D, Moreso F, Ramón JM et al. Protocol renal allograft biopsies and the design of clinical trials aimed to prevent or treat chronic allograft nephropathy. *Transplantation.* 2000 May 15;69(9):1849-55, <https://doi.org/10.1097/00007890-200005150-00019>
5. Stegall MD, Park WD, Larson TS et al. The histology of solitary renal allografts at 1 and 5 years after transplantation. *Am J Transplant.* 2011 Apr;11(4):698-707. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2010.03312.x>.
6. Granata S, Benedetti C, Gambaro G, Zaza G. Kidney allograft fibrosis: what we learned from latest translational research studies. *J Nephrol.* 2020 Dec;33(6):1201-1211. <https://doi.org/10.1007/s40620-020-00726-z>
7. Mannon RB, Matas AJ, Grande J, Leduc R et al. Inflammation in areas of tubular atrophy in kidney allograft biopsies: a potent predictor of allograft failure. *Am J Transplant.* 2010 Sep;10(9):2066-73, <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2010.03240.x>.
8. Melk A, Schmidt BM, Vongwiwatana A, Rayner DC, Halloran PF. Increased expression of senescence-associated cell cycle inhibitor p16INK4a in deteriorating renal transplants and diseased native kidney. *Am J Transplant.* 2005 Jun;5(6):1375-82, <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.00846.x>.
9. Dimény E, Wahlberg J, Larsson E, Fellström B. Can histopathological findings in early renal allograft biopsies identify patients at risk for chronic vascular rejection? *Clin Transplant.* 1995 Apr;9(2):79-84.
10. Isoniemi HM, Krogerus L, von Willebrand E, Taskinen E, Ahonen J, Häyry P. Histopathological findings in well-functioning, long-term renal allografts. *Kidney Int.* 1992 Jan;41(1):155-60, <https://doi.org/10.1038/ki.1992.21>
11. Torres IB, Moreso F, Sarró E, Meseguer A, Serón D. The Interplay between inflammation and fibrosis in kidney transplantation. *Biomed Res Int.* 2014;2014:750602. <https://doi.org/10.1155/2014/750602>.
12. Roufosse C, Simmonds N, Clahsen-van Groningen M et al. A 2018 Reference Guide to the Banff Classification of Renal Allograft Pathology. *Transplantation.* 2018 Nov;102(11):1795-1814. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002366>
13. Modena BD, Kurian SM, Gaber LW, Waalen J, Su AI et al. Gene Expression in Biopsies of Acute Rejection and Interstitial Fibrosis/Tubular Atrophy Reveals Highly Shared Mechanisms That Correlate With Worse Long-Term Outcomes. *Am J Transplant.* 2016 Jul;16(7):1982-98, <https://doi.org/10.1111/ajt.13728>.
14. Lefaucheur C, Gosset C, Rabant M et al. T cell-mediated rejection is a major determinant of inflammation in scarred areas in kidney allografts. *Am J Transplant.* 2018 Feb;18(2):377-390, <https://doi.org/10.1111/ajt.14565>.
15. Boor P, Floege J. Renal allograft fibrosis: biology and therapeutic targets. *Am J Transplant.* 2015 Apr;15(4):863-86, <https://doi.org/10.1111/ajt.13180>.
16. Mack M, Yanagita M. Origin of myofibroblasts and cellular events triggering fibrosis. *Kidney Int.* 2015 Feb;87(2):297-307, <https://doi.org/10.1038/ki.2014.287>.
17. Li L, Greene I, Readhead B, Menon MC, Kidd BA et al. Novel Therapeutics Identification for Fibrosis in Renal Allograft Using Integrative Informatics Approach. *Sci Rep.* 2017 Jan 4;7:39487. <https://doi.org/10.1038/srep39487>.
18. Shrestha BM, Haylor J. Biological pathways and potential targets for prevention and therapy of chronic allograft nephropathy. *Biomed Res Int.* 2014;2014:482438, <https://doi.org/10.1155/2014/482438>.
19. Liu Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol.* 2011 Oct 18;7(12):684-96, <https://doi.org/10.1038/nrneph.2011.149>.
20. Anders HJ, Vielhauer V, Schlöndorff D. Chemokines and chemokine receptors are involved in the resolution or progression of renal disease. *Kidney Int.* 2003 Feb;63(2):401-15.

- <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00750.x>.
21. Carew RM, Wang B, Kantharidis P. The role of EMT in renal fibrosis. *Cell Tissue Res.* 2012 Jan;347(1):103-16, <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1227-1>.
