

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FIRENZE

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Fisiopatologia Clinica

Dottorato di Ricerca in

SCIENZE ENDOCRINOLOGICHE E METABOLICHE

(Settore scientifico-disciplinare MED13)

XXIII Ciclo

CXCL10 e rigetto del trapianto: studio degli analoghi della vitamina D come potenziali nuovi farmaci immunomodulatori

Coordinatore:
Prof. Gianni Forti

Tutor:
Prof.ssa Paola Romagnani

Tesi di Dottorato di:
Dr.ssa Mariangela Sottili

INDICE

INDICE.....	2
INTRODUZIONE.....	5
1. PATOGENESI DEL RIGETTO DEL TRAPIANTO D'ORGANO.....	5
2. I LINFOCITI T.....	4
3. MECCANISMI MOLECOLARI DEL RIGETTO DEL TRAPIANTO.....	7
4. TIPI DI RIGETTO.....	11
5. CXCL10 E RIGETTO.....	13
6. TERAPIA IMMUNOSOPPRESSIVA NEL TRAPIANTO.....	16
7. LA VITAMINA D.....	21
7.1. Azioni biologiche della vitamina D.....	23
7.2. Effetti anti-infiammatori e immunomodulatori degli agonisti del VDR.....	24
7.3. La vitamina D e il rigetto del trapianto.....	28
SCOPO DELLA RICERCA.....	32
MATERIALI E METODI.....	36
1. CHEMICALS.....	36
2. PAZIENTI.....	38
3. COLTURE DI CARDIOMIOCITI UMANI FETALI (Hfcm).....	40
4. COLTURE DI CELLULE EPITELIALI DI TUBULO RENALE PROSSIMALE UMANE (RPTEC).....	41
5. COLTURE DI LINFOCITI T CD4+ UMANI.....	41

6. ESPERIMENTI DI ELETTROFISIOLOGIA.....	42
6.1 Soluzioni.....	42
6.2 Stimolazione.....	42
6.3. Elettrofisiologia delle <i>gap junctions</i>	43
7. ESTRAZIONE DI RNA E REAL TIME RT-PCR... ..	43
8. MICROSCOPIA AD IMMUNOFLUORESCENZA.....	44
9. ANALISI WESTERN BLOT.....	45
10. ANALISI CITOFLUORIMETRICA.....	46
11. SAGGI DI SECREZIONE DI CITOCHINE.....	47
12. DOSAGGI ELISA.....	48
13. VITALITA' CELLULARE.....	49
14. ANALISI STATISTICA.....	49
RISULTATI.....	51
1. PAZIENTI.....	51
1.1. Valore predittivo di CXCL10 per il rigetto acuto di trapianto cardiaco.....	51
2. CELLULE CARDIACHE Hfcm.....	57
2.1. Caratterizzazione delle Hfcm.....	57
2.1.1. Morfologia e durata di vita delle Hfcm.....	57
2.1.2. Espressione dei marker specifici di <i>lineage</i> cardiaco.....	57
2.1.3. Evoluzione della capacità di membrana (Cm)	59
2.1.4. Potenziale di riposo di membrana e potenziale d'azione.....	59
2.1.5. Modificazioni delle correnti di potassio durante lo sviluppo.....	62
2.1.6. <i>Gap junctions</i>	64

2.1.7. Espressione delle proteine specifiche cardiache.....	64
2.2. Effetto delle citochine proinfiammatorie nelle Hfcm.....	67
2.3. Meccanismo di sinergia tra IFN γ e TNF α nelle Hfcm.....	69
2.4. Risposta delle Hfcm ai farmaci immunosoppressori	69
2.5. Meccanismi d'azione intracellulare di BXL-01-0029 e MPA nelle Hfcm.....	72
2.6. Valutazione della tossicità cellulare di BXL-01-0029 e MPA nelle Hfcm.....	77
3. CELLULE EPITELIALI DEL TUBULO PROSSIMALE RENALE (RPTEC).....	78
3.1. Vie intracellulari coinvolte nella secrezione di CXCL10 nelle RPTEC.....	78
3.2. Effetto dei farmaci immunosoppressori sulla secrezione di CXCL10 da parte delle RPTEC.....	78
3.3. Valutazione della tossicità cellulare di BXL-01-0029, elocalcitolo, TAC e MPA nelle RPTEC.....	83
4. LINFOCITI T CD4+.....	84
4.1. Effetto di BXL-01-0029, elocalcitolo, TAC e MPA sui linfociti T CD4+.....	84
4.2. Valutazione della tossicità di BXL-01-0029, elocalcitolo, TAC e MPA nei linfociti T CD4+.....	86
DISCUSSIONE.....	87
BIBLIOGRAFIA.....	99

INTRODUZIONE

1. PATOGENESI DEL RIGETTO DEL TRAPIANTO D'ORGANO

Il miglioramento dei regimi immunosoppressivi e delle tecniche chirurgiche hanno reso il trapianto una routine e la terapia di elezione per il trattamento di pazienti con insufficienza cardiaca o renale terminale (*end stage renal disease*, ESRD) [1].

In seguito a trapianto, la reazione di rigetto rappresenta la causa principale di morbilità e mortalità nel primo anno dopo il trapianto [2]; quindi il successo del trapianto d'organo è strettamente legato alla possibilità di modulare la risposta immunitaria del ricevente in modo da evitare la reazione di rigetto dell'organismo verso l'organo trapiantato [3,4].

I principali fattori che rendono i tessuti trapiantati esposti al fenomeno del rigetto, ovvero al loro riconoscimento come strutture non-*self* da parte del sistema immunitario sono:

- la presenza di un assetto antigenico qualitativamente o quantitativamente diverso rispetto a quello delle strutture *self*;
- la presentazione di antigeni non-*self* in grado di attivare le cellule del sistema immunitario dell'ospite;
- la presenza di una condizione di pericolo, ovvero di uno stato infiammatorio.

Il rigetto del trapianto d'organo è principalmente un evento mediato dai linfociti T, sebbene anche la risposta umorale (linfociti B) contribuisca [2].

2. I LINFOCITI T

I linfociti T possono essere distinti dagli altri tipi di linfociti, come cellule B e cellule *natural killer* (NK), dalla presenza di uno speciale recettore, presente sulla loro superficie, chiamato recettore delle cellule T (*T Cell Receptor*, TCR).

Sulla base dell'espressione specifica di altri co-recettori, come le glicoproteine CD4 e CD8 o i recettori per le proteine citochine e chemochine, sono state identificate diverse sottopopolazioni funzionalmente distinte di cellule T mature.

Le cellule T citotossiche (Tc), che esprimono principalmente il co-recettore CD8, lisano cellule allojeniche o cellule autologhe che portano molecole antigeniche estranee.

Le cellule T helper (Th) assistono le altre cellule immunitarie nei processi immunologici, incluse, tra le altre funzioni, la maturazione delle cellule B in plasmacellule e l'attivazione delle Tc e dei macrofagi. Queste cellule sono anche conosciute come cellule T CD4+ perché la maggior parte di esse esprimono sulla loro superficie il co-recettore CD4. Sono stati definiti due tipi principali di cellule T helper: Th1 e Th2, che si distinguono principalmente per le citochine che producono, ma anche per certi *marker* di superficie. Una cellula T matura "indifferenziata", detta Th0, può differenziarsi in una cellula effettrice Th1 o Th2, a seconda delle condizioni durante la stimolazione antigenica. Le cellule Th1 secernono prevalentemente la citochina proinfiammatoria interferon (IFN)- γ e l'interleuchina (IL)-2 e controllano i processi infiammatori cellulo-mediati, come l'attivazione dei macrofagi; esse generano principalmente reazioni di ipersensibilità ritardata, sebbene possano anche fornire aiuto alle cellule B. Le cellule Th2, che secernono IL-4 e IL-5, sono invece coinvolte nell'immunità umorale, stimolando la produzione di anticorpi, soprattutto IgE, da parte delle cellule B, e promuovendo lo sviluppo e l'attività degli eosinofili [5]. Altri sottotipi di Th di più recente scoperta sono le Th3, le Th17 e le *T follicular helper* (T_{FH}). Il meccanismo mediante il quale le cellule T sono dirette verso un particolare sottotipo non è ancora ben chiaro, anche se si

ritiene che la segnalazione da parte delle cellule presentanti l'antigene (*antigen-presenting cells*, APCs) svolga un ruolo importante [6].

Sebbene la maggior parte delle cellule T helper esprima CD4 e la maggior parte delle cellule T citotossiche esprima CD8, l'attività funzionale delle cellule T non è regolata dalle molecole CD4 e CD8. Per esempio, cellule Tc esprimenti CD4 sono prevalenti nel rigetto del trapianto e sono state osservate anche nelle risposte immunitarie nei tumori, mentre cellule secernenti citochine ed esprimenti CD8 possono essere viste in certe risposte immunitarie normali o patologiche.

Le cellule T regolatorie (Treg), precedentemente conosciute come cellule T soppressive, modulano l'attività delle cellule B e di altre cellule T, abbattendo l'immunità mediata dalle cellule T o sopprimendo cellule T auto-reattive, per evitare reazioni immunitarie eccessive. Esse svolgono quindi un ruolo cruciale nel mantenimento della tolleranza immunitaria (ad esempio in caso di trapianto d'organo).

3. MECCANISMI MOLECOLARI DEL RIGETTO DEL TRAPIANTO

Il target principale della risposta immunitaria nel trapianto sono le molecole del Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC, nell'uomo chiamato *Human Leukocyte Antigen*, HLA), espresse sulla superficie delle cellule del donatore (allo-MHC). L'MHC è una regione di geni altamente polimorfici i cui prodotti proteici sono espressi sulla superficie di una varietà di cellule. Queste proteine di superficie cellulare sono i principali determinanti antigenici del rigetto del trapianto. Il ruolo biologico di queste proteine è stato chiarito negli anni '70, quando fu scoperto che le cellule T non riconoscono l'antigene in forma libera o solubile o come proteina intatta, ma riconoscono porzioni degli antigeni che sono stati frammentati in peptidi legati alle molecole dell'MHC.

I prodotti proteici dell'MHC sono stati classificati in due gruppi, classe I e II, che differiscono in struttura, espressione e compartimento cellulare da cui ottengono i peptidi antigenici da presentare alle cellule T.

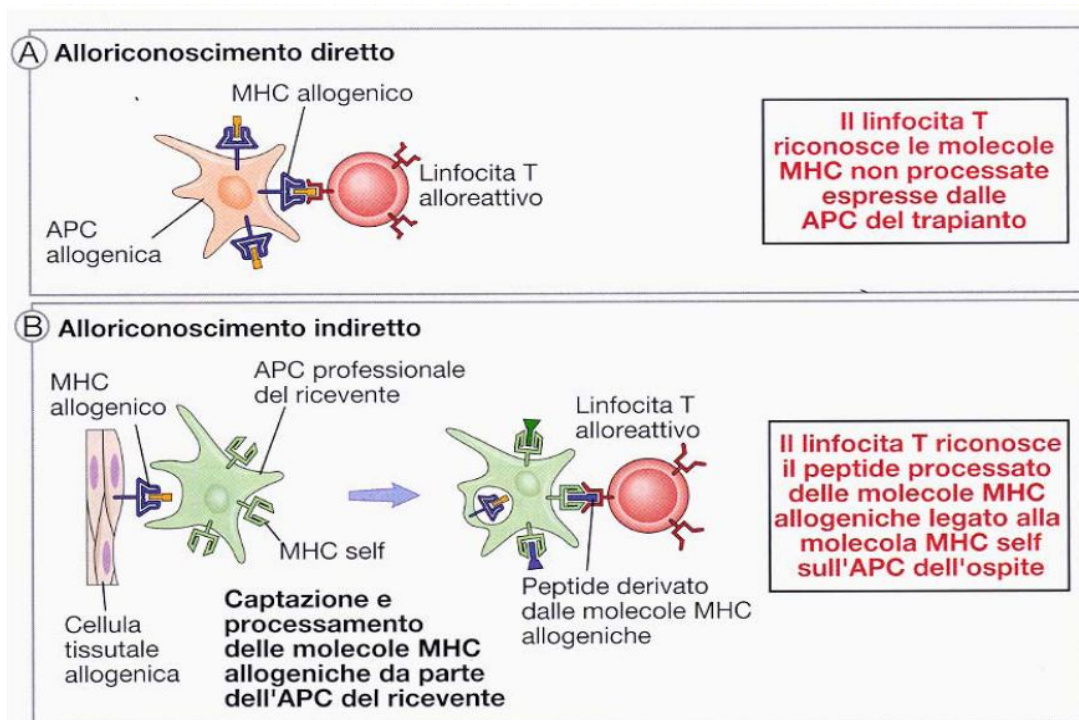
Le molecole MHC di classe I (nell'uomo: HLA-A, HLA-B, HLA-C) presentano peptidi antigenici alle cellule T CD8+. Le cellule T CD8+ inducono poi la lisi cellulare o inducendo apoptosi o uccidendo attivamente le cellule infettate mediante il rilascio di una serie di proteine citotossiche. Le molecole MHC di classe I sono espresse in quasi tutti i tipi di cellule nei mammiferi; livelli particolarmente elevati sono espressi sulle APCs, come cellule dendritiche, macrofagi, linfociti B e cellule endoteliali vascolari.

Le molecole MHC di classe II (nell'uomo: HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR) sono presenti unicamente sulle APCs e presentano peptidi antigenici solo alle cellule T CD4+. In particolare, la sensibilizzazione del sistema immunitario al tessuto trapiantato sembra dipendere fortemente dalla presentazione antigenica alle cellule T CD4+ da parte dei complessi MHC di classe II.

Il riconoscimento degli alloantigeni da parte delle cellule T è l'evento principale che porta alla cascata di eventi risultanti nel rigetto di un organo trapiantato. Gli alloantigeni sulla superficie delle APCs sono riconosciuti dalle cellule T tramite il recettore TCR, che interagisce con la proteina CD3 presente sulla superficie delle cellule T stesse.

Ci sono due distinti meccanismi di riconoscimento allogenico: il riconoscimento diretto e quello indiretto (Figura 1); ognuno conduce alla produzione di un differente set di cloni di cellule T allospecifiche [2]. Questi due meccanismi non sono necessariamente mutualmente esclusivi, ma anzi possono essere coinvolti nel mediare il rigetto del trapianto sia simultaneamente che a tempi differenti.

- riconoscimento allogenico diretto: le cellule T del ricevente riconoscono direttamente molecole MHC allogeniche esposte sulla superficie delle APCs del donatore. Sembra che questo sia il



da: Abbas, Linchtman, *Le basi dell'immunologia*, 2° edizione italiana, Masson

Figura 1. Riconoscimento diretto e indiretto degli alloantigeni

meccanismo principale coinvolto nella risposta immunitaria precoce, e che quindi abbia un ruolo fondamentale nel rigetto acuto. Infatti l'organo trapiantato porta un alto numero di APCs sotto forma di cellule dendritiche interstiziali, che hanno un'alta densità di molecole MHC allogeneiche e sono capaci di stimolare direttamente le cellule T del ricevente.

- riconoscimento alloigenico indiretto: le molecole MHC allogeneiche delle cellule del trapianto sono captate e processate dalle APCs del ricevente e i loro frammenti peptidici sono presentati dalle molecole MHC *self* presenti sulle APCs del ricevente stesso. Il riconoscimento alloigenico indiretto sembra importante nel rigetto cronico del trapianto, forse in parte a causa del suo ruolo nel fornire l'aiuto delle cellule T alla produzione di anticorpi da parte delle cellule B. Esso è inoltre implicato

nell'attivazione delle cellule Treg, che possono agire per limitare il danneggiamento del trapianto e promuovere la tolleranza [7].

In entrambi i casi comunque è necessario che uno stato infiammatorio determini l'attivazione funzionale delle APCs, che altrimenti non sarebbero in grado di operare la presentazione antigenica e di migrare verso le stazioni linfonodali per interagire con i linfociti T. La presenza di infiammazione, d'altra parte, caratterizza invariabilmente i tessuti trapiantati, a causa dei fenomeni traumatici e ischemici presenti nelle fasi di espianto, trasporto e innesto dei tessuti stessi.

Il segnale trasmesso dal TCR, affinché il linfocita si attivi, deve essere associato al segnale proveniente dagli specifici co-recettori CD4 e CD8.

L'attivazione completa delle cellule T avviene però solo in presenza di molecole co-stimolatorie, cioè dopo l'interazione di uno o più TCR con i loro specifici ligandi sulla superficie delle cellule APCs. Sono state identificate diverse molecole co-stimolatorie, che funzionano come coppia recettore-ligando sulla superficie di APCs e cellule T, che mediano l'adesione e la mutua attivazione. Tra le più caratterizzate c'è il CD28, che si lega alle molecole B7 (CD80, CD86) sulle APCs. In assenza di questo secondo segnale, le cellule T possono diventare quiescenti o anche andare incontro ad apoptosi.

L'insieme di tutte queste interazioni tra cellule T e APCs determina l'attivazione di alcune vie intracellulari nelle cellule T, come ad esempio la calcineurina, una fosfatasi attivata dal calcio che defosforila svariate molecole, incluso un importante fattore di trascrizione, il fattore nucleare delle cellule T attivate (*nuclear factor of activated T cells*, NF-AT), permettendogli di entrare nel nucleo e di legarsi al promotore dell'IL-2 e di altre citochine. Anche le MAP-chinasi (MAPK) vengono attivate ed entrano nel nucleo per stimolare i promotori di altre importanti citochine. L'IL-2 secreta attiva il proprio recettore (IL-2R) sulla superficie cellulare, stimolando l'espansione clonale delle cellule T. IL-2 e le altre citochine prodotte da queste cellule T helper stimolano l'espansione di altre

cellule del sistema immunitario, incluse altre cellule T helper, cellule T citotossiche, cellule B, e cellule *natural killer* (NK). Il legame con IL-2R, come molti altri recettori di fattori di crescita, attiva l'enzima target della rapamicina (*mammalian target of rapamicin*, mTOR). mTOR controlla la traduzione di mRNA a proteine, che regola il ciclo cellulare. Il ciclo cellulare dei linfociti T richiede la sintesi *de novo* di purine, un processo controllato dall'enzima inosina monofosfato deidrogenasi.

4. TIPI DI RIGETTO

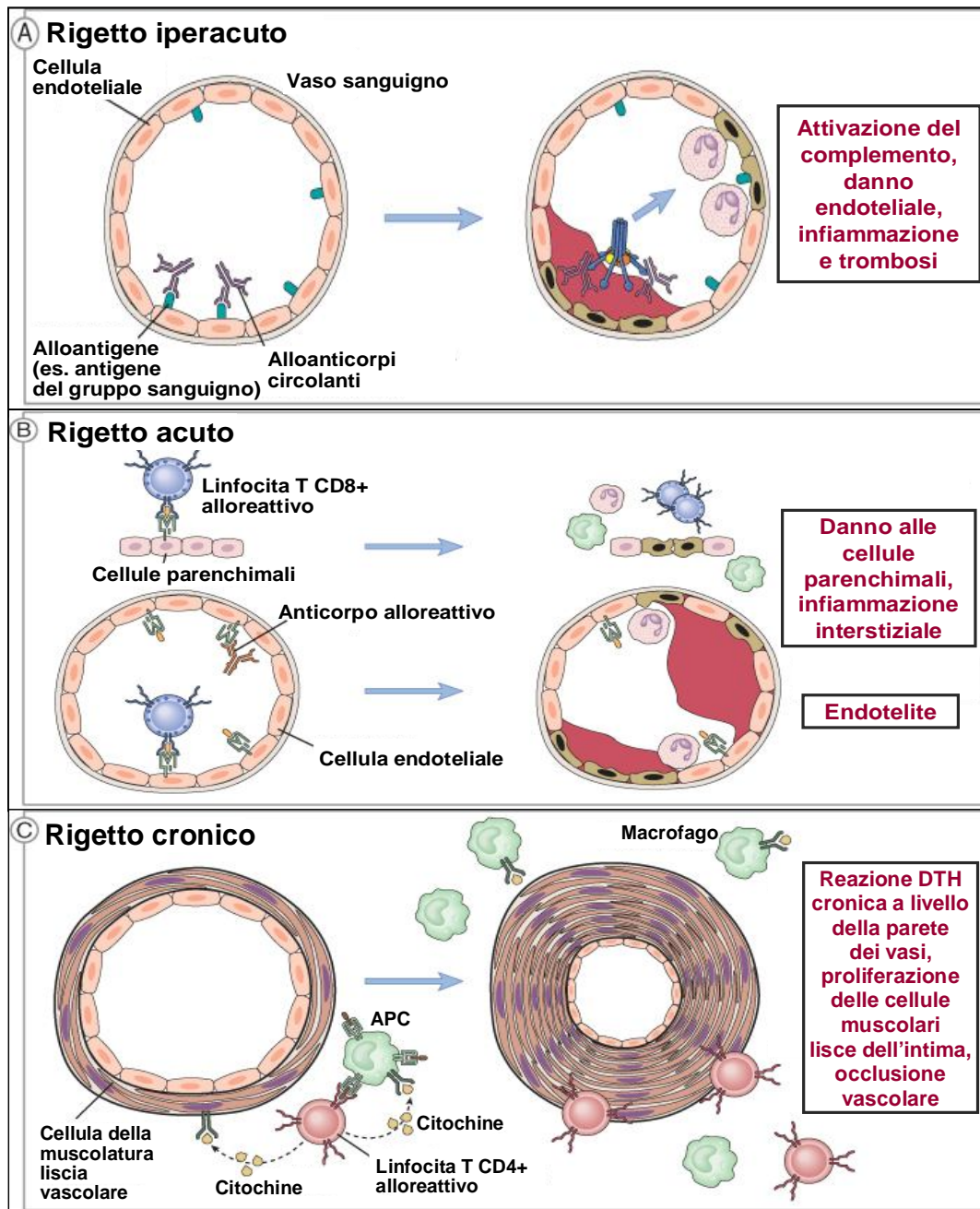
Il rigetto è classificato tradizionalmente in tre tipi (Figura 2), sulla base delle caratteristiche cliniche e istopatologiche:

- rigetto iperacuto
- rigetto acuto (cellulo-mediato e umorale)
- rigetto cronico

Il rigetto iperacuto avviene entro minuti o poche ore dal trapianto in riceventi con anticorpi preformati contro gli antigeni AB0 (dei gruppi sanguigni), gli HLA o gli antigeni endoteliali del donatore. Grazie alle moderne procedure di *matching* tra donatori e riceventi il rigetto iperacuto è ad oggi molto raro. Quando avviene, è un evento catastrofico perché gli anticorpi preformati si legano all'endotelio dell'organo trapiantato, determinando l'attivazione del complemento e quindi la formazione di un infiltrato infiammatorio che causa la necrosi fibrinoide dei vasi dell'organo [2].

Il rigetto acuto cellulo-mediato può avvenire anche anni dopo il trapianto, ma è più frequente nei primi 3-6 mesi. E' una risposta mediata dai linfociti T, caratterizzata da infiltrazione di linfociti e macrofagi e conseguente citolisi massiva delle cellule dell'organo trapiantato.

Il rigetto acuto umorale, che è molto meno frequente del cellulo-mediato, avviene da giorni a settimane dopo il trapianto ed è iniziato da anticorpi piuttosto che da linfociti T [8,9]. E' chiamato



da: Abbas, Lichtman, *Le basi dell'immunologia*, 2° edizione italiana, Masson

Figura 2. Tipi di rigetto

anche “vascolare” perché gli anticorpi sono diretti contro gli antigeni HLA o gli antigeni delle cellule endoteliali del donatore e possono generare una manifestazione clinica detta vasculite da rigetto [2].

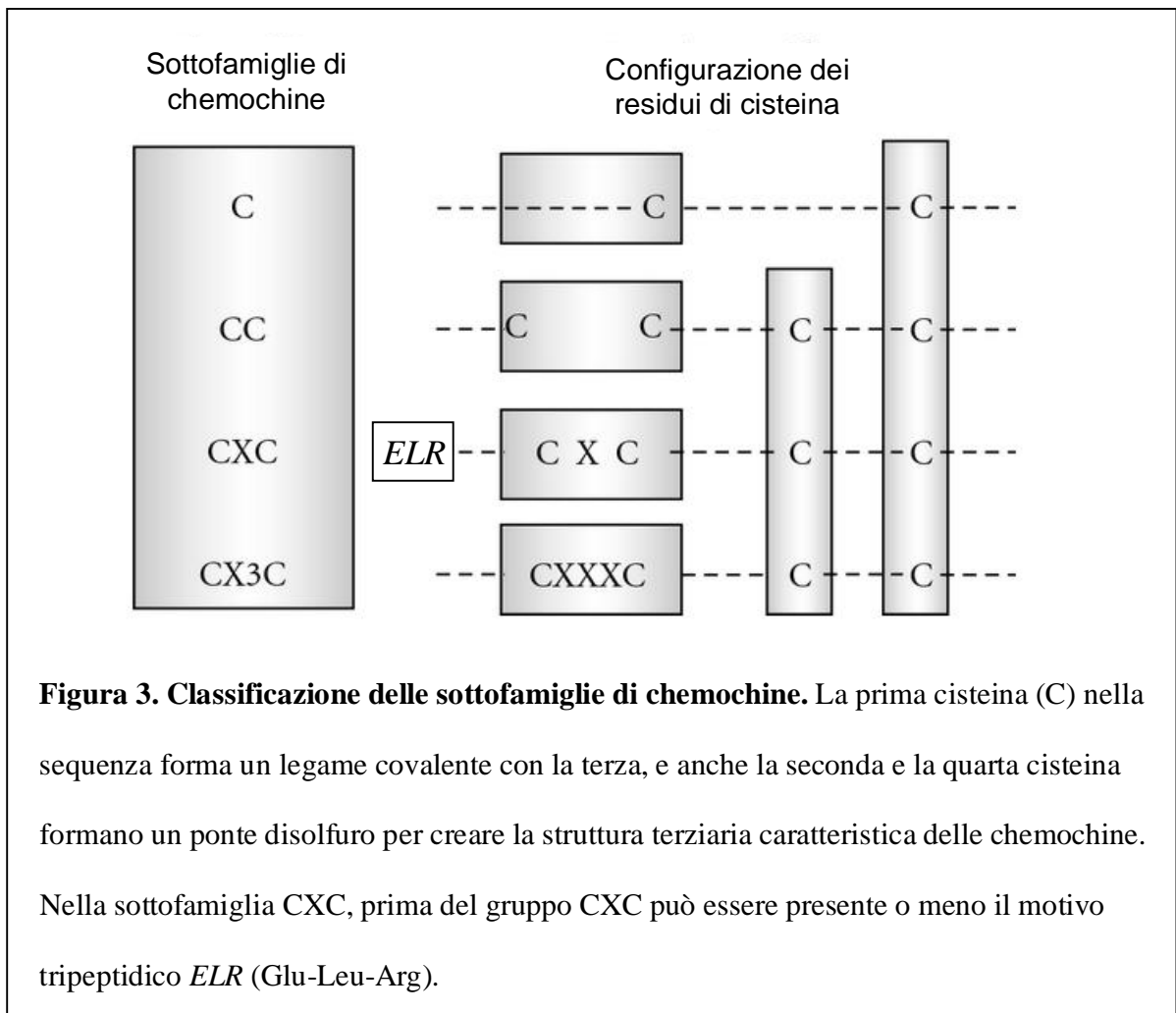
Il rigetto cronico avviene mesi o anni dopo il trapianto [10,11]. Il meccanismo non è completamente chiaro, ma sembra che siano interessati sia meccanismi di danno cellulo-mediati che umorali. In particolare, le cellule Th producono citochine che inducono la proliferazione delle cellule muscolari lisce dell'intima, con conseguente fibrosi e occlusione vascolare. Il rigetto cronico indica tutte le perdite di funzionalità dell'organo trapiantato sul lungo periodo, ed è associato alla perdita dell'organo.

5. CXCL10 E RIGETTO

Nonostante che il meccanismo patogenetico alla base del rigetto del trapianto sia ancora in parte da chiarire, un ruolo fondamentale è sicuramente svolto dalle citochine e dalle chemochine (citochine chemotattiche) proinfiammatorie [12]. In particolare, il trauma chirurgico e il conseguente evento di ischemia-riperfusion che si verificano in seguito al trapianto d'organo inducono una cascata infiammatoria che vede coinvolte le citochine $IFN\gamma$ e $TNF\alpha$ [12,13], secrete dalle cellule Th1 [14].

Queste citochine, oltre a promuovere la maturazione e la migrazione delle cellule dendritiche verso le stazioni linfonodali e a favorire la funzione effettrice delle cellule leucocitarie [12,13,15], inducono, principalmente da parte delle cellule endoteliali, la secrezione di chemochine e l'espressione di molecole di adesione cellulare [12].

Le chemochine sono una famiglia di proteine a basso peso molecolare (8-14 KDa) che regolano l'attivazione e l'attrazione delle cellule effettrici verso i siti di infiammazione [16], agendo attraverso specifici recettori tran-membrana accoppiati a proteine G. Al momento sono state identificate più di 50 chemochine, che sono state raggruppate in quattro sottofamiglie (Figura 3)



sulla base della configurazione di un motivo contenente residui di cisteina (C) nell'area amino-terminale della proteina: le chemochine C, CC, CXC e CX₃C (dove X è un qualsiasi aminoacido) [16]. Le chemochine CXC possono essere ulteriormente suddivise in base alla presenza o meno di un motivo tripeptidico chiamato *ELR* (Glu-Leu-Arg): le chemochine che contengono questo motivo (es. CXCL8/IL-8) hanno proprietà chemotattiche verso i neutrofilo e stimolano l'angiogenesi, mentre quelle che non lo contengono (es. CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/I-TAC) provocano la chemotassi dei linfociti T attivati ed hanno proprietà angiostatiche [16].

Il rigetto del trapianto, risposta immunitaria mediata da linfociti Th1, è caratterizzato dall'espressione delle chemochine CXC inducibili dall'IFN γ CXCL9, CXCL10 e CXCL11 e dall'infiltrazione di cellule T attivate esprimenti il loro recettore specifico CXCR3 [17,18]. Un ruolo chiave sembra in particolare essere svolto dal CXCL10 [17,19]; esso è infatti il primo ligando del CXCR3 ad essere rilevato dopo un allotrapianto e l'unica chemochina indotta anche da un isotrapianto [20]. In particolare, è stato dimostrato che il CXCL10 derivante dal donatore ha un ruolo fondamentale nell'iniziare le allorisposte [20].

Hancock e collaboratori hanno dimostrato, in modelli murini di trapianto cardiaco, che riceventi *knock out* per il gene di CXCR3 (CXCR3 $^{-/-}$) mostrano un notevole ritardo nello sviluppo di rigetto [21] e che anche il blocco della produzione di CXCL10 da parte delle cellule endoteliali di un organo proveniente da donatore CXCL10 $^{+/+}$ prolunga significativamente la sopravvivenza del trapianto [20]. Un trattamento concomitante con una dose sub-terapeutica di ciclosporina porta, inoltre, alla sopravvivenza permanente del trapianto nei riceventi CXCR3 $^{-/-}$ [22]. Inoltre, la neutralizzazione di CXCL10 con anticorpi monoclonali previene il richiamo nell'organo di linfociti T attivati e reverte lo sviluppo di rigetto acuto in modelli sia di trapianto di cuore [21] che di intestino [23]. E' stato anche dimostrato che la neutralizzazione di CXCL10 riduce l'attrazione delle cellule Th1 e migliora la funzionalità renale in animali con danno renale microvascolare [24], a conferma che il declino della funzionalità renale seguente a rigetto del trapianto di rene correla con il danno tubulo-interstiziale e la fibrosi renale provocati da accumulo di leucociti Th1 e perpetuate dalla produzione locale di chemochine [14,25,26]. Quindi, l'up-regolazione locale di CXCL10 porta all'iniziale attivazione delle cellule NK CXCR3 $^{+/+}$ e al rilascio, da parte di queste stesse cellule, di IFN γ , seguito da un'ulteriore up-regolazione di CXCL10 e dalla produzione di altre chemochine. L'allorispota è poi progressivamente amplificata attraverso il richiamo di cellule Th1 CXCR3 $^{+/+}$ e di altre cellule effettrici, specialmente macrofagi [27].

Negli ultimi anni l'attenzione della ricerca scientifica si sta sempre più concentrando sull'espressione delle chemochine e dei loro recettori nei trapianti umani [16].

In particolare, è stato dimostrato che l'espressione di CXCR3 e CXCL10 nell'organo trapiantato è associata al rigetto acuto del trapianto di rene [27], polmone [28] e cuore [17,19,29,30].

Dunque, le interazioni CXCL10-CXCR3 sembrano svolgere un ruolo importante nella patogenesi del danno tissutale causato dal rigetto in modelli multi-organo.

Oltre ad attrarre i leucociti, CXCL10 altera anche la funzionalità delle cellule endoteliali e muscolari lisce vascolari [31] ed è altamente espresso a livello delle strutture tubulari e glomerulari in trapiantati di rene soggetti a rigetto. In particolare, a livello renale la fonte principale di CXCL10 sono le cellule epiteliali tubulari [32]. La capacità di CXCL10 di bersagliare sia le cellule immunitarie che quelle vascolari e tissutali suggerisce che esso abbia un ruolo importante non solo nella patogenesi del rigetto, ma anche nello sviluppo della vasculopatia (CAV) e della nefropatia (CAN) croniche associate, rispettivamente, al trapianto di cuore [17] e di rene [31].

Inoltre, nei trapiantati di rene, elevati livelli serici pre-trapianto di CXCL10 rappresentano un fattore di rischio predittivo di rigetto e perdita dell'organo, indipendentemente dallo stato infiammatorio sistemico del paziente [31,33].

Data l'importanza rivestita dall'asse CXCL10-CXCR3 nel rigetto del trapianto, da tempo esso è stato suggerito come possibile target terapeutico nella gestione dei soggetti trapiantati [19].

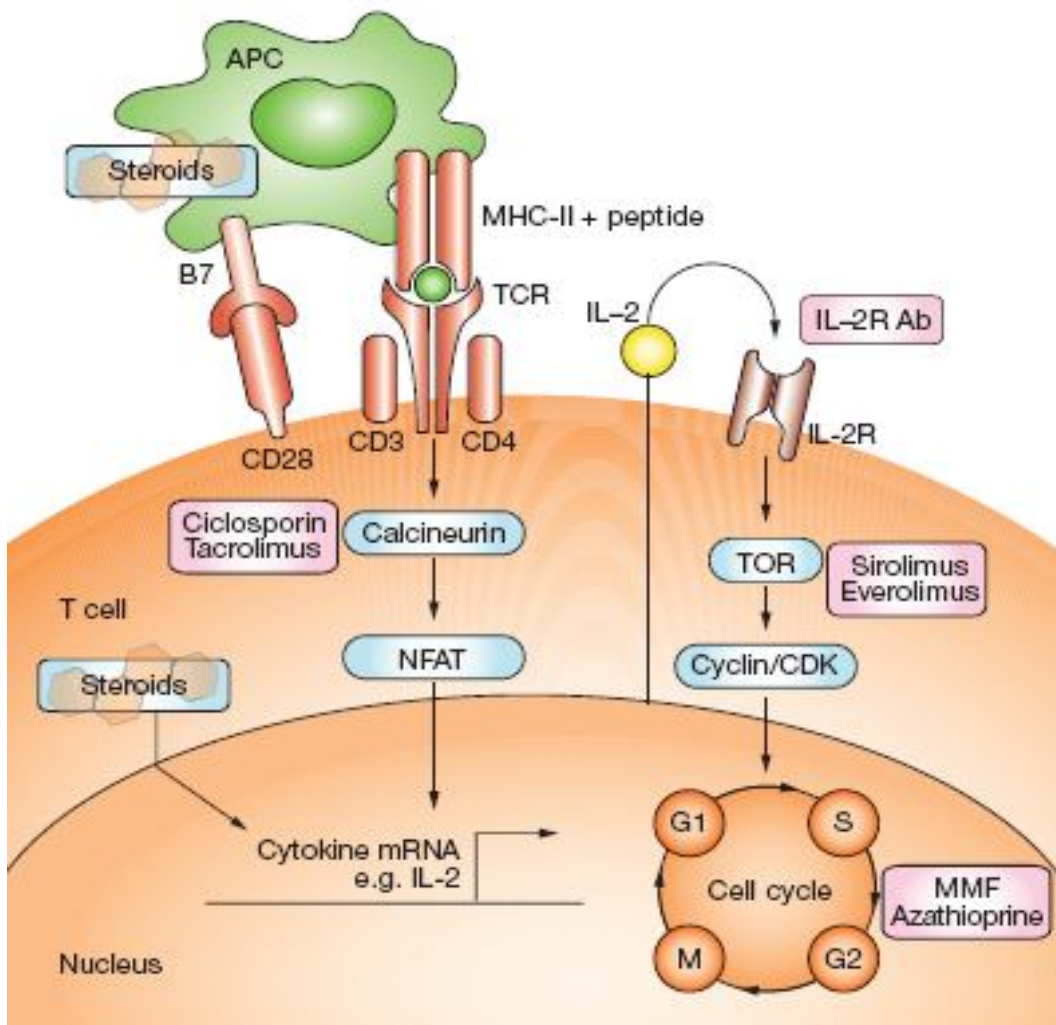
6. TERAPIA IMMUNOSOPPRESSIVA NEL TRAPIANTO

Nonostante il miglioramento delle tecniche chirurgiche abbia fatto sì che i trapianti d'organo siano diventati di routine e, nel caso del trapianto di rene, abbiano abbassato la mortalità rispetto a pazienti non trapiantati sottoposti a dialisi, il successo del trapianto è vincolato all'assunzione di farmaci antirigetto e quindi allo sviluppo di regimi terapeutici efficaci.

La strategia comunemente usata per prevenire il rigetto del trapianto consiste nell'utilizzo di farmaci immunosoppressori, che agiscono a livello delle cellule del sistema immunitario. Sono ora disponibili regimi terapeutici composti da agenti immunosoppressivi che colpiscono bersagli intracellulari diversi, agendo così a vari livelli della risposta immunitaria al trapianto, e che quindi lavorano bene in combinazione [34]. Tra gli immunosoppressori comunemente usati nella prevenzione del rigetto del trapianto (Figura 4) ci sono i corticosteroidi (es. metilprednisolone e idrocortisone), gli agenti anti-proliferativi (es. micofenolato mofetile), gli inibitori della calcineurina (ciclosporina A, tacrolimus) e gli inibitori dell'enzima mTOR (sirolimus) [34-36]. A questi farmaci possono essere aggiunti anticorpi contro specifici componenti del sistema immunitario (es. l'anti-IL-2R Basiliximab o l'anti-CD3 Muromonab-CD3), specialmente in pazienti ad alto rischio. Rigetti acuti refrattari a questi trattamenti possono infine richiedere trasfusioni di sangue per rimuovere gli anticorpi contro il trapianto.

I corticosteroidi, potenti agenti immunosoppressivi e anti-infiammatori, sono componenti fondamentali nella gestione del trapianto; essi sono infatti essenziali nella terapia di induzione perioperatoria e sono la prima scelta terapeutica in caso di episodi di rigetto acuto [34]. Essi alterano il numero, la distribuzione e la funzionalità di tutti i tipi di leucociti, così come delle cellule endoteliali [35]. L'effetto maggiore sui linfociti T è ottenuto tramite l'inibizione di due importanti fattori di trascrizione, *Activator Protein* (AP)-1 e *Nuclear Factor* (NF)-kB, che determina la riduzione dell'espressione di numerosi geni ad attività proinfiammatoria, inclusi quelli per fattori di crescita, citochine e molecole di adesione [35].

L'agente anti-proliferativo attualmente più usato in clinica è il micofenolato mofetile (MMF), convertito poi nel principio attivo acido micofenolico (MPA), un inibitore non competitivo dell'inosina monofosfato deidrogenasi, enzima chiave nella sintesi *de novo* delle purine.



da Kobashigawa JA, Patel JK, *Nature Clin Pract Cardiovasc Med* 2006; 3:203-12

Figura 4. Rappresentazione schematica dei meccanismi d'azione dei farmaci immunosoppressori. I farmaci immunosoppressori (mostrati nei riquadri rosa) esercitano i loro effetti a livello di diversi target cellulari per prevenire la proliferazione delle cellule T.

Essendo questa l'unica via con la quale i linfociti proliferanti possono ottenere le purine, a differenza degli altri tipi cellulari che possono invece utilizzare anche vie alternative, MMF agisce da inibitore selettivo della proliferazione dei linfociti [35].

Tra gli inibitori della calcineurina, ormai divenuti i capisaldi della terapia di mantenimento, sono compresi la ciclosporina A (CsA) e il tacrolimus (TAC, precedentemente conosciuto come FK-506). Essi agiscono bloccando l'attività della calcineurina, che defosforila svariate molecole, incluso il fattore di trascrizione NF-AT, coinvolto nell'attivazione del programma trascrizionale dei geni di svariate citochine, tra le quali IL-2. In questo modo CsA e TAC inibiscono la proliferazione calcio-dipendente dei linfociti T [35].

Il sirolimus (SIR) ha una struttura simile a quella del TAC, ma agisce inibendo la chinasi mTOR, che modula l'attività di proteine importanti nella regolazione del ciclo cellulare e quindi svolge un ruolo cruciale nella stimolazione della proliferazione di linfociti B e T, ma anche di cellule muscolari lisce e cellule endoteliali, in risposta a fattori di crescita. Il SIR è quindi in grado di inibire la proliferazione dei linfociti e di prevenire l'aterosclerosi del trapianto in modelli di trapianto cardiaco e l'iperplasia dell'intima in seguito a *stent* coronarico [35].

Negli anni sono stati effettuati molteplici trial clinici, con varie combinazioni di farmaci anti-rigetto (Tabella 1), ad esempio un recente trial per trapiantati di cuore (PIGREC, <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00812786>) prevede la combinazione di ben quattro farmaci. Nonostante i notevoli miglioramenti ottenuti, però, la terapia immunosoppressiva ideale, soprattutto per aumentare la sopravvivenza a lungo termine dell'organo trapiantato, non è stata ancora trovata [37].

Il problema fondamentale che si pone con i farmaci anti-rigetto è che essi devono essere assunti per tutta la durata della vita, e che, se da una parte impediscono episodi di rigetto acuto, dall'altra

Tabella 1. Principali trial clinici multicentrici, prospettici, randomizzati sull'immunosoppressione nel trapianto cardiaco

Study	Number of patients	Comparison	Significant outcomes
Kobashigawa <i>et al.</i> (1998) ²⁹	650	MMF vs azathioprine (+ ciclosporin and steroids, ± induction therapy)	↓ Mortality with MMF at 1 year; ↓ mortality, graft loss, and change in mean maximum intima thickness with MMF at 3 years
Taylor <i>et al.</i> (1999) ¹⁶	85	Tacrolimus vs ciclosporin, both ± azathioprine and steroids ^a	Rejection, infection, impaired renal function, or hyperglycemia did not differ at 1 year ↑ LDL and HDL cholesterol, triglycerides, and new-onset hypertension that requires therapy with ciclosporin
Reichart <i>et al.</i> (2001) ¹⁷	82	Tacrolimus vs ciclosporin, both + azathioprine and steroids ^b	No difference in 3-year survival or freedom from acute rejection, new-onset diabetes mellitus, and necessity for lipid-lowering drugs at 1 year ↓ Need for antihypertensive agents with tacrolimus
Eisen <i>et al.</i> (2001) ^{11c}	380	Microemulsion ciclosporin vs capsule ciclosporin	↓ Need for antibody therapy for rejection, discontinuation of study drug for treatment failures, and lower average corticosteroid dose in the microemulsion group
Eisen <i>et al.</i> (2003) ³⁵	634	Everolimus 15 mg daily vs everolimus 20 mg daily vs azathioprine 10–30 mg/kg body weight + ciclosporin, steroids and statins	↓ Biopsy-proven acute rejection ≥ grade 3A, CAV on IVUS, and CMV in both everolimus groups
Keogh <i>et al.</i> (2004) ³¹	136	Sirolimus vs azathioprine, both + ciclosporin and steroids	↓ Acute rejection and CAV at 6 months and 2 years with sirolimus
Hershberger <i>et al.</i> (2005) ²⁷	434	Induction treatment with intravenous daclizumab within 24 h after transplant vs placebo, both + ciclosporin, MMF, and steroids	↓ Frequency and severity of rejection with daclizumab ↑ Deaths after infection with daclizumab + cytolytic therapy
Kobashigawa <i>et al.</i> (2005) ³⁷	343	Comparison of steroids + sirolimus, tacrolimus + MMF, or ciclosporin + MMF	Survival, treated rejection grade ≥ 3A, post-transplant diabetes mellitus, and hemodynamic compromise rejection did not differ. Rate of any rejection requiring treatment highest with ciclosporin + MMF. Median serum creatinine and triglyceride levels lowest with tacrolimus + MMF. Viral infection rate lowest with tacrolimus + sirolimus

^aTrial in the US. ^bTrial in Europe. ^cNot controlled. CAV, cardiac allograft vasculopathy; CMV, cytomegalovirus infection; IVUS, intravascular ultrasound; MMF, mycophenolate mofetil.

da Kobashigawa JA , Patel JK, *Nature Clin Pract Cardiovasc Med* 2006; 3:203-212

presentano numerosi effetti collaterali anche gravi, come nefrotossicità, epatotossicità, iperlipidemia, diabete mellito e ipertensione. Sebbene i regimi terapeutici siano notevolmente migliorati negli ultimi anni, le complicazioni dovute all'uso a lungo termine dell'immunosoppressione continuano ad avere un impatto significativo su qualità di vita, morbilità e mortalità post-trapianto. Inoltre, gli immunosoppressori classici sono efficaci a dosi vicine al *range* di tossicità e possono essi stessi contribuire all'insorgenza di rigetto cronico.

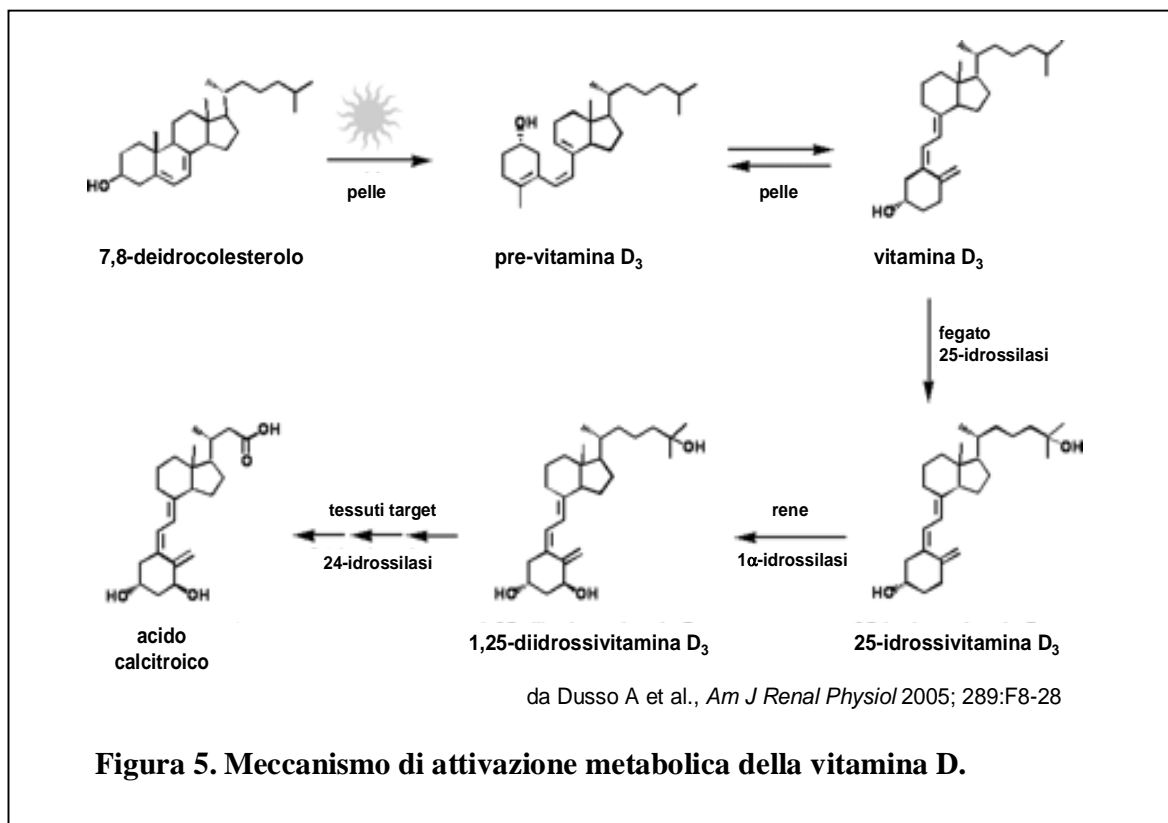
Lo scopo principale della terapia immunosoppressiva consiste, quindi, nel trovare un equilibrio nel dosaggio degli immunosoppressori, in modo da individuare un livello basso di immunosoppressione, che riesca ad impedire il rigetto e la disfunzione dell'organo trapiantato, senza però arrivare all'insorgenza di effetti avversi che contribuiscono alla morbilità a lungo termine dei pazienti trattati in modo cronico [38].

Il ruolo cruciale svolto da CXCL10 nei processi infiammatori Th1-mediati associati al rigetto del trapianto offre potenzialmente l'opportunità di un intervento terapeutico. Perciò, l'aggiunta di nuovi agenti immunosoppressivi che bersagliano il CXCL10 e che mirino a diminuire le dosi e a minimizzare gli effetti collaterali degli immunosoppressori classici, sarebbe altamente auspicabile.

A questo scopo, i nostri studi si sono focalizzati sugli analoghi non/meno ipercalcemizzanti della vitamina D.

7. LA VITAMINA D

La vitamina D è essenziale per un ottimale assorbimento di calcio e fosforo nell'organismo [39]. Essa è un pro-ormone e deve essere convertita nell'organismo al metabolita biologicamente attivo 1,25-diidrossivitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃) (Figura 5).



La vitamina D può essere introdotta con la dieta o ottenuta dall'azione della luce solare sulla pelle. L'esposizione della pelle ai raggi UV induce la conversione fotolitica del 7-deidrocolesterolo in pre-vitamina D₃, seguita da isomerizzazione termica a vitamina D₃ [39].

Il primo passaggio nell'attivazione metabolica della vitamina D è la conversione in 25-idrossivitamina D₃, che avviene principalmente nel fegato ad opera di diversi citocromi P-450.

La 25-idrossivitamina D₃ viene poi trasportata nei tubuli renali e convertita dalla 1α-idrossilasi nell'ormone steroideo 1,25(OH)₂D₃, o calcitriolo. L'inattivazione catabolica è effettuata principalmente dalla 24-idrossilasi, che catalizza una serie di ossidazioni risultanti nella spaccatura della catena laterale.

7.1. Azioni biologiche della vitamina D

Molti degli effetti biologici della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sono mediati dal recettore per la vitamina D (*Vitamin D Receptor*, VDR), membro della superfamiglia dei recettori nucleari per gli ormoni steroidei. Come gli altri membri della famiglia, il VDR agisce come un fattore di trascrizione attivato dal ligando [39].

Il legame con il ligando induce nel VDR cambiamenti conformazionali che ne permettono l'eterodimerizzazione con il recettore X per l'acido retinoico (*Retinoid X Receptor*, RXR). Questo eterodimero trasloca nel nucleo e si lega a specifiche sequenze del DNA, dette *Vitamin D Responsive Elements* (VDRE), che si trovano nella regione *promoter* dei geni target della vitamina D, con conseguente regolazione della trascrizione di tali geni.

Il VDR modula l'espressione dei geni target in tre diversi modi: può regolare positivamente l'espressione di certi geni legandosi alle VDRE presenti sulle loro regioni promoter [40], può regolare negativamente l'espressione di altri geni legandosi a VDRE negative [41], o può inibire l'espressione di alcuni geni antagonizzando l'azione di certi fattori di trascrizione, come NF-AT e NF- κ B [42,43].

Un ruolo fondamentale nel controllo dell'espressione dei geni target è svolto dai cofattori (co-regolatori), proteine nucleari che agiscono a ponte tra l'eterodimero VDR-RXR e l'enzima Polimerasi II. I cofattori comprendono due famiglie di proteine funzionalmente distinte: i coattivatori, che determinano un'induzione della trascrizione, e i corepressori, che si legano ai recettori nucleari non legati o occupati da antagonisti e sopprimono l'espressione dei geni target [44].

Il VDR, come gli altri recettori nucleari, può essere funzionalmente suddiviso in tre regioni con funzioni ben caratterizzate:

- la regione COOH-terminale, che contiene un dominio multifunzionale comprendente il dominio di legame del ligando (*Ligand Binding Domain*, LBD), il motivo di eterodimerizzazione con RXR e il dominio di transattivazione dipendente dal ligando (*Activation Function 2*, AF-2).

- la regione centrale, che contiene il dominio di legame con il DNA (*DNA Binding Domain*, DBD), responsabile dell'interazione ad alta affinità con le VDRE.

- la regione NH2-terminale, che contiene il dominio di transattivazione ligando-indipendente AF-1.

La vitamina D e i suoi analoghi possono anche indurre nelle cellule target delle risposte troppo rapide per coinvolgere cambiamenti nell'espressione genica [45]. Diversi studi hanno indicato che le azioni rapide della vitamina D richiedono la presenza del VDR [46,47], ma il ruolo esatto del VDR nelle azioni rapide non genomiche rimane ancora da chiarire.

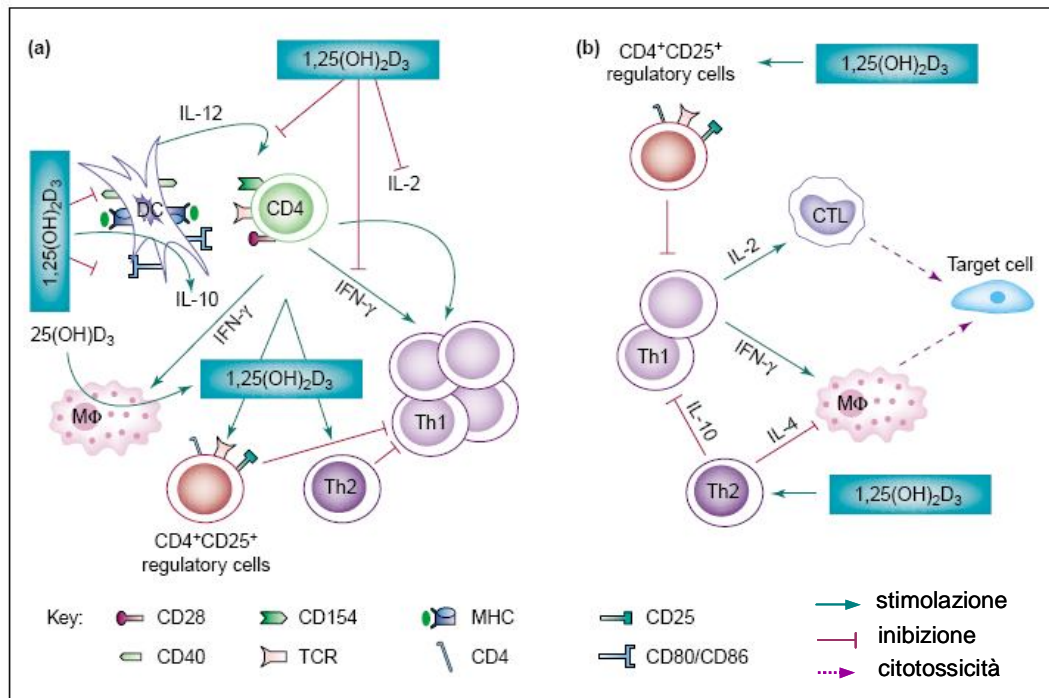
7.2. Effetti anti-infiammatori e immunomodulatori degli agonisti del VDR

Il sistema endocrino della vitamina D è un componente essenziale delle interazioni tra rene, osso, ghiandola paratiroidea e intestino, che mantengono l'omeostasi fosfocalcica, processo vitale per una normale fisiologia cellulare e l'integrità ossea.

Gli organi bersaglio classici del calcitriolo sono appunto l'intestino, dove stimola l'assorbimento del calcio e del fosforo, il tessuto osseo, dove promuove la formazione dell'osso e la sua mineralizzazione e le paratiroidi, dove inibisce la secrezione dell'ormone paratiroideo.

La presenza del VDR in tessuti che non partecipano al mantenimento dell'omeostasi del calcio e in molti tipi di cellule del sistema immunitario ha però portato alla scoperta di una serie di altre importanti funzioni della vitamina D, come la regolazione di proliferazione e differenziazione cellulari e le proprietà anti-infiammatorie e immunomodulatorie [44].

Gli agonisti del VDR possono modulare la risposta infiammatoria attraverso diversi meccanismi negli organi linfoidi secondari e nei tessuti target (Figura 6).



da Mathieu C., Adorini L. *Trends Mol Med* 2002; 8:174-9

Figura 6. Regolazione della risposta immunitaria da 1,25(OH)₂D₃ e i suoi analoghi. La vitamina D e i suoi analoghi possono modulare la risposta immunitaria con diversi meccanismi negli organi linfoidi secondari e nei tessuti target. (a) Negli organi linfoidi secondari, essi inibiscono la produzione di IL-2, stimolano quella di IL-10 e diminuiscono l'espressione delle molecole co-stimolatorie (CD40, CD80, CD86) espresse dalle DCs, inibendo quindi lo sviluppo delle cellule Th1 e favorendo l'induzione delle cellule Th2 e Treg. La vitamina D agisce anche direttamente sulle cellule T inibendo la produzione di IL-2 e IFN γ . I macrofagi (M Φ) possono sintetizzare 1,25(OH)₂D₃ e anche questo può contribuire alla regolazione della risposta immunitaria locale. (b) Nei tessuti target, le cellule patogene Th1, che possono danneggiare le cellule target tramite l'induzione delle cellule T citotossiche (CTL) e dei macrofagi attivati, sono ridotte di numero e la loro attività è ulteriormente inibita dalle cellule Treg e dalle cellule Th2 indotte dalla vitamina D.

In particolare, cellule T e cellule dendritiche (*dendritic cells*, DCs) sono target chiave degli agonisti del VDR.

La vitamina D e i suoi analoghi hanno profondi effetti sul fenotipo e la funzionalità delle DCs, target principale delle azioni immunosoppressive degli agonisti del VDR [48]. Come dimostrato da studi *in vitro* [49] e *in vivo* [50,51] gli agonisti del VDR bloccano la differenziazione e la maturazione delle DCs, ne diminuiscono l'espressione delle molecole co-stimolatorie CD40, CD80, CD86 e MHC di classe II e la secrezione delle citochine IL-12 e IL-23 - critiche per lo sviluppo, rispettivamente, delle cellule Th1 e Th17 - e ne aumentano la secrezione della citochina Th2 anti-infiammatoria IL-10 [48]. Inoltre, la vitamina D nelle DCs up-regola il recettore ILT3, che è associato con l'induzione della tolleranza e la modulazione della produzione di chemochine [52]. Questi effetti portano a DCs con fenotipo tolerogenico e quindi all'inibizione dell'attivazione delle cellule T effettrici e all'induzione di cellule CD4+CD25+ Treg con attività soppressiva [44,53]. Inoltre gli agonisti del VDR non solo favoriscono l'induzione delle cellule CD4+CD25+ Treg, ma possono anche aumentarne il reclutamento verso i siti di infiammazione [54].

Gli agonisti del VDR possono influenzare sviluppo e attivazione delle cellule T mediante la modulazione della funzione delle DCs, ma possono anche agire direttamente sulle cellule T. Poco dopo la scoperta della presenza del VDR nelle cellule T fu dimostrato che la vitamina D è capace di inibire la proliferazione delle cellule T e la secrezione, da parte delle stesse, di citochine indotte dall'antigene [54]. Successivamente è stato dimostrato che gli agonisti del VDR sono inibitori selettivi dello sviluppo delle cellule Th1 e inibiscono direttamente citochine di tipo Th1 come IL-2 e IFN γ [44]. E' stato inoltre visto che in alcuni casi - dipendenti dallo stato di attivazione e differenziamento delle cellule target [55] - la vitamina D aumenta lo sviluppo delle cellule Th2 attraverso un'azione diretta sulle cellule CD4+ *naive* [56].

Il trattamento con gli agonisti del VDR inibisce anche la produzione, da parte dei linfociti T, di IL-17 [57], la citochina proinfiammatoria prototipica del subset Th17, con un ruolo patogenetico importante in vari modelli di infiammazione cronica e danno immuno-mediato [58].

Riassumendo, gli agonisti del VDR sembrano principalmente inibire cellule proinfiammatorie come le Th1 e le Th17, e, in appropriate condizioni favorire anche una deviazione verso il fenotipo anti-infiammatorio Th2 [54].

Sebbene l'inibizione delle cellule Th1 rappresenti un comportamento comune, sono stati dimostrati anche meccanismi di regolazione diretta dei ligandi del VDR sulla produzione di chemochine nei tessuti target [59].

Tutte queste proprietà pleiotropiche hanno portato allo studio dell'impiego di agonisti del VDR per il trattamento di molte patologie, come la psoriasi [60], l'iperparatiroidismo secondario [61] e l'osteoporosi [62]. Inoltre gli agonisti del VDR hanno dimostrato la loro efficacia in trial clinici per il cancro della prostata [63], l'artrite reumatoide [64], l'ipertrofia prostatica benigna [65] e nella prevenzione e nel trattamento di malattie autoimmuni e di rigetto del trapianto in vari modelli animali [44,66].

L'impiego terapeutico della vitamina D nell'uomo è però fortemente limitato dai suoi gravi effetti collaterali, come ipercalcemia, ipercalciuria e riassorbimento osseo, che non ne permettono la somministrazione sistemica prolungata o l'utilizzo a dosi sopra-fisiologiche.

Per superare questo limite sono stati sintetizzati analoghi della vitamina D con le stesse proprietà della molecola madre, ma con una finestra terapeutica più ampia. Grazie alla struttura altamente flessibile della vitamina D (Figura 7) è stato infatti possibile sintetizzare diverse migliaia di analoghi della vitamina D. Molti di essi presentano una combinazione di diverse modificazioni a livello della catena laterale, dell'anello A o modificazioni conservative dell'anello CD o occasionalmente dell'anello B [67]. Tali modificazioni strutturali hanno permesso di sviluppare analoghi con una

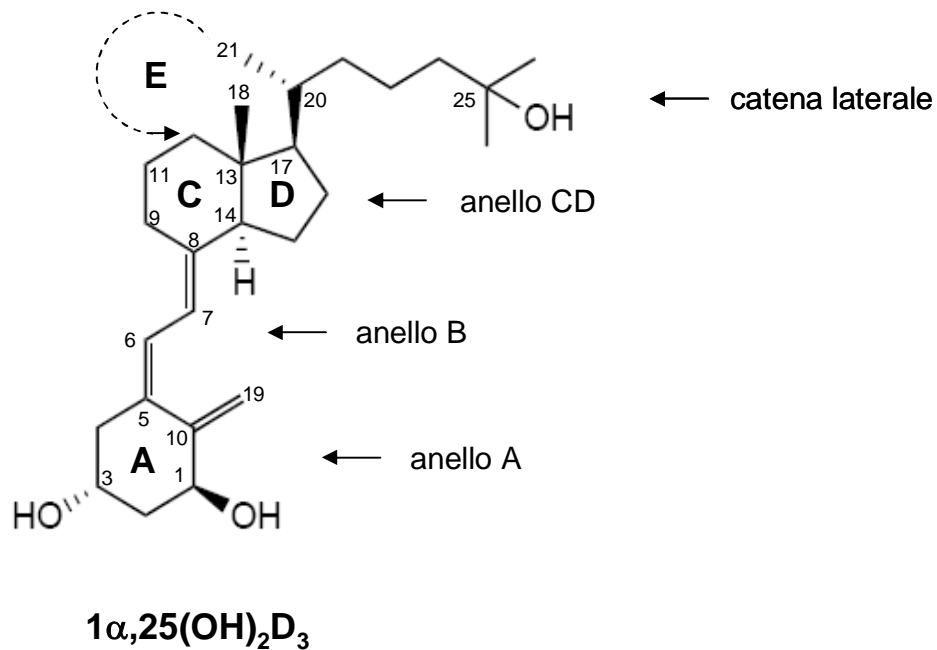


Figura 7. Struttura della vitamina D e possibili siti di modificazioni strutturali per l'ottenimento di analoghi sintetici.

potenza maggiore, con una più bassa attività calcemica e con un aumento della specificità tissutale, in particolare alcuni analoghi presentano proprietà immunoregolatorie selettive.

7.3. La vitamina D e il rigetto del trapianto

Come precedentemente accennato, l'efficacia della vitamina D e dei suoi analoghi è stata dimostrata in diversi modelli animali di rigetto di trapianto sia acuto che cronico [68,69]. Gli agonisti del VDR, testati sia da soli che in associazione ad altri immunosoppressori, si sono mostrati capaci di prolungare la sopravvivenza del trapianto in modelli sperimentali di trapianto di cuore [70,71], fegato [59], isole pancreatiche [72], intestino [73] e pelle [74].

E' stato inoltre dimostrato che nei trapiantati di rene la perdita d'organo diminuisce in pazienti trattati con vitamina D [75], suggerendo la sua capacità di inibire il rigetto cronico.

L'attivazione del VDR ha effetti benefici in pazienti con insufficienza renale cronica [76-81], inoltre recentemente sono stati dimostrati gli effetti renoprotettivi di un agonista del VDR, sia da solo che in terapia combinata [82,83]. Oltre all'inibizione del sistema renina-angiotensina [82,84-88], tali effetti sembrano attribuibili alle intrinseche proprietà anti-infiammatorie degli agonisti del VDR [44,54].

Inoltre, per il controllo del rigetto, sembrano importanti alcune proprietà degli agonisti del VDR, ovvero l'inibizione della proliferazione delle cellule muscolari lisce e della produzione di citochine [66].

Effetti additivi e anche sinergici sono stati osservati tra la vitamina D o i suoi analoghi e gli agenti immunosoppressivi, come CsA, TAC e SIR [89], suggerendo la possibilità di un trattamento combinato. E' stato, ad esempio, provato che il trattamento combinato tra un agonista del VDR (MC1288) e CsA inibiva l'infiammazione dell'avventizia e l'iperplasia dell'intima nei trapianti di aorta nel ratto, impedendo il rigetto cronico del trapianto [90].

Quindi, le evidenze sperimentali disponibili suggeriscono la possibile applicazione clinica degli agonisti del VDR nel trapianto, come potenziali agenti dose-riducenti per gli immunosoppressori classici, con lo scopo di facilitare l'induzione della tolleranza e prevenire il rigetto cronico del trapianto [68], riducendo al contempo gli effetti avversi dei farmaci convenzionali.

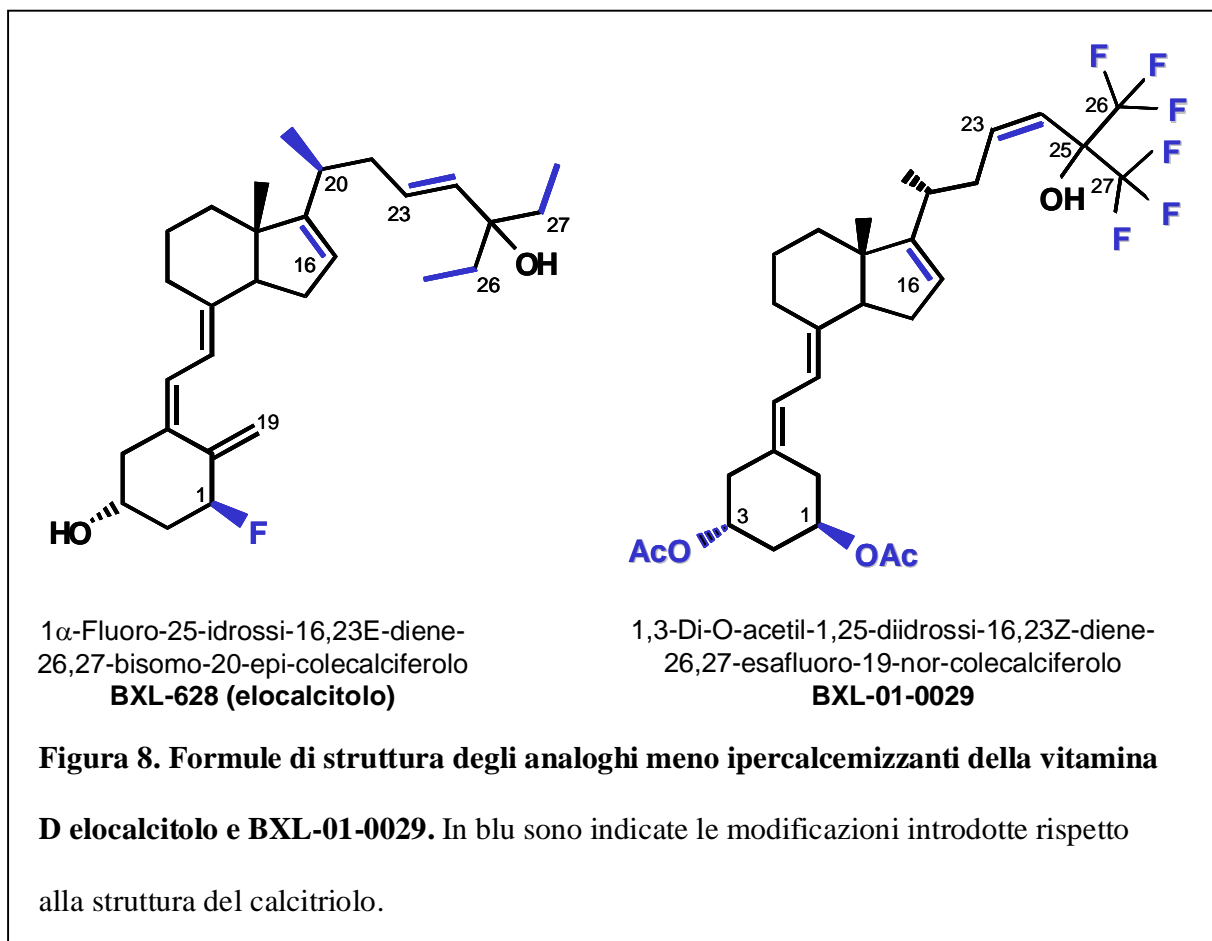
Il nostro studio si è concentrato su due analoghi della vitamina D in particolare: elocalcitolo e BXL-01-0029.

Elocalcitolo (1 α -fluoro-25-idrossi-16,23E-diene-26,27-bis-omo-20-epi-colecalciferolo, chiamato anche BXL-628 e Ro-26-6228, Figura 8), che in studi preclinici *in vitro* e *in vivo* si era dimostrato capace di inibire la proliferazione cellulare della prostata e le cui proprietà anti-infiammatorie sono

state dimostrate in un modello sperimentale di prostatite autoimmune [91,92], è stato proposto per il trattamento dell'iperplasia prostatica benigna [92-94]. Un'importante scoperta dello studio clinico è il favorevole profilo di sicurezza dell'elocalcitolo, che non ha provocato nei pazienti trattati nessun evento avverso serio e la cui percentuale di eventi avversi di limitata rilevanza clinica non era significativamente diversa da quella del placebo [93]. Inoltre, studi *in vitro* su patologie tiroidee autoimmuni hanno dimostrato che elocalcitolo attenua le risposte infiammatorie Th1-mediate bersagliando la secrezione di CXCL10 in cellule residenti d'organo e immunitarie [95].

In un modello di trapianto d'aorta [96] è stato dimostrato che elocalcitolo ritarda significativamente l'insorgenza di rigetto acuto. Esso riduce significativamente l'iperplasia dell'intima (80% di riduzione in più rispetto al controllo) e previene l'infiltrazione leucocitaria nell'avventizia dell'aorta, con una conseguente profonda riduzione del numero di macrofagi e cellule dendritiche infiltranti. Inoltre, nei topi trattati con elocalcitolo si osserva una significativa diminuzione dei trascritti codificanti per diversi geni muscolo-correlati. Questi risultati hanno portato quindi gli autori a concludere che elocalcitolo è in grado di inibire, come monoterapia, il rigetto sia acuto che cronico in modelli murini.

BXL-01-0029 (1,3-Di-O-acetil-1,25-diidrossi-16,23Z-diene-26,27-esafuoro-19-nor-colecalciferolo, Figura 8) è la forma acetata del composto BXL-2198 (1,25-diidrossi-21-16,23Z-diene-26,27-esafuoro-19-nor-colecalciferolo, chiamato anche BXL-219 e Ro 26-2198), un agonista del VDR la cui efficacia sui processi Th1-mediate è stata dimostrata in modelli animali di diabete di tipo 1 [97,98] e di carcinogenesi del colon [99]. Quindi, BXL-01-0029 è un profarmaco del BXL-2198; la conversione nel composto attivo è mediata da esterasi presenti in tutti i tipi di cellule. Essendo un profarmaco, BXL-01-0029 è meno attivo del BXL-2198 nel primo passaggio intestinale dopo



somministrazione orale e quindi è meno ipercalcemico (massima dose tollerata: 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per BXL-01-0029 vs. 0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per BXL-2198). In particolare, per valutare la massima dose tollerata, a topi C57BL/6 femmina di otto settimane (3 topi per gruppo) sono state somministrate per via orale delle soluzioni (0.1 ml/topo) a varie concentrazioni dei due agonisti del VDR, ogni giorno per quattro giorni. Gli analoghi erano stati formulati in migliolo alle concentrazioni finali di 0.01, 0.03, 0.1 0.3, 1, 3, 10 30, 100 e 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Il sangue per il dosaggio del calcio serico è stato prelevato dalla coda il quinto giorno, cioè il giorno finale dello studio. I livelli serici del calcio sono stati determinati usando un saggio colorimetrico (Sigma Diagnostics, procedura no. 597). La dose più alta dell'agonista tollerata senza indurre ipercalcemia (calcio serico >10.7 mg/dl) è stata presa come la massima dose tollerata ed espressa in $\mu\text{g}/\text{kg}$.

SCOPO DELLA RICERCA

Nonostante i miglioramenti delle terapie immunosoppressive, il rigetto del trapianto rappresenta ancora un problema clinico significativo.

I segni e i sintomi del rigetto cellulare acuto sono spesso vaghi; inoltre, per quanto riguarda il trapianto di cuore, al momento non ci sono modalità di *imaging* o *marker* serici validi, che possano sostituire le biopsie di sorveglianza nella fase post-trapianto di controllo e gestione dei pazienti sottoposti a trapianto cardiaco [100]. Quindi, l'individuazione di un *marker* biologico non invasivo e predittivo di rigetto acuto sarebbe altamente auspicabile.

Il ruolo chiave di CXCL10 nella patogenesi dei rigetti di trapianto d'organo è ormai nota da tempo [33]. In accordo, come detto precedentemente, i livelli serici pre-trapianto di CXCL10 rappresentano un fattore di rischio predittivo di rigetto e perdita d'organo in pazienti sottoposti a trapianto di rene [31,33]. Per questo il nostro studio è stato inizialmente volto a valutare il valore prognostico della misurazione dei livelli serici di questa chemochina, prima del trapianto, in pazienti trapiantati di cuore, per vedere se CXCL10 potesse essere proposto anche come *marker* predittivo di rigetto cardiaco. Abbiamo quindi dosato i livelli serici pre-trapianto di CXCL10 nei sieri di 143 pazienti, affetti da insufficienza cardiaca terminale, sottoposti a trapianto cardiaco. Negli stessi sieri sono stati misurati anche i livelli della citochina CCL22/MDC, utilizzata come controllo. CCL22 è stata scelta come controllo perché, nonostante che i suoi livelli serici aumentino in diversi disordini infiammatori immuno-mediati, essa non è coinvolta nella patogenesi del rigetto acuto, mentre sembra contribuire all'istaurarsi della tolleranza [101], e il bersagliamento del suo recettore specifico CCR4 non altera la sopravvivenza del trapianto [102-104]. Il ruolo delle chemochine leganti i recettori CXCR3 e CCR4 nella biologia del trapianto è riassunta in Figura 9.

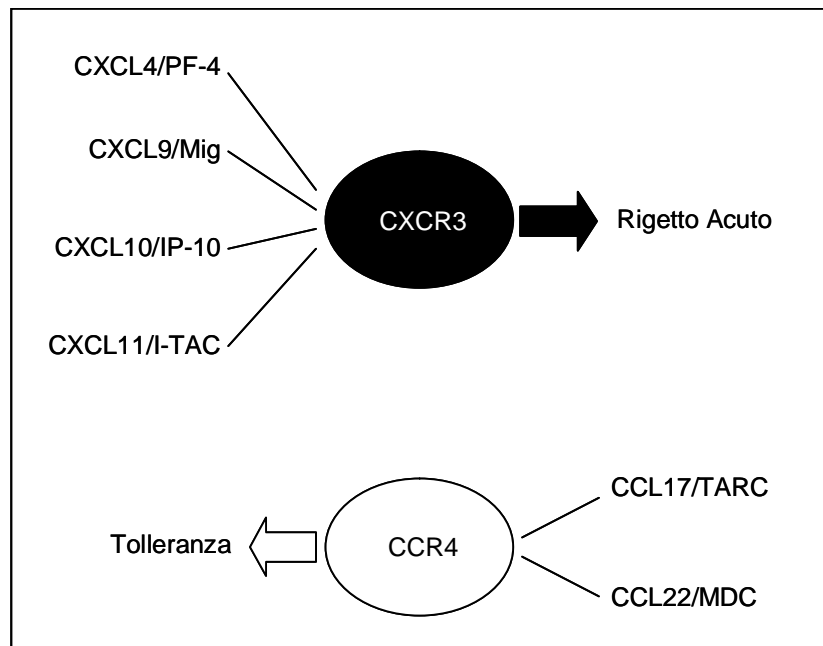


Figura 9. Le chemochine leganti i recettori CXCR3 e CCR4 e il loro rispettivo ruolo nella biologia del trapianto. Il recettore CXCR3 lega le chemochine Fattore Piastrinico-4 (PF-4/CXCL4), Proteina di 10 kDa inducibile dall'IFN γ (IP-10/CXCL10), Monochina indotta dall'IFN γ (Mig/CXCL9), e Chemoattrattrice per le cellule T inducibile dall'IFN γ (I-TAC/CXCL11). CXCR3 mostra un ruolo centrale nella risposta immunitaria al trapianto e recluta le cellule T che iniziano il rigetto acuto del trapianto. Il recettore CCR4 lega le chemochine Chemochina Derivata dai Macrofagi (MDC/CCL22) e Chemochina Regolata dal Timo e dall'Attivazione (TARC/CCL17). CCR4 mostra un ruolo importante nell'induzione della tolleranza al trapianto. Per ogni chemochina sono indicate la nomenclatura vecchia e quella nuova.

I meccanismi della risposta immunitaria coinvolti nel danno all'organo trapiantato in caso di rigetto non sono stati ancora pienamente chiariti. Mentre la partecipazione delle cellule endoteliali e delle cellule T alloreattive è ben documentata [105,106], il ruolo delle cellule residenti cardiache rimane ancora da definire. Dal momento che CXCL10 appare come il principale mediatore dell'infiltrazione allospecifica nell'organo trapiantato [105], il nostro studio è stato indirizzato a valutare il ruolo di questa chemochina nelle cellule cardiache. Infatti, chiarire le fonti del CXCL10 e le strade che esso utilizza potrebbe essere molto vantaggioso per disegnare strategie terapeutiche volte ad abbattere i processi infiammatori e a ridurre gli effetti collaterali dannosi.

Colture cellulari di cardiomiociti facilmente disponibili sarebbero un ottimo strumento per la ricerca *in vitro* sul rigetto del trapianto. Gli studi a livello cellulare, però, sono stati spesso ostacolati dalla mancanza di tecniche per l'isolamento e la messa in coltura di cellule cardiache adatte a saggi elettrofisiologici, biochimici e di segnalazione. Quindi, per prima cosa abbiamo voluto mettere a punto e caratterizzare un modello funzionale e riproducibile di cardiomiociti umani (Hfcm), valutando anche la loro risposta alle citochine proinfiammatorie IFN γ e TNF α , in termini di secrezione di CXCL10.

Dal momento che l'asse CXCL10-CXCR3 è emerso come il più importante nel rigetto dei trapianti cardiaco e renale e svolge un ruolo cruciale nelle patologie renali Th1-mediate, interferire con la produzione di CXCL10 potrebbe ridurre significativamente i processi infiammatori ed avere una notevole importanza clinica [19].

I farmaci immunosoppressori comunemente usati per la prevenzione e il trattamento del rigetto di trapianto bersagliano specificamente le cellule del sistema immunitario; disporre di farmaci efficaci anche sulle cellule residenti, in modo da interferire con il *loop* infiammatorio Th1-mediato, potrebbe essere utile in clinica per la gestione dei pazienti sottoposti a trapianto. Inoltre i farmaci attualmente in uso sono efficaci a dosi vicine al *range* di tossicità e presentano numerosi effetti avversi. Quindi,

nuovi farmaci capaci di bersagliare CXCL10 e volti a diminuire le dosi e gli effetti tossici dei farmaci immunosoppressori classici sarebbero auspicabili.

Basandosi sulle prove precliniche disponibili, gli agonisti del VDR sembrerebbero candidati interessanti come agenti dose-riducenti per i farmaci immunosoppressori classici nelle patologie Th1-mediate [54]. Nel nostro studio abbiamo perciò voluto verificare se elocalcitolo e BXL-01-0029 potessero essere proposti come immunosoppressori aggiuntivi nei regimi terapeutici immunosoppressivi per il trattamento del rigetto del trapianto.

Abbiamo quindi valutato l'effetto di BXL-01-0029 su cardiomiociti sottoposti a stimoli proinfiammatori, a confronto con tacrolimus, sirolimus, acido micofenolico (principio attivo del micofenolato mofetil), metilprednisolone e ciclosporina A, farmaci già in uso in clinica per il trattamento del rigetto cardiaco, e con rosiglitazone, un farmaco in uso per il trattamento del diabete di tipo 2 [107] e del diabete mellito post-trapianto [108], che ha mostrato proprietà anti-infiammatorie [109]. Relativamente al BXL-01-0029 abbiamo anche valutato l'effetto sulla secrezione di CXCL10, indotta da stimoli proinfiammatori, da parte di linfociti T CD4+, e approfondito lo studio sui suoi meccanismi d'azione, e sulla sua eventuale tossicità, nelle Hfcm, usando per confronto l'acido micofenolico (principio attivo del micofenolato mofetil).

Abbiamo inoltre valutato l'effetto di elocalcitolo e BXL-01-0029 sulla secrezione di CXCL10 indotta da IFN γ e TNF α in cellule epiteliali tubulari renali isolate (come detto precedentemente la fonte principale di CXCL10 nel rene [32], a confronto con tacrolimus, sirolimus, idrocortisone, metilprednisolone, ciclosporina A e acido micofenolico, già utilizzati nel trattamento delle patologie renali. Per valutare il possibile utilizzo di una terapia combinata, abbiamo inoltre trattato le cellule renali con una combinazione di BXL-01-0029 e tacrolimus a varie dosi. Inoltre abbiamo valutato gli eventuali effetti tossici dei farmaci testati con saggi di vitalità cellulare a 6 giorni.

MATERIALI E METODI

1. CHEMICALS

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/Ham's F-12 (1:1) (DMEM/F12) con e senza rosso fenolo, RPMI 1640, tampone fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) senza $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, albumina di siero bovino (BSA, frazione V), L-glutamina, antibiotici, NaOH, etanolo assoluto, soluzione EDTA-tripsina, reagente Bradford, anticorpo (Ab) *rabbit* anti-miosina I β , Ab monoclonale (mAb) *mouse* anti-actina α della muscolatura liscia (*α -smooth muscle actin*, α -SMA, clone 1A4), mAb *mouse* anti-connessina 43 (Cx43) (clone CXN-6), Ficoll-Hypaque, Forbol 13-acetato, 12-miristato (P), Ionomicina (I), acido micofenolico (MPA), tacrolimus (TAC), sirolimus (SIR), idrocortisone (Hy), metilprednisolone (MeP), ciclosporina A (CsA), SB203580, LY294002, SP600125, U0126, fludarabina, e tutti i reagenti per western blot e per gli esperimenti di elettrofisiologia sono stati acquistati da Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, USA). Rosiglitazone è stato acquistato da Glaxo (Welwyn, UK). BXL-01-0029 e elocalcitolo sono di Biozell (Milano, Italia). BAY 11-7082 è di Vinci Biochem S.r.l. (Vinci, Italia).

Renal Epithelial Cell Growth Medium (REGM™) è di Lonza Group Ltd. (Basel, Svizzera). Siero fetale bovino (*Fetal bovin Serum*, FBS) e siero fetale di vitello (*Fetal Calf Serum*, FCS) sono di Hyclone (Logan, UT, USA). Aminoacidi non essenziali, piruvato, 2-mercaptoetanolo sono di Gibco Laboratories (Grand Island, NY). La collagenasi di tipo IV è di Worthington (Lakewood, NJ, USA). IFN γ , TNF α e kit ELISA per il dosaggio di CXCL10, CCL22, IFN γ e TNF α sono di R&D Systems, (Minneapolis, MN, USA).

Per l'analisi in citometria a flusso, mAb purificato anti-Sca-1 (CL8934AP, *rat* IgG2b) e IgG2b *goat* anti-*rat* (CLCC40001) sono di Cederlane (Ontario, Canada). mAb PE-anti-CD133/2 (293C3, *mouse*

IgG2b), IgG2b *goat* anti-*mouse* e kit PE FASER sono di Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Germany). mAb PE-anti-CD119 (GIR-208, *mouse* IgG1), mAb PE-anti-TNFR2 (22235.311, *mouse* IgG2a) e gli mAbs di controllo isotipico (*mouse* IgG1: clone 15H6, *mouse* IgG2a: clone HOPC-1) sono stati acquistati da BD Biosciences (Mountain View, CA, USA). Per l'estrazione di RNA, il kit RNeasy Mini reagent è stato comprato da Quiagen Italy (Milano, Italia). kit TaqMan Reverse Transcription Reagents, le mix con *primers* e *probes* (Taqman Gene Expression Assays), Isl1 (ID: Hs00158126-m1), GATA4 (ID: Hs00171403-m1), Nkx2.5 (ID: Hs00231763-m1), CXCL10 (ID: Hs00171042-m1), IFN γ R (ID: Hs00166223-m1), TNF α R2 (ID: Hs00153550-m1) e 1x Universal Master Mix sono di Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). L'RNA umano totale usato come riferimento per la PCR quantitativa è di Stratagene (La Jolla, CA, USA).

Per western blot e/o analisi in immunofluorescenza, Abs primari: Ab policlonale (pAb) *goat* anti-tropomiosina (E-17), mAb *mouse* anti- β -actina, Abs secondari coniugati alle perossidasi (IgG), pAb *rabbit* anti-subunità p65 di NF- κ B (C-20) sono di Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). mAb *mouse* anti-troponina I cardiaca (cTnI) è di Chemicon International (Temecula, CA, USA); pAb *rabbit* anti-pStat1 (Tyr701), *mouse* anti-pNF- κ B (Ser536) sono di Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA, USA). Gli Abs coniugati Alexa Fluor 488 *goat* anti-*rabbit* per l'immunofluorescenza sono di Molecular Probes (Eugene, OR, USA).

Il kit di dosaggio proteico Coomassie Bio-Rad è di Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA). Le membrane in polivinilidenefluoruro (PVDF, Hybond-P) sono di Amersham Bioscience (Little Chalfont, UK). Trypan blue è di Euroclone (Pavia, Italy). Tutti i reagenti per Sodio Dodecil Solfato-PoliAcilammide Gel Elettroforesi (SDS-PAGE) sono di GE Healthcare Bio-Sciences Corp. (Piscataway, NJ, USA).

Il materiale plastico per le colture cellulari e le unità filtranti per la preparazione dei mezzi di coltura sono di Corning (Milano, Italia).

2. PAZIENTI

143 pazienti sottoposti a trapianto ortotopico di cuore, su un totale di 220 portati al Centro Trapianti di Siena tra il 1997 e il 2007, sono stati inseriti nel nostro studio e seguiti per 6 mesi dopo il trapianto. I pazienti che sono deceduti nel periodo peri-operatorio o con campioni di siero pre-trapianto non disponibili sono stati esclusi dall'analisi. I 143 pazienti che avevano i sieri pre-trapianto disponibili sono stati testati retrospettivamente per il contenuto serico di CXCL10 e CCL22. Tutti i pazienti hanno fornito il loro consenso informato; la procedura usata in questo studio era in accordo con la Commissione Etica Regionale sulle sperimentazioni umane. Un'aliquota è stata ottenuta dal campione di siero usato per il *cross-match* citotossico finale al momento del trapianto (entro 1 mese prima della data del trapianto; numero medio di giorni tra la raccolta del siero e la data del trapianto: 16 ± 10). L'altra aliquota è stata selezionata casualmente da tutti i campioni disponibili ottenuti dagli stessi pazienti almeno 3 mesi prima (numero medio di giorni tra la raccolta del siero e la data del trapianto: 136 ± 32). I campioni sono stati congelati a -70 °C fino al momento dell'utilizzo per i dosaggi. Tutti i riceventi il trapianto erano Caucasici. Le caratteristiche demografiche dei riceventi sono riassunte in Tabella 2. Il trattamento immunosoppressivo includeva induzione citolitica - corticosteroidi; corticosteroidi combinati con ATG (globuline *rabbit* anti-timociti umani); corticosteroidi combinati con basiliximab (anticorpo monoclonale chimerico *mouse* anti-IL-2R delle cellule T umane) - seguito da un regime di mantenimento di tre farmaci, con ciclosporina o tacrolimus, azatioprina o micofenolato mofetil e corticosteroidi. La tipizzazione del Sistema degli antigeni leucocitari umani (HLA) e la determinazione del pannello di anticorpi reattivi linfocitotossici (PRA) sono state effettuate al Laboratorio di Tipizzazione Tissutale dell'Azienda

Tabella 2. Dati demografici, clinici e biochimici della popolazione studiata.

Età del ricevente (anni)	54.51±0.72
Sesso del ricevente (% maschi)	85.31%
Diagnosi (% CMPD idiopatica)	39.06%
Diabete	17.54%
Ipertensione polmonare ^a	43.41%
Creatinina (µmol/L)	1.32±0.04
Frazione di eiezione	20.32±0.58 %
CXCL10 (pg/ml)	178.98±9.51
CCL22 (pg/ml)	570.30±29.43
CMV nel ricevente	19.47%
Tempo di ischemia (minuti)	195.10±3.95
Terapia di induzione	88.39%
- Corticosteroidi+ATG	11.61%
- Corticosteroidi+basiliximab	
Età del donatore (anni)	32.74±1.08
Sesso del donatore (% maschi)	65.44%
HLA-A+ B + DR ≤ 3	11.9%
HLA-A+ B + DR >3	88.1%

I dati sono riportati come media±SE o come frequenza percentuale, dove appropriato.

^a Ipertensione polmonare, definita da una pressione media dell'arteria polmonare (PAPm) >25 mmHg a riposo o >30 mmHg sotto esercizio (da "Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. The Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology". *European Heart Journal* 2004; 25: 2243-2278).

Ospedaliera Careggi di Firenze. I pazienti con una reattività anticorpale del 5% verso un pannello di test linfocitario scelto a caso sono stati catalogati come sensibili, e rappresentavano l'1.4% di tutti i soggetti. Le biopsie endomiocardiche di routine sono state effettuate seguendo il seguente schema: una volta alla settimana durante le prime quattro settimane, ogni due settimane dalla quinta settimana al terzo mese e mensilmente dal terzo mese al sesto mese. Le biopsie sono state esaminate da patologi esperti e gli è stato attribuito un grado secondo il Sistema di Gradazione Standardizzato stabilito dall'*International Society of Heart and Lung Transplantation* (ISHLT) nel 1990 [110]. Il rigetto cellulare acuto di grado 3A o superiore è stato trattato con metilprednisolone i.v. e solo i rigetti di trapianto provati da biopsia sono stati utilizzati per l'analisi statistica dello studio. Soggetti sani (n=67) omogenei ai pazienti per età e sesso sono stati usati come gruppo di confronto.

3. COLTURE DI CARDIOMIOCITI UMANI FETALI (Hfcm)

Le Hfcm sono state isolate da dodici cuori fetali ottenuti dopo aborti volontari (10-12 settimane di gestazione) effettuati in ospedali autorizzati, e in seguito all'ottenimento di certificati di consenso. L'uso di tessuti fetali umani per scopi di ricerca è stato approvato dalla Commissione per le ricerche sugli uomini dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi di Firenze (protocollo n° 6783-04). I campioni sono stati conservati in PBS tenuto in ghiaccio fino al loro processamento per la preparazione delle colture. In breve, i tessuti sono stati lavati in PBS diverse volte, il tessuto connettivo o altri tessuti, se presenti, sono stati eliminati, i campioni sono stati tagliati in pezzi di 1-2 mm e trattati con collagenasi batterica di tipo IV (2mg/ml) per 10 min a 37 °C. I frammenti sono poi stati raccolti, dispersi meccanicamente attraverso un microfiltro, lavati in PBS, centrifugati a 1200 rpm e messi in coltura in piastre di 60 mm di diametro in una miscela 1:1 (vol/vol) di DMEM/Ham's F-12 supplementata con 10% di FBS inattivato con il calore, glutammina 2 mM, 100 U/ml di penicillina, e 100 µg/ml di streptomina in un'atmosfera completamente umidificata al 95% di aria

e 5% di CO₂. Il numero di cellule ottenuto dai tessuti digeriti oscillava tra 900000 e 2000000, a seconda della grandezza del tessuto di partenza, correlato all'età del donatore. Le colture cellulari confluenti sono state passate con rapporto 1:2-1:4 usando una soluzione EDTA-tripsina (0.2%-0.5%), e usate entro il decimo passaggio. L'espansione cellulare (*population doublings*, PDs) è stata valutata contando il numero di cellule dopo ogni raccolta in un emocitometro. La formula applicata per il calcolo delle PDs era: $PD = \log_2(N_i/N_0)$, dove N_i è il numero di cellule raccolte e N_0 il numero di cellule piastrate. La vitalità cellulare è stata valutata con un saggio di esclusione del trypan blue.

4. COLTURE DI CELLULE EPITELIALI DI TUBULO RENALE PROSSIMALE UMANE (RPTEC)

Le cellule epiteliali di tubulo renale prossimale primarie umane (Clonetics® primary human proximal tubule epithelial cells, RPTEC) sono state acquistate da Lonza Group Ltd. e mantenute in coltura nel mezzo di crescita REGM in un'atmosfera completamente umidificata al 95% di aria e 5% di CO₂.

5. COLTURE DI LINFOCITI T CD4+ UMANI

I *buffy coats* di donatori adulti sani e anonimi sono stati ottenuti con l'approvazione della Commissione Etica Locale. Le cellule mononucleari di sangue periferico (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) sono state isolate per centrifugazione del sangue eparinizzato su un gradiente di Ficoll-Hypaque. Le cellule T CD4⁺ sono state selezionate dai PBMCs con il *sorting* cellulare immunomagnetico, usando un kit di isolamento per CD4 (Miltenyi Biotec), come descritto altrove [111], e mantenute in RPMI 1640 supplementato con L-glutammina 2 mmol/l, 1% di aminoacidi non essenziali, 1% di piruvato, 2-mercaptoetanolo 2×10^{-5} M, 10% di FCS. La purezza della popolazione isolata era sempre maggiore del 95%.

6. ESPERIMENTI DI ELETTROFISIOLOGIA

Le caratteristiche elettrofisiologiche delle Hfcm sono state valutate a temperature ambiente (20-23 °C) con la tecnica del *patch-clamp* nella configurazione *whole-cell* [112]; sono stati usate sia modalità *voltage-clamp* che *current-clamp*.

6.1. Soluzioni

Gli esperimenti sono stati svolti in soluzione *Normal Tyrode* (NT), con composizione (mM): NaCl 140, KCl 5.4, CaCl₂ 1.5, MgCl₂ 1.2, glucose 5.5, e HEPES/NaOH 5, portata a pH 7.4 con NaOH. La tetrodotossina (TTX, 1 μM) è stata usata per bloccare i canali al Na⁺ voltaggio-attivati. La 4-aminopiridina (2 mM), bloccante dei canali al K⁺, è stata usata per testare l'eventuale occorrenza della corrente al K⁺ *transient outward* (I_{to}), sensibile alla 4-aminopiridina. Le correnti al K⁺ *delayed outward* e le correnti al Ca²⁺ *inward* sono state bloccate selettivamente come descritto in precedenza [112]. Le pipette da *patch-clamp* sono state riempite da una soluzione con composizione (mM): 130 KCl, 10 NaH₂PO₄, 0.2 CaCl₂, 1 EGTA, 5 MgATP e 10 HEPES, portata a pH 7.2 con KOH e filtrata in filtri con pori di diametro 0.22 μm.

6.2. Stimolazione

La corrente al K⁺ dei canali *delayed rectifier* (I_{K,tot}) è stata evocata in modalità *voltage-clamp* da gradini di potenziale (V) con incrementi di 10mV, applicati a partire da un potenziale di riposo (*holding potential*, HP) di -60mV per bloccare la corrente al Na⁺ (I_{Na}) e la corrente al Ca²⁺ di tipo T (I_{Ca,T}) e in presenza di nifedipina per bloccare la corrente al Ca²⁺ di tipo L (I_{Ca,L}). La corrente rapida *outward delayed rectifier* (I_{Kr} o I_{K,MAX}) è stata evocata nelle stesse cellule imponendo impulsi di potenziale, della durata di 1 secondo, da -80 a +50 mV, a partire da un HP di -30 mV. I_{Ks} è stata poi ottenuta sottraendo I_{K,MAX} da I_{K,tot}. La corrente I_{to} è stata indotta da gradini di

potenziale da -40 a +50 mV, lunghi 1 secondo, applicati a partire da un HP di -60 mV, essendo INa inattivata. La corrente *inward rectifier* (IK1) è stata evocata da un protocollo di impulsi definito “rampa di potenziale” applicato partendo da un HP di -120mV per arrivare fino a +40mV ad una velocità di 100 mV/s. I potenziali d’azione (PA) sono stati registrati passando alla modalità *current-clamp* dall’amplificatore 200 B. I parametri delle proprietà passive sono stati valutati come in un precedente lavoro [113]. Le ampiezze delle correnti (I) sono state normalizzate per la capacità cellulare lineare (Cm) per permettere il confronto delle correnti registrate da cellule differenti. Il rapporto I/Cm è poi proposto come densità di corrente.

6.3. Elettrofisiologia delle *gap junctions*

Le proprietà elettrofisiologiche delle *gap junctions* tra coppie di Hfcm sono state analizzate da un doppio *patch-clamp* in configurazione *whole-cell* nella soluzione NT. Il protocollo degli impulsi e la procedura di registrazione sono riportati in dettaglio in un precedente lavoro [113]. La relazione tra conduttanza trans-giunzioni allo *steady-state* vs. voltaggio ($G_j - V_j$) è stata descritta usando la funzione di Boltzmann: $G_j = (G_{max} - G_{min}) / \{1 + \exp[A(V_j - V_o)]\} + G_{min}$, dove G_{max} è la conduttanza massima, G_{min} è la conduttanza residua alla fine dei gradini di potenziale, V_o è il potenziale trans-giunzioni a metà strada tra G_{max} e G_{min} , e A è la costante che definisce la sensibilità al voltaggio.

7. ESTRAZIONE DI RNA E REAL TIME RT-PCR

Per l’analisi dell’RNA delle cellule aderenti, le Hfcm sono state incubate per 24 h con IFN γ (1000 U/ml) o TNF α (10 ng/ml) o con la loro combinazione, quest’ultima in presenza o in assenza di BXL-01-0029 (10^{-8} M), o MPA (26 μ g/ml); le RPTEC sono state stimulate per 24 h con IFN γ (1000

U/ml) o TNF α (10 ng/ml), con o senza BXL-01-0029 (10^{-8} M), elocalcitolo (10^{-8} M), TAC (20 ng/ml) o MPA (26 μ g/ml). Cellule in mezzo di coltura senza rosso fenolo e senza siero e contenente 0.1% di BSA e veicolo (etanolo assoluto, 0.47% vol/vol) sono state usate come controllo.

Le cellule sono state mantenute e, dopo la tripsinizzazione, processate come precedentemente riportato [114].

Per l'analisi dell'RNA dei linfociti, le cellule, incubate nelle stesse condizioni riportate per le RPTEC, sono state raccolte come *pellet* per centrifugazione prima della lisi, poi processate come riportato altrove [95]. L'RNA totale è stato estratto dalle cellule con l'*RNeasy Mini reagent kit* seguendo le istruzioni del produttore. La concentrazione e la qualità dell'RNA sono state misurate dallo spettrofotometro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Gli esperimenti sono stati ripetuti 3/6 volte, con differenti preparazioni cellulari.

L'RNA totale (400 ng) è stato retro-trascritto usando il *TaqMan Reverse Transcription Reagents kit*, la misurazione dell'espressione genica è stata effettuata con *real time* RT-PCR (Taq-Man™) e i campioni sono stati processati come precedentemente riportato [114]. La quantità del target, normalizzato verso un gene endogeno di riferimento interno (GAPDH, *pre-developed TaqMan® Assay Reagents*) e relativo a un calibratore (*Quantitative PCR human reference total RNA*) è data dal calcolo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [115].

8. MICROSCOPIA AD IMMUNOFLUORESCENZA

10000 Hfcm sono state piastrate su vetrini copri-oggetto nel loro mezzo di coltura. Dopo 24 h le cellule sono state processate per l'individuazione delle proteine strutturali. Per valutare l'attivazione di Stat1 o NF- κ B, le cellule sono state incubate con mezzo senza siero *overnight*, e poi trattate per 30 minuti con TNF α (10 ng/ml) o IFN γ (1000 U/ml) in presenza o in assenza di BXL-01-0029 (10^{-8}

M) o MPA (26µg/ml). Cellule in mezzo di coltura senza rosso fenolo e senza siero e contenente 0.1% di BSA e veicolo (etanolo assoluto, 0.47%, vol/vol) sono state usate come controllo. L'*immunostaining* è stato effettuato come precedentemente descritto [116] usando Ab primari contro cTnI (1:500), miosina Iβ (1:100), Cx43 (1:250), NF-kB p65 (1:100) o pStat1 (1:100), seguiti dagli Abs secondari coniugati Alexa Fluor (1:200). Per la specificità del metodo, sono stati processati vetrini mancanti dell'incubazione con gli Abs primari o incubati con il corrispondente siero non immune. I vetrini sono stati poi esaminati con un microscopio a contrasto di fase (Nikon Microphot-FX microscope, Nikon, Tokyo, Japan). La percentuale di cellule positive è stata calcolata contando il numero di cellule marcate rispetto al numero totale di cellule presenti in 15 campi separati in ogni vetrino analizzato.

Gli esperimenti sono stati ripetuti 3 volte, con differenti preparazioni cellulari.

9. ANALISI WESTERN BLOT

Per l'analisi delle proteine strutturali, le Hfcm (800000 in piastre di diametro 100 mm) sono state piastrate nel loro mezzo di coltura e raccolte quando quasi confluenti. Per l'analisi della fosforilazione di Stat1 e NF-kB, le Hfcm sono state mantenute in mezzo senza siero *overnight*, e poi trattate per 15 minuti con TNFα (10 ng/ml) o IFNγ (1000 U/ml), in presenza o in assenza di BXL-01-0029 (10^{-8} M) o MPA (26µg/ml), in mezzo di coltura senza rosso fenolo e senza siero e contenente 0.1% di BSA. Cellule in mezzo di coltura senza rosso fenolo e senza siero e contenente 0.1% di BSA e veicolo (etanolo assoluto, 0.47% vol/vol) sono state usate come controllo. I tessuti e le cellule, conservati a -80 °C fino al loro processamento, sono stati omogeneizzati in un buffer di lisi tenuto in ghiaccio (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton, 0.25% sodio dodecilsolfato, SDS), supplementato con un cocktail di inibitori di proteasi, e centrifugati per

15 minuti a +4 °C a 10000 g. Il sopranatante è stato raccolto e la concentrazione proteica è stata misurata usando un *Coomassie Bio-Rad protein assay kit*. Le aliquote di proteine (30 µg) sono state diluite nel buffer riducente di Laemmli 4× (250 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% glicerolo, 8% SDS, 20% 2-mercaptoetanololo, 0.008% blu di bromofenolo) e separate mediante elettroforesi SDS-PAGE su gel di poliacrilammide al 12%. Dopo SDS-PAGE, le proteine sono state trasferite su membrane di PVDF. Le membrane sono state bloccate per 1 h a temperatura ambiente nel buffer al 5% BSA-Tween-Tris-buffered saline (TTBS) (0.1% Tween-20, 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5), lavate in TTBS, e incubate a 4 °C *overnight* con gli Abs primari diluiti in TTBS (anti-Cx43 1:1200; anti-cTnI, anti-tropomiosina, anti-pStat1 e anti-pNF-kB 1:1000; anti-miosina Iβ 1:1500; anti-β actina 1:10000), seguiti dalle IgG secondarie coniugate con le perossidasi (1:5000). Le proteine sono state rivelate con il sistema *enhanced chemiluminescence* (ECL plus; Amersham Bioscience); l'acquisizione delle immagini e l'analisi densitometrica sono state fatte con il software Quantity One su uno strumento ChemiDoