

LE CHEMOCHINE NEL TRAPIANTO RENALE: POSSIBILI BERSAGLI TERAPEUTICI E NUOVI PARAMETRI CLINICI

B. Mazzinghi¹, G.S. Netti², E. Lazzeri¹, P. Romagnani¹

¹ Laboratorio Interdipartimentale di Nefrologia Cellulare e Molecolare, Dipartimento di Fisiopatologia Clinica, Centro d'Eccellenza per la Ricerca, il Trasferimento e l'Alta Formazione, Università degli Studi, Firenze

² Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi, Foggia

Chemokines: possible therapeutic targets and useful clinical parameters in renal transplantation

Chemokines are a family of small, structurally related cytokines that regulate trafficking of different subsets of leukocytes, thus critically regulating inflammation. The chemokine system influences allograft biology at 3 main levels: 1) the process of ischemia-reperfusion injury, 2) the induction of transplant tolerance, and 3) the pathogenesis of acute rejection and chronic allograft nephropathy. Accordingly, following ischemia/reperfusion in a rat model, CXCR2 produced at the graft level attracts and activates granulocytes, which in turn promotes graft damage. Moreover, in some experimental models CCR4 recruits T regulatory cells and mediates transplant tolerance. Furthermore, the discovery of the involvement of CXCR3 in the induction of the alloresponse to transplant suggests that this chemokine receptor might represent an important target for treatment of both acute rejection and chronic allograft nephropathy. Indeed, CXCR3 ligands play a pivotal role in the initiation and amplification of host alloresponses and also alter vascular cell functions, which explains their critical role not only in the development of acute rejection, but also in the pathogenesis of chronic allograft nephropathy, where both immune- and non-immune-mediated mechanisms are involved. Finally, we have recently demonstrated that the pretransplant serum level of the CXCR3 ligand IP-10/CXCL10 is a clinically useful parameter for the identification of subjects with a high risk of acute rejection, chronic allograft nephropathy, and graft failure. This simple test could contribute to the prevention of acute rejections and the individualization of immunosuppressive therapies. (G Ital Nefrol 2007; 24: 212-20)

KEY WORDS:

CCR4,
Chemochine,
CXCR2,
CXCR3,
Delayed graft
function,
Rejection

PAROLE CHIAVE:

CCR4,
Chemochine,
CXCR2,
CXCR3,
Delayed graft
function,
Rigetto

✉ Indirizzo degli Autori:

Prof.ssa Paola Romagnani
Laboratorio Interdipartimentale
di Nefrologia Cellulare e Molecolare
Dipartimento di Fisiopatologia
Clinica
Centro d'Eccellenza per la Ricerca
Trasferimento e l'Alta formazione
Viale Pieraccini, 6
50139 Firenze
e-mail: p.romagnani@dfc.unifi.it

INTRODUZIONE

Il termine "chemochine" definisce una famiglia di piccole citochine (8-10 Kd), strutturalmente simili fra loro, dotate di attività chemiotattica nei confronti di diversi sottotipi leucocitari. La nomenclatura delle chemochine è determinata dalla presenza di residui di cisteina all'estremità amino-terminale e permette di distinguere quattro famiglie in base alla sequenza aminoacidica: chemochine CXC, CC, CX3C e C (dove X è un aminoacido qualsiasi) (1). Attualmente, la nomenclatura ufficiale ha classificato 46 chemochine umane (Tab. I) (1). Queste molecole sono note per la loro capacità di regolare le varie fasi del reclutamento di diverse sottopopolazioni leucocitarie nella sede dell'infiammazio-

ne, incluse l'attivazione leucocitaria, l'adesione, la chemiotassi e la tras migrazione attraverso la barriera endoteliale, ma esplicano anche importanti funzioni di controllo delle risposte immunitarie effettrici (1). Le chemochine svolgono, inoltre, molteplici importanti funzioni oltre al loro critico ruolo nel controllo della risposta immunitaria, quali la regolazione dello sviluppo embrionale, la riparazione delle ferite, il controllo dell'angiogenesi e della crescita e diffusione tumorale, fino alla recente scoperta del loro ruolo critico nel reclutamento delle cellule staminali (1, 2). Le chemochine legano specifici recettori accoppiati a proteine G (1, 2) ed a tutt'oggi sono stati identificati 20 diversi recettori chemochinici (Tab. I) (1-3). La specificità della funzione delle chemochine è legata all'espressione

TABELLA I - NOMENCLATURA DELLE CHEMOCHINE CON I RISPETTIVI RECETTORI

Vecchia nomenclatura	Abbreviazione	Nuova nomenclatura	Recettori delle chemochine
CHEMOCHINE "CXC"			
Growth-Related Oncogene-alpha	GRO- α	CXCL1	CXCR2>CXCR1
Growth-Related Oncogene-beta	GRO- β	CXCL2	CXCR2
Growth-Related Oncogene-gamma	GRO- γ	CXCL3	CXCR2
Platelet Factor 4	PF4	CXCL4	CXCR3-B
Epithelial-cell-derived Neutrophil Attractant 78	ENA-78	CXCL5	CXCR2
Granulocyte Chemotactic Protein 2	GCP-2	CXCL6	CXCR1, CXCR2
Neutrophil-Activating Peptide 2	NAP-2	CXCL7	CXCR2
Interleukin 8	IL-8	CXCL8	CXCR1, CXCR2
Monokine induced by Interferon γ	Mig	CXCL9	CXCR3-A, CXCR3-B
Interferon γ inducible protein 10	IP-10	CXCL10	CXCR3-A, CXCR3-B
Interferon T-cell Alpha Chemoattractant	I-TAC	CXCL11	CXCR3-A, CXCR3-B, CXCR7
Stromal Derived Factor 1 alpha/beta	SDF-1 α/β	CXCL12	CXCR4, CXCR7
B Lymphocyte Chemokine/ B Cell-Attracting chemokine 1	BLC/BCA-1	CXCL13	CXCR5
Breast And Kidney-expressed chemokine	BRAK	CXCL14	Sconosciuto
Lungkine/WECHE	-	CXCL15	Sconosciuto
-	-	CXCL16	CXCR6
CHEMOCHINE "XC"			
Single Cysteine Motif 1 alpha/ Lymphotactin	SCM-1 α	XCL1	XCR1
Single Cysteine Motif 1 beta	SCM-1 β	XCL2	XCR1
CHEMOCHINE "CX3C"			
Fraktalkine		CX3CL1	CX3CR1
CHEMOCHINE "CC"			
I-309	-	CCL1	CCR8
Monocyte Chemotactic Protein 1	MCP-1	CCL2	CCR2,CCR11
Macrophage Inflammatory Protein 1 alpha	MIP-1 α	CCL3	CCR1,CCR5
Macrophage Inflammatory Protein 1 beta	MIP-1 β	CCL4	CCR5
Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted	RANTES	CCL5	CCR1,CCR3,CCR5
Macrophage inflammatory protein-Related Protein-1	C10/MRP-1	CCL6	Sconosciuto
Membrane Cofactor Protein 3	MCP-3	CCL7	CCR1,CCR2,CCR3,CCR11
Membrane Cofactor Protein 2	MCP-2	CCL8	CCR3,CCR11
Macrophage Inflammatory Protein 1 gamma	MIP-1 γ	CCL9/10	Sconosciuto
Eotaxin	-	CCL11	CCR3
Monocyte Chemoattractant Protein 5	MCP-5	CCL12	CCR2
Monocyte Chemoattractant Protein 4	MCP-4	CCL13	CCR2,CCR3,CCR11
Hemofiltrate CC Chemokine 1	HCC- 1	CCL14	CCR1
Hemofiltrate CC Chemokine 2	HCC-2	CCL15	CCR1,CCR3
Liver-Expressed Chemokine	LEC	CCL16	CCR1,CCR8
Thymus- and Activation-Regulated Chemokine	TARC	CCL17	CCR4
Pulmonary- and Activation-Regulated Chemokine	PARC	CCL18	Sconosciuto
EBV-induced molecule 1 Ligand Chemokine	ELC	CCL19	CCR7,CCR10
Liver- and Activation-Regulated Chemokine	LARC	CCL20	CCR6
Secondary Lymphoid-tissue Chemokine	SLC	CCL21	CCR7,CCR10
Macrophage-Derived Chemokine	MDC	CCL22	CCR4
Myeloid Progenitor Inhibitory Factor	MPIF-1	CCL23	CCR1
Eotaxin 2	-	CCL24	CCR3
Thymus-Expressed Chemokine	TECK	CCL25	CCR9
Eotaxin 3	-	CCL26	CCR3
Cutaneous T-cell-Attracting Chemokine	CTACK	CCL27	CCR10
Mammary-Enriched Chemokine	MEC	CCL28	CCR3/CCR10

selettiva di un particolare recettore da parte di uno specifico sottotipo leucocitario. Ogni chemochina lega solitamente più di un recettore ed ogni recettore lega più di una chemochina, una situazione che conferisce a questo sistema una particolare ridondanza, peraltro caratteristica di tutti i sistemi biologici critici per l'evoluzione della specie (1-3). La ridondanza consente, infatti, di ovviare alla eventuale mancanza o al mal funzionamento di una chemochina, in quanto le funzioni da essa mediate possono essere vicariate da altre chemochine (1-3). Tuttavia, questa ridondanza rende difficile l'utilizzazione delle chemochine come bersagli terapeutici, infatti, la soppressione di una sola chemochina o di un solo recettore difficilmente consente la soppressione dell'intero processo infiammatorio. Nonostante questo limite, risultati ottenuti in diversi modelli sperimentali suggeriscono la possibilità che alcuni recettori chemochinici possano costituire adeguati bersagli terapeutici almeno in alcune condizioni infiammatorie (1).

TEST DI VERIFICA

1) Le chemochine legano:

- Tirosin-kinasi
- Recettori accoppiati a proteine G
- Recettori di tipo m
- Recettori ormonali
- Recettori nucleari.

2) Le chemochine sono classificate in base:

- Al *folding* delle proteine
- Al numero di amminoacidi
- Alla posizione del residuo amminoacidico di cisteina all'estremità NH₂
- Alla posizione del residuo amminoacidico di cisteina all'estremità COOH
- Al numero di ligandi.

3) Le chemochine non controllano:

- L'angiogenesi
- La crescita tumorale
- Lo sviluppo embrionale
- Il reclutamento leucocitario
- Le sinapsi neuronali.

La risposta corretta alle domande sarà disponibile sul sito internet www.sin-italy.org/gjn e in questo numero del giornale cartaceo dopo il Notiziario SIN

LE CHEMOCHINE NEL TRAPIANTO RENALE

Nel corso degli ultimi anni, numerosi studi hanno dimostrato il ruolo determinante di alcuni recettori delle chemochine nella patogenesi delle risposte immunologiche in corso di trapianto d'organo (4-6). Le chemochine possono influenzare almeno tre aspetti della biologia del trapianto: 1) le chemochine reclutano i leucociti a seguito del danno da ischemia-riperfusion, e sono alla base della patogenesi della "delayed graft function"; 2) alcune chemochine svolgono un ruolo importante nell'induzione della tolleranza al trapianto; 3) alcune chemochine esplicano un ruolo critico nella patogenesi del rigetto acuto e della nefropatia cronica da trapianto (4-6).

"DELAYED GRAFT FUNCTION"

Il danno da ischemia-riperfusion, rappresenta la causa principale della "delayed graft function" (DGF), la ritardata ripresa funzionale che si verifica in alcuni soggetti trapiantati e che si associa ad un aumentato rischio di rigetto acuto e ad una ridotta sopravvivenza dell'organo trapiantato (7). La DGF è la complicanza più frequente nell'immediato periodo post-trapianto (25-35% di tutti i pazienti che hanno ricevuto un rene da donatore cadavere) ed in taluni casi può superare anche il 50%, soprattutto nei pazienti che hanno ricevuto un organo da donatore marginale (7). Poiché l'instaurarsi di un danno da ripersione post-ischemia, è mediato dal massiccio reclutamento di polimorfonucleati neutrofili e poiché è noto che la chemochina IL-8/CXCL8 svolge un ruolo determinante nel reclutamento e nell'attivazione degli stessi neutrofili tramite il recettore CXCR2 (1), è verosimile che l'inattivazione della via CXCL8/CXCR2 possa prevenire l'insorgenza della DGF stessa dopo un trapianto di rene. Un inibitore circolante di CXCL8, la reparixina, ha già dimostrato la capacità di ridurre l'infiltrato di PMN ed il danno tissutale in modelli di trapianto di rene e di polmone nel ratto, mentre "trials" clinici di fase I ne hanno dimostrato la sicurezza d'uso nell'uomo (8). È attualmente in fase di reclutamento un "trial" clinico randomizzato doppio cieco di fase II che si propone di valutare la sicurezza e l'efficacia dell'utilizzo della reparixina nel prevenire l'insorgenza della DGF dopo trapianto renale (www.clinicaltrials.gov, ID: NCT00248040).

Un'altra chemochina coinvolta nella patogenesi della DGF sembra essere Fractalkine/CX3CL1. Infatti, la delezione o il blocco del suo recettore CX3CR1 è in grado di attenuare la presenza di infiltrato macrofagico ed inibisce l'espressione di PDGF-B, riducendo conseguentemente l'insorgenza di fibrosi interstiziale e la disfunzione renale dopo danno da ischemia-riperfusion.

ne. Questi risultati suggeriscono che il recettore CX3CR1 ed il suo ligando CX3CL1 potrebbero avere un ruolo nei processi molecolari della fibrosi interstiziale dopo danno da ischemia-riperfusion e anche nell'uomo (9).

TOLLERANZA AL TRAPIANTO

Dati recenti suggeriscono che alcuni recettori delle chemochine possano anche mediare l'induzione della tolleranza al trapianto e favorire la soppressione della risposta effettrice. Negli ultimi anni, infatti, è stata identificata una specifica sottopopolazione linfocitaria T capace di sopprimere le risposte effettrici (10). Questa popolazione di linfociti è stata denominata Treg ("T regulatory") ed è caratterizzata dall'espressione di uno specifico fattore di trascrizione, Foxp3, la cui assenza o mutazione determina la comparsa di malattie autoimmuni e di rigetto del trapianto (10). In topi che sviluppano tolleranza al trapianto, l'espressione di Foxp3 aumenta, ed è legata al reclutamento di cellule Treg Foxp3 positive da parte della chemochina MDC/CCL22. Infatti, topi "knockout" per il recettore di CCL22, CCR4, non sviluppano tolleranza al trapianto (11). Anche le cellule V α 14+NKT regolano la risposta immunitaria effettrice (12). Queste cellule esprimono CXCR6, ed il blocco dell'interazione tra CXCR6 ed il suo ligando CXCL16 impedisce lo sviluppo della tolleranza al trapianto e favorisce la comparsa di rigetto acuto (11). Pertanto, alcuni recettori delle chemochine sono anche in grado di mediare la comparsa di tolleranza nei confronti dell'organo trapiantato.

RIGETTO ACUTO E NEFROPATIA CRONICA DA TRAPIANTO

In corso di rigetto acuto si verifica un incremento massivo dell'espressione di chemochine. Numerose chemochine sono state descritte nelle biopsie di soggetti affetti da rigetto acuto di trapianto renale (4, 5, 13, 14). Nella sede del rigetto le chemochine, promuovendo l'espressione di molecole d'adesione da parte dell'endotelio vascolare flogistico, coordinano l'adesione e la penetrazione tissutale dei leucociti circolanti (4, 5, 13, 14). In virtù della selettiva espressione recettoriale da parte di quest'ultimi, le chemochine possono operare un'azione chemiotattica diversificata sulle cellule circolanti, che porta al reclutamento di alcuni sottotipi leucocitari e non di altri. Sul piano istologico e istochimico, ciò corrisponde alla presenza di un infiltrato flogistico funzionalmente polarizzato nell'organo che va incontro a rigetto. In corso di trapianto renale, in frammenti biopatici ottenuti da soggetti

affetti da rigetto acuto, è stata dimostrata l'espressione delle chemochine RANTES/CCL5, MCP-1/CCL2, IL-8/CXCL8, MIP-1 α /CCL3, ENA-78/CXCL5 e MIP-1 β /CCL4, IP-10/CXCL10, Mig/CXCL9, I-TAC/CXCL11, ELC/CCL19, SLC/CCL21 (4, 5, 13, 14). Tuttavia, modelli sperimentali negli animali "knockout" per i vari recettori delle chemochine hanno inequivocabilmente dimostrato che soltanto alcuni recettori chemochinici svolgono un ruolo critico nella patogenesi del rigetto acuto di trapianto e tra questi in particolare CCR5, CCR7 e CXCR3 (4, 5, 13, 14). Questo significa che, mentre alcune chemochine funzionano come fattori d'innescio del reclutamento leucocitario, altre vengono prodotte a seguito dell'infiltrazione del tessuto e costituiscono esclusivamente un fattore d'amplificazione, ma non svolgono alcun ruolo nella patogenesi del rigetto acuto. Ci sono ormai numerose evidenze che anche la patogenesi della nefropatia cronica da trapianto sia legata alla sintesi di alcune chemochine. Infatti, topi "knockout" per il recettore chemochinico CXCR3 non mostrano solo la scomparsa del rigetto acuto, ma accettano permanentemente il trapianto (15).

CCR1 - Un ruolo rilevante nella patogenesi del danno immunomediato dopo trapianto d'organo è svolto dal recettore chemochinico CCR1 e dai suoi ligandi MIP-1 α /CCL3, RANTES/CCL5, MCP-3/CCL7, HCC-1/CCL14, LEC/CCL16 e PIF-1/CCL23 (16). Diversi tipi cellulari del sistema immune, quali linfociti T, polimorfonucleati neutrofili, monociti/macrofagi e cellule dendritiche, possono esprimere CCR1. Inoltre, tra i recettori delle chemochine proinfiammatorie, CCR1 svolge un ruolo determinante e non ridondante nel favorire l'adesione dei leucociti all'endotelio attivato e la migrazione transendoteliale. Pertanto, CCR1 costituisce un bersaglio terapeutico promettente ed un suo antagonista recettoriale (BX471) ha già mostrato di ridurre l'infiltrato infiammatorio e di migliorare l'*outcome* in modelli sperimentali di trapianto renale (17, 18).

CCR5 - Topi "knockout" per il recettore chemochinico CCR5 mostrano un significativo incremento della sopravvivenza dell'organo trapiantato (19). Inoltre, in biopsie di soggetti affetti da rigetto acuto di trapianto renale, sono stati osservati livelli aumentati di tutti i ligandi di CCR5 (20). In particolare, un ruolo cruciale sembra essere svolto dal principale ligando di CCR5, la chemochina CCL5. Il ruolo funzionale di CCL5 e dei suoi recettori è stato recentemente valutato in modelli murini di rigetto acuto del trapianto utilizzando un antagonista del recettore di CCL5, Met-RANTES. Il trattamento con Met-RANTES e basse dosi di ciclosporina riduceva significativamente il danno vascolare, tubulare ed interstiziale associato all'insorgenza di rigetto acuto. Inoltre, negli animali trattati si osservava una

riduzione della proteinuria, un miglioramento della glomerulosclerosi ed una riduzione dell'infiltrato infiammatorio (21).

Anche altri tipi di osservazioni confermano il ruolo di CCR5 nella risposta immunitaria al trapianto. Uno studio su 163 soggetti trapiantati di rene ha osservato l'eventuale ruolo predittivo di alcune varianti genetiche del CCR5, CCR5 δ 32 e CCR5-59029-A/G (22). I soggetti omozigoti per la variante genica CCR5 δ 32 mostrano una sopravvivenza significativamente aumentata. Pertanto, il rischio di rigetto acuto nei soggetti sottoposti a trapianto di rene può essere associata a determinate varianti genetiche di CCR5.

CCR7 - Anche le chemochine CCL19 e CCL21 ed il loro recettore CCR7 svolgono un ruolo importante in corso di rigetto acuto e di nefropatia cronica del trapianto, in quanto sono essenziali per l'instaurarsi di una risposta immune cellulo-mediata (23). Infatti, il legame CCL19/CCR7 in particolare favorisce il reclutamento delle cellule dendritiche presentanti l'antigene nelle aree T degli organi linfoidi secondari e l'interazione con i linfociti T. In un modello murino di trapianto allogenico, è stato osservato che il trattamento con il prodotto di fusione fra IgG e la chemochina CCL19 prolungava la percentuale di sopravvivenza del trapianto fino al 90% e l'analisi istologica del rene trapiantato confermava l'assenza di una risposta immunologica ed una ridotta necrosi tubulare (23).

CXCR3, IL RECETTORE CHEMOCHINICO CHIAVE NELLA RISPOSTA IMMUNITARIA AL TRAPIANTO

Nel corso degli ultimi anni è stato dimostrato che il rigetto acuto di trapianto è contrassegnato dalla progressiva espressione delle chemochine CXCL10, CXCL9, CXCL11 e dalla corrispondente infiltrazione di cellule CD3+ (linfociti T) attivate esprimenti CXCR3 (20). Inoltre, la valutazione *in vivo* del ruolo patogenetico di CXCR3 sul rigetto d'organo è stata ulteriormente confermata dall'utilizzo di modelli murini privi del gene codificante per il CXCR3. In particolare, in topi "knockout" per CXCR3 (CXCR3 $^{-/-}$) si osservavano sopravvivenze del trapianto superiori a 60 giorni, mentre i topi "wild-type" CXCR3 $^{+/+}$ rigettavano il trapianto entro una settimana (15). Inoltre, i topi CXCR3 $^{-/-}$, se trattati con un breve ciclo di ciclosporina A, mantenevano permanentemente il trapianto senza evidenza di rigetto acuto. Infine, anche l'uso di anticorpi monoclonali anti-CXCR3 in topi CXCR3 $^{+/+}$ sia se somministrati al momento del trapianto, sia quando il rigetto era già in atto (15) prolungava in modo significativo la sopravvivenza del trapianto. I trapianti dei topi CXCR3 $^{-/-}$, se confrontati dal punto di vista immuno-

stologico con quelli dei topi di controllo CXCR3 $^{+/+}$, mostravano un numero inferiore di cellule T CD4+ e CD8+ e di macrofagi e non avevano cellule CD25+ (esprimenti una delle due catene del recettore per la IL-2), indicative dell'attivazione immunitaria (15). Questi studi dimostrano, inoltre, che gli effetti del "targeting" del recettore CXCR3 riducono il reclutamento intra-trapianto dei linfociti T attivati secernenti Interferone (IFN)- γ e di conseguenza inibiscono il reclutamento delle cellule effettrici della risposta immunitaria mediato dalle chemochine (4, 5). In questo modo, si assiste ad una riduzione del rischio e della severità del rigetto del trapianto. Studi successivi hanno dimostrato che la somministrazione di anticorpi neutralizzanti rivolti verso CXCL10 e verso un altro ligando di CXCR3, CXCL9, prolunga la sopravvivenza del trapianto in diversi tipi di modelli sperimentali (24, 25). È comunque interessante osservare che la delezione del gene per il recettore chemochinico CXCR3 non solo abolisce il rigetto acuto dell'organo trapiantato ma, in associazione con basse dosi di ciclosporina, determina l'accettazione permanente dell'organo trapiantato bloccando anche il rigetto cronico del trapianto (15). Studi più recenti hanno, infatti, dimostrato che i livelli di produzione delle chemochine CXCL10 e CXCL9 sono direttamente proporzionali alla gravità della vasculopatia cronica da trapianto (26). Inoltre, nella nefropatia cronica da trapianto, l'espressione di CXCL10 è ancora osservabile e si estende alle cellule residenti, suggerendo che questa chemochina possa rappresentare il fattore di congiunzione tra il rigetto acuto e la nefropatia cronica del trapianto. Infatti, le stesse chemochine CXCL10 e CXCL9 inducono proliferazione, chemiotassi e adesione alla matrice delle cellule muscolari lisce e delle cellule mesangiali (27-29), e bloccano la riparazione endoteliale in virtù del loro ben noto effetto angiostatico (30, 31). Queste azioni sinergiche possono contribuire a spiegare la patogenesi dell'arteriosclerosi accelerata che contraddistingue la nefropatia cronica da trapianto. Tale pleiotropismo funzionale è legato all'esistenza di due differenti varianti di *splicing* del recettore CXCR3, CXCR3-A e CXCR3-B, che mediano funzioni biologiche opposte (31). Questi risultati dimostrano che il CXCR3 svolge un ruolo critico nella patogenesi del rigetto acuto e della nefropatia cronica da trapianto, e per tali motivi è in corso la messa a punto di antagonisti selettivi che possano essere utilizzati come possibili strumenti terapeutici.

TEST DI VERIFICA

4) Quali recettori delle chemochine sono importanti nella patogenesi della "delayed graft function"?

- a. CXCR1 e CXCR2
- b. CCR4 e CCR8
- c. CXCR2 e CX3CR1
- d. CCR5 e CCR6
- e. CCR1 e CCR7

5) Quale recettore chemochinico è critico per lo sviluppo della tolleranza al trapianto?

- a. CCR5
- b. CCR2
- c. CCR210
- d. CCR4
- e. CCR9

6) Quale recettore chemochinico non è rilevante per la risposta immunitaria al trapianto?

- a. CCR1
- b. CCR5
- c. CCR7
- d. CXCR3
- e. CCR9

7) Il recettore chemochinico CXCR3 è critico:

- a. Per lo sviluppo del rigetto acuto
- b. Per il reclutamento dei neutrofili
- c. Per il reclutamento macrofagico
- d. Per la tossicità da immunosoppressori
- e. Per il reclutamento delle piastrine.

CXCL10: UN NUOVO FATTORE PREDITTIVO DELLA PERDITA DEL TRAPIANTO RENALE

Sulla base delle numerose evidenze sperimentali in modelli murini, è stato recentemente ipotizzato che la chemochina CXCL10 potesse rappresentare un marcatore utile per l'identificazione dei pazienti potenzialmente più reattivi. In effetti, dati ottenuti nel nostro laboratorio hanno consentito di dimostrare che i livelli pre-trapianto della chemochina CXCL10 nel siero dei pazienti in attesa di trapianto renale erano significativamente più elevati rispetto ai livelli sierici di CXCL10 dimostrabili nella popolazione sana (32). In particolare, all'interno della popolazione dei pazienti trapiantati, i livelli sierici pre-trapianto di CXCL10 sono risultati essere significativamente più elevati nel gruppo dei pazienti trapiantati che hanno perso il rene, rispetto al gruppo di pazienti che mantenevano il rene trapiantato funzionante (32). Inoltre, i pazienti con elevati livelli sierici pre-trapianto di CXCL10 mostravano una significa-

tiva incidenza di rigetti acuti e una diminuzione del tasso di sopravvivenza dell'organo trapiantato a distanza di cinque anni, rispetto ai pazienti trapiantati con bassi livelli di CXCL10 (32). Conseguentemente, l'analisi multivariata ha dimostrato che i livelli sierici pre-trapianto di CXCL10 rappresentavano, rispetto ad altri fattori di rischio già noti, il più potente fattore predittivo per la perdita del trapianto. È interessante notare che i pazienti con livelli di CXCL10 molto elevati mostravano anche una correlazione inversa tra i livelli di CXCL10 e il momento di comparsa del rigetto, suggerendo che più elevati sono i livelli di CXCL10, minore è il numero dei giorni necessari per lo sviluppo di rigetto acuto (32).

Il dosaggio dei livelli sierici pre-trapianto di CXCL10 risulta essere, dunque, un utile parametro clinico per identificare i pazienti che, una volta trapiantati, perderanno il rene e che, pertanto, necessitano di un trattamento farmacologico specifico più aggressivo per abbassare drasticamente i livelli sierici di CXCL10 e, conseguentemente, per aumentare le probabilità di sopravvivenza del rene trapiantato (Fig. 1A) (32).

L'approfondimento di questi risultati ha portato, in lavori successivi, alla dimostrazione che il dosaggio dei livelli sierici pre-trapianto di CXCL10 è anche in grado di predire non soltanto il rischio dei riceventi di sviluppare un rigetto acuto precoce e grave, ma anche di sviluppare nefropatia cronica da trapianto (Fig. 1B) (33). In definitiva, elevati livelli sierici di CXCL10 sono da considerare come un potente fattore di rischio che permette di differenziare i pazienti con un elevato tasso di sopravvivenza del trapianto renale da quelli con sopravvivenza breve dell'organo. Inoltre, è ragionevole pensare che i pazienti con elevati livelli sierici pre-trapianto di CXCL10 possano andare incontro a gravi episodi di rigetto acuto a causa di un'augmentata attivazione immunitaria, ma siano anche più predisposti a sviluppare iperplasia dell'intima, danno cronico endoteliale e necrosi vascolare, che determinano l'instaurarsi di nefropatia cronica da trapianto e di conseguenza perdita dell'organo trapiantato (4). Pertanto, la dimostrazione che i livelli sierici pre-trapianto della chemochina CXCL10 sono un utile parametro clinico per l'identificazione dei soggetti ad alto rischio di rigetto acuto, di nefropatia cronica da trapianto e di perdita dell'organo, suggerisce che questi soggetti potrebbero necessitare di un regime immunosoppressivo post-trapianto più aggressivo. Il test eseguito sul siero dei pazienti in lista d'attesa successivamente sottoposti a trapianto di rene è certamente di facile esecuzione e risulta adeguato all'uso clinico. Infatti, nessuna tra le diverse variabili (l'età ed il sesso del ricevente, il numero di "mismatches" di HLA-A, -B e -DR, la nefropatia di base, il tipo di terapia immunosoppressiva, il "Panel-Reactive Antibody", il numero di precedenti trapianti, il tempo di ischemia fredda, l'età ed il sesso del donato-

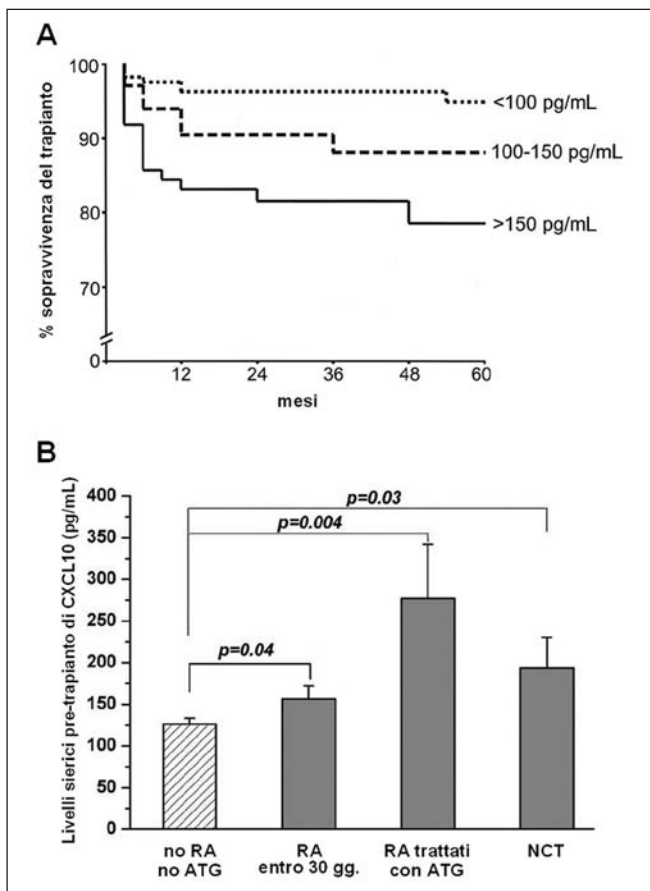


Fig. 1 - Elevati livelli sierici pre-trapianto di CXCL10 predicono la perdita del trapianto e l'insorgenza di rigetto acuto severo e di nefropatia cronica del trapianto. **A.** Migliore tasso di sopravvivenza del trapianto tra i riceventi con bassi livelli sierici pre-trapianto di CXCL10 (<100 pg/mL; n=163) rispetto ai riceventi con livelli sierici intermedi di CXCL10 (100-150 pg/mL; n=69) o con livelli sierici elevati di CXCL10 (>150 pg/mL; n=84) ($p=0.0002$). I riceventi deceduti con rene trapiantato funzionante non sono stati inclusi in questa analisi (modificata da Lazzeri E, et al. *Transplantation* 2005; 79: 1219).

B. Tra i riceventi di trapianto, i pazienti che sono andati incontro ad episodi di rigetto acuto (RA) entro il primo mese (n=74), ad episodi di RA severo (trattati con globuline anti-linfocitarie o ATG) (n=14) o che hanno sviluppato la Nefropatia Cronica del Trapianto (NCT) (n=28), hanno livelli sierici pre-trapianto di CXCL10 più elevati rispetto ai pazienti che non hanno avuto episodi di RA o di NCT (n=217) (modificata da Lazzeri E, et al. *Transplantation* 2005; 79: 1218).

re, il numero di rigetti) proposte finora come potenziali fattori di rischio di perdita del trapianto renale, presi singolarmente o in combinazione, ha mostrato un valore predittivo della perdita del trapianto renale superiore al dosaggio sierico pre-trapianto di CXCL10 (33). Ulteriori studi hanno confermato l'importante valore predittivo della chemochina CXCL10 nella predizione della perdita dell'organo trapiantato e dell'insorgenza di rigetto acuto ed hanno suggerito l'importanza anche di un altro ligando di CXCR3, CXCL9. Questi studi hanno inoltre dimostrato che anche il dosaggio urinario dei livelli di CXCL10 e CXCL9 subito dopo il trapianto può essere utilizzabile per il monitoraggio clini-

co del paziente. Infatti, anche livelli elevati di CXCL9 erano in grado di predire l'insorgenza di rigetto acuto in pazienti trapiantati (34). Inoltre, l'espressione del gene e della proteina di CXCL10 nelle urine di pazienti con trapianto renale risultava fortemente aumentata già nelle fasi precoci del rigetto del trapianto, prima ancora che parametri clinici, quali i livelli di creatinina sierica, risultassero aumentati e prima dell'esecuzione della biopsia renale (35). Pertanto, il monitoraggio dei livelli urinari di CXCL10 nei pazienti sottoposti a trapianto renale potrebbe dare conferma alla decisione clinica di adottare precocemente una più efficace terapia immunosoppressiva tempestiva, al fine di contrastare l'insorgenza del rigetto acuto.

TEST DI VERIFICA

8) I livelli sierici pre-trapianto della chemochina CXCL10:

- Sono più bassi nei pazienti in attesa di trapianto renale rispetto alla popolazione sana
- Sono più elevati nei pazienti che hanno perso il trapianto rispetto ai pazienti che hanno sviluppato un rigetto acuto
- Sono più elevati nei pazienti che hanno perso il trapianto rispetto ai pazienti che hanno il rene trapiantato funzionante
- Sono più bassi nei pazienti che hanno perso il trapianto rispetto ai pazienti che hanno il rene trapiantato funzionante
- Sono più elevati nei pazienti che hanno sviluppato un rigetto acuto entro il primo mese rispetto ai pazienti che hanno sviluppato una nefropatia cronica del trapianto.

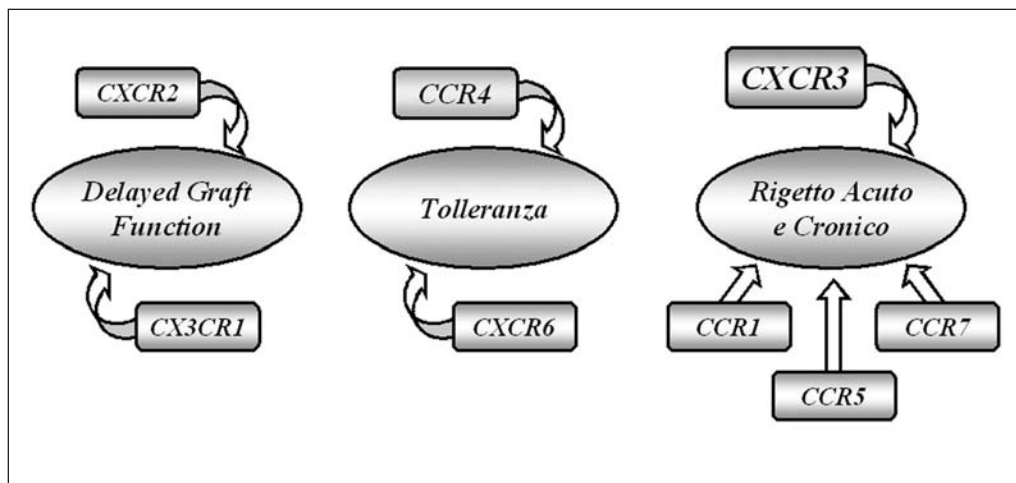
9) Quale delle seguenti variabili, proposte finora come potenziali fattori di rischio di perdita del trapianto renale, presi singolarmente o in combinazione, ha mostrato un valore predittivo della perdita del trapianto renale superiore al dosaggio sierico pre-trapianto di CXCL10?

- L'età del donatore
- Il numero di "mismatches" di HLA-A, -B e -DR
- Il tempo di ischemia fredda
- Tutte le precedenti variabili
- Nessuna delle precedenti variabili.

10) Elevati livelli urinari di CXCL10 e CXCL9 sono in grado di predire precocemente l'insorgenza di:

- Delayed graft function
- Primary non function
- Rigetto acuto
- Nefropatia cronica del trapianto
- Perdita del trapianto.

Fig. 2 - Influenza di differenti recettori chemochinici in fasi distinte della risposta immunitaria al trapianto renale.



CONCLUSIONI

Sebbene quasi ogni chemochina sia espressa nelle varie fasi dello sviluppo del rigetto acuto e della nefropatia cronica da trapianto, numerose evidenze sperimentali suggeriscono che soltanto alcuni recettori chemochinici siano in grado di svolgere funzioni chiave nella risposta immunitaria al trapianto (Fig. 2). In particolare, il recettore chemochinico CXCR3 esplica un ruolo critico nella patogenesi del rigetto acuto e della nefropatia cronica da trapianto ed è in corso la messa a punto di antagonisti selettivi di questo recettore che possano essere utilizzati come possibili strumenti terapeutici. Altri recettori delle chemochine, come il CCR4, svolgono ruoli importanti nell'induzione della tolleranza al trapianto. Inoltre, "trials" clinici con antagonisti del recettore CXCR2 sono in corso per limitare il danno renale da ischemia-riperfusione. Infine, dati recenti suggeriscono che il dosaggio sierico della chemochina CXCL10 prima del trapianto possa essere considerato un utile marcatore per il monitoraggio dell'andamento del trapianto renale, in quanto è in grado di predire l'insorgenza del rigetto acuto, della nefropatia cronica da trapianto, nonché la perdita del trapianto renale. L'impiego nella pratica clinica di questi dosaggi potrebbe consentire di migliorare il "management" clinico e terapeutico dei pazienti trapiantati, individuando fin dal principio i pazienti a maggior rischio di rigetto acuto e di perdita del trapianto, i quali potrebbero, pertanto, beneficiare di un trattamento immunosoppressivo più aggressivo.

RIASSUNTO

Nel corso degli ultimi anni, numerosi studi hanno dimostrato il ruolo determinante di alcuni recettori delle chemochine nella patogenesi delle risposte immunologiche in corso di trapianto d'organo. Le chemochine possono influenzare almeno tre aspetti della biologia del trapianto: la patogenesi della "delayed graft function", l'induzione della tolleranza al trapianto e la patogenesi del rigetto acuto e della nefropatia cronica da trapianto. In particolare, il recettore chemochinico CXCR2 gioca un ruolo chiave nella patogenesi della "delayed graft function", mentre il recettore CCR4, svolge un importante ruolo permissivo nell'induzione della tolleranza al trapianto. Infine, il recettore chemochinico CXCR3 esplica un ruolo critico nella patogenesi del rigetto acuto e della nefropatia cronica da trapianto ed è in corso la messa a punto di antagonisti selettivi di questo recettore che possano essere utilizzati come possibili strumenti terapeutici. Dati recenti suggeriscono, inoltre, che il dosaggio sierico del principale ligando di CXCR3, la chemochina IP-10/CXCL10, prima del trapianto consenta di identificare i soggetti a rischio per l'insorgenza del rigetto acuto e della nefropatia cronica del trapianto, nonché per la perdita del trapianto renale. L'impiego di questi dosaggi potrebbe consentire di migliorare il "management" clinico e terapeutico dei pazienti trapiantati, permettendo di individuare fin dal principio i pazienti a maggior rischio di rigetto acuto e di perdita del trapianto, che potrebbero, pertanto, beneficiare di un trattamento immunosoppressivo più aggressivo.

BIBLIOGRAFIA

1. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 2006; 354: 610-21.
2. Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 891-928.
3. Romagnani P, Lasagni L, Annunziato F, Serio M, Romagnani S. CXC chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis. *Trends Immunol* 2004; 25: 201-9.
4. el-Sawy T, Fahmy NM, Fairchild RL. Chemokines: directing leukocyte infiltration into allografts. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 562-8.
5. Hancock WW, Wang L, Ye Q, Han R, Lee I. Chemokines and their receptors as markers of allograft rejection and targets for immunosuppression. *Curr Opin Immunol* 2003; 15: 479-86.
6. Tan J, Zhou G. Chemokine receptors and transplantation. *Cell Mol Immunol* 2005; 2: 343-9.
7. Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 2004; 364: 1814-27.
8. Cugini D, Azzollini N, Gagliardini E, et al. Inhibition of the chemokine receptor CXCR2 prevents kidney graft function deterioration due to ischemia/reperfusion. *Kidney Int* 2005; 67: 1753-61.
9. Furuichi K, Gao JL, Murphy PM. Chemokine receptor CX3CR1 regulates renal interstitial fibrosis after ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol* 2006; 169: 372-87.
10. Banham AH, Powrie FM, Suri-Payer E. FOXP3(+) regulatory T cells: Current controversies and future perspectives. *Eur J Immunol* 2006; 36: 2832-6.
11. Lee I, Wang L, Wells AD, Dorf ME, Ozkaynak E, Hancock WW. Recruitment of Foxp3+ T regulatory cells mediating allograft tolerance depends on the CCR4 chemokine receptor. *J Exp Med* 2005; 201: 1037-44.
12. Jiang X, Shimaoka T, Kojo S, et al. Cutting edge: critical role of CXCL16/CXCR6 in NKT cell trafficking in allograft tolerance. *J Immunol* 2005; 175: 2051-5.
13. Romagnani P. From basic science to clinical practice: use of cytokines and chemokines as therapeutic targets in renal diseases. *J Nephrol* 2005; 18: 229-33.
14. Vielhauer V, Eis V, Schlondorff D, Anders HJ. Identifying chemokines as therapeutic targets in renal disease: lessons from antagonist studies and knockout mice. *Kidney Blood Press Res* 2004; 27: 226-38.
15. Hancock WW, Lu B, Gao W, et al. Requirement of the chemokine receptor CXCR3 for acute allograft rejection. *J Exp Med* 2000; 192: 1515-9.
16. Gao W, Topham PS, King JA, et al. Targeting of the chemokine receptor CCR1 suppresses development of acute and chronic cardiac allograft rejection. *J Clin Invest* 2000; 105: 35-44.
17. Horuk R, Clayberger C, Krensky AM, et al. A non-peptide functional antagonist of the CCR1 chemokine receptor is effective in rat heart transplant rejection. *J Biol Chem* 2001; 276: 4199-204.
18. Anders HJ, Ninichuk V, Schlondorff D. Progression of kidney disease: blocking leukocyte recruitment with chemokine receptor CCR1 antagonists. *Kidney Int* 2006; 69: 29-32.
19. Gao W, Faia KL, Csizmadia V, et al. Beneficial effects of targeting CCR5 in allograft recipients. *Transplantation* 2001; 72: 1199-205.
20. Segerer S, Cui Y, Eitner F, et al. Expression of chemokines and chemokine receptors during human renal transplant rejection. *Am J Kidney Dis* 2001; 37: 518-31.
21. Grone HJ, Weber C, Weber KS, et al. Met-RANTES reduces vascular and tubular damage during acute renal transplant rejection: blocking monocyte arrest and recruitment. *FASEB J* 1999; 13: 1371-83.
22. Fischeder M, Luckow B, Hofer B, et al. CC chemokine receptor 5 and renal-transplant survival. *Lancet* 2001; 357: 1758-61.
23. Ziegler E, Gueler F, Rong S, et al. CCL19-IgG prevents allograft rejection by impairment of immune cell trafficking. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2521-32.
24. Kobayashi H, Novick AC, Toma H, Fairchild RL. Chronic antagonism of Mig inhibits cellular infiltration and promotes survival of class II MHC disparate skin allografts. *Transplantation* 2002; 74: 387-95.
25. Zhang Z, Kaptanoglu L, Haddad W, et al. Donor T cell activation initiates small bowel allograft rejection through an IFN-gamma-inducible protein-10-dependent mechanism. *J Immunol* 2002; 168: 3205-12.
26. Zhao DX, Hu Y, Miller GG, Luster AD, Mitchell RN, Libby P. Differential expression of the IFN-gamma-inducible CXCR3-binding chemokines, IFN-inducible protein 10, monokine induced by IFN, and IFN-inducible T cell alpha chemoattractant in human cardiac allografts: association with cardiac allograft vasculopathy and acute rejection. *J Immunol* 2002; 169: 1556-60.
27. Wang X, Yue TL, Ohlstein EH, Sung CP, Feuerstein GZ. Interferon-inducible protein-10 involves vascular smooth muscle cell migration, proliferation, and inflammatory response. *J Biol Chem* 1996; 271: 24286-93.
28. Romagnani P, Lazzeri E, Lasagni L, et al. IP-10 and Mig production by glomerular cells in human proliferative glomerulonephritis and regulation by nitric oxide. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 53-64.
29. Romagnani P, Beltrame C, Annunziato F, et al. Role for interactions between IP-10/Mig and CXCR3 in proliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 2518-26.
30. Romagnani P, Annunziato F, Lasagni L, et al. Cell cycle-dependent expression of CXC chemokine receptor 3 by endothelial cells mediates angiostatic activity. *J Clin Invest* 2001; 107: 53-63.
31. Lasagni L, Francalanci M, Annunziato F, et al. An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the IP-10, Mig and I-TAC induced-inhibition of endothelial cell growth and acts as functional receptor for PF-4. *J Exp Med* 2003; 197: 1537-49.
32. Rotondi M, Rosati A, Buonamano A, et al. High pretransplant serum levels of CXCL10/IP-10 are related to increased risk of renal allograft failure. *Am J Transplant* 2004; 4: 1466-74.
33. Lazzeri E, Rotondi M, Mazzinghi B, et al. High CXCL10 expression in rejected kidneys and predictive role of pretransplant serum CXCL10 for acute rejection and chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 2005; 79: 1215-20.
34. Hauser IA, Spiegler S, Kiss E, et al. Prediction of acute renal allograft rejection by urinary monokine induced by IFN-gamma (MIG). *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 1849-58.
35. Matz M, Beyer J, Wunsch D, et al. Early post-transplant urinary IP-10 expression after kidney transplantation is predictive of short- and long-term graft function. *Kidney Int* 2006; 69: 1683-90.