 22. Celie JW, Rutjes NW, Keuning ED et al. Subendothelial heparan sulfate proteoglycans become major L-selectin and monocyte chemoattractant protein-1 ligands upon renal ischemia/reperfusion. *Am J Pathol.* 2007 Jun;170(6):1865-78, <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070061>.
 23. Celie JW, Katta KK, Adepu S et al. Tubular epithelial syndecan-1 maintains renal function in murine ischemia/reperfusion and human transplantation. *Kidney Int.* 2012 Apr;81(7):651-61, <https://doi.org/10.1038/ki.2011.425>.
 24. Garsen M, Rops AL, Rabelink TJ, Berden JH, van der Vlag J. The role of heparanase and the endothelial glycocalyx in the development of proteinuria. *Nephrol Dial Transplant.* 2014 Jan;29(1):49-55, <https://doi.org/10.1093/ndt/gft410>.
 25. Shafat I, Agbaria A, Boaz M, Schwartz D, Baruch R, Nakash R, Ilan N, Vlodyavsky I, Weinstein T. Elevated urine heparanase levels are associated with proteinuria and decreased renal allograft function. *PLoS One.* 2012;7(9):e44076, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044076>.
 26. Masola V, Zaza G, Secchi MF, Gambaro G, Lupo A, Onisto M. Heparanase is a key player in renal fibrosis by regulating TGF- β expression and activity. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Sep;1843(9):2122-8, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.06.005>.
 27. Masola V, Bellin G, Vischini G, Dall'Olmo L, Granata S, Gambaro G, Lupo A, Onisto M, Zaza G. Inhibition of heparanase protects against chronic kidney dysfunction following ischemia/reperfusion injury. *Oncotarget.* 2018 Nov 16;9(90):36185-36201, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26324>.
 28. Masola V, Zaza G, Onisto M, Lupo A, Gambaro G. Impact of heparanase on renal fibrosis. *J Transl Med.* 2015 Jun 4;13:181. <https://dx.doi.org/10.1186/s12967-015-0538-5>.
 29. Masola V, Zaza G, Bellin G, Dall'Olmo L, Granata S, Vischini G, Secchi MF, Lupo A, Gambaro G, Onisto M. Heparanase regulates the M1 polarization of renal macrophages and their crosstalk with renal epithelial tubular cells after ischemia/reperfusion injury. *FASEB J.* 2018 Feb;32(2):742-756. <https://doi.org/10.1096/fj.201700597R>.
 30. Vesey DA, Cheung CW, Cuttle L, Endre ZA, Gobé G, Johnson DW. Interleukin-1 β induces human proximal tubule cell injury, α -smooth muscle actin expression and fibronectin production. *Kidney Int.* 2002 Jul;62(1):31-40. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00668.x>.
 31. Goodall KJ, Poon IK, Phipps S, Hulett MD. Soluble heparan sulfate fragments generated by heparanase trigger the release of pro-inflammatory cytokines through TLR-4. *PLoS One.* 2014 Oct 8;9(10):e109596, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109596>.
 32. Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol.* 2010 Dec;10(12):826-37. <https://doi.org/10.1038/nri2873>.
 33. Naesens M, Kuypers DR, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009 Feb;4(2):481-508. <https://doi.org/10.2215/CJN.04800908>.
 34. Prókai Á, Csohány R, Sziksz E et al. Calcineurin-inhibition Results in Upregulation of Local Renin and Subsequent Vascular Endothelial Growth Factor Production in Renal Collecting Ducts. *Transplantation.* 2016 Feb;100(2):325-333. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000961>.
 35. Li X, Zhuang S. Recent advances in renal interstitial fibrosis and tubular atrophy after kidney transplantation. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2014 Oct 2;7:15. <https://doi.org/10.1186/1755-1536-7-15>.
 36. Fournier N, Ducet G, Crevat A. Action of cyclosporine on mitochondrial calcium fluxes. *J Bioenerg Biomembr.* 1987 Jun;19(3):297-303. <https://doi.org/10.1007/BF00762419>.
 37. Khanna A, Plummer M, Bromberek C, Bresnahan B, Hariharan S. Expression of TGF- β and fibrogenic genes in transplant recipients with tacrolimus and cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int.* 2002 Dec;62(6):2257-63. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00668.x>.
 38. Feldman G, Kiely B, Martin N, Ryan G, McMorro T, Ryan MP. Role for TGF- β in cyclosporine-induced modulation of renal epithelial barrier function. *J Am Soc Nephrol.* 2007 Jun;18(6):1662-71, <https://doi.org/10.1681/ASN.2006050527>.
 39. Masola V, Zaza G, Granata S, Gambaro G, Onisto M, Lupo A. Everolimus-induced epithelial to mesenchymal transition in immortalized human renal proximal tubular epithelial cells: key role of heparanase. *J Transl Med.* 2013 Nov 20;11:292, <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-292>.
 40. Masola V, Carraro A, Zaza G, Bellin G, Montin U, Violi P, Lupo A, Tedeschi U. Epithelial to mesenchymal transition in the liver field: the double face of Everolimus in vitro. *BMC Gastroenterol.* 2015 Sep 14;15:118, <https://doi.org/10.1186/s12876-015-0347-6>.
 41. Granata S, Santoro G, Masola V, Tomei P, Sallustio F, Pontrelli P, Accetturo M, Antonucci N, Carratù P, Lupo A, Zaza G. In Vitro Identification of New Transcriptomic and

- miRNomic Profiles Associated with Pulmonary Fibrosis Induced by High Doses Everolimus: Looking for New Pathogenetic Markers and Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci*. 2018 Apr 20;19(4):1250, <https://doi.org/10.3390/ijms19041250>.
42. Berger SP, Sommerer C, Witzke O et al. Two-year outcomes in de novo renal transplant recipients receiving everolimus-facilitated calcineurin inhibitor reduction regimen from the TRANSFORM study. *Am J Transplant*. 2019 Nov;19(11):3018-3034. <https://doi.org/10.1111/ajt.15480>.
 43. Kumar D, LeCorchick S, Gupta G. Belatacept As an Alternative to Calcineurin Inhibitors in Patients with Solid Organ Transplants. *Front Med (Lausanne)*. 2017 May 19;4:60, <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00060>.
 44. Codina S, Manonelles A, Tormo M, Sola A, Cruzado JM. Chronic Kidney Allograft Disease: New Concepts and Opportunities. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Jul 14;8:660334. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.660334>.
 45. Lee SY, Kim SI, Choi ME. Therapeutic targets for treating fibrotic kidney diseases. *Transl Res*. 2015 Apr;165(4):512-30. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2014.07.010>.
 46. Murphy SR, Dahly-Vernon AJ, Dunn KM, Chen CC, Ledbetter SR, Williams JM, Roman RJ. Renoprotective effects of anti-TGF- β antibody and antihypertensive therapies in Dahl S rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2012 Jul 1;303(1):R57-69. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00263.2011>.
 47. Chen JF, Ni HF, Pan MM, Liu H, Xu M, Zhang MH, Liu BC. Pirfenidone inhibits macrophage infiltration in 5/6 nephrectomized rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013 Mar 15;304(6):F676-85. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00507.2012>.
 48. Noble PW, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Glassberg MK, Kardatzke D, King TE Jr, Lancaster L, Sahn SA, Swarcberg J, Valeyre D, du Bois RM; CAPACITY Study Group. Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials. *Lancet*. 2011 May 21;377(9779):1760-9, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60405-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60405-4).
 49. Gilbert RE, Zhang Y, Williams SJ, Zammit SC, Stapleton DI, Cox AJ, Krum H, Langham R, Kelly DJ. A purpose-synthesised anti-fibrotic agent attenuates experimental kidney diseases in the rat. *PLoS One*. 2012;7(10):e47160, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047160>.
 50. Sugimoto H, LeBleu VS, Bosukonda D et al. Activin-like kinase 3 is important for kidney regeneration and reversal of fibrosis. *Nat Med*. 2012 Feb 5;18(3):396-404, <https://doi.org/10.1038/nm.2629>.
 51. Lin SL, Chen RH, Chen YM, Chiang WC, Lai CF, Wu KD, Tsai TJ. Pentoxifylline attenuates tubulointerstitial fibrosis by blocking Smad3/4-activated transcription and profibrogenic effects of connective tissue growth factor. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Sep;16(9):2702-13. <https://doi.org/10.1681/ASN.2005040435>.
 52. Gorin Y, Cavaglieri RC, Khazim K, Lee DY et al. Targeting NADPH oxidase with a novel dual Nox1/Nox4 inhibitor attenuates renal pathology in type 1 diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015 Jun 1;308(11):F1276-87, <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00396.2014>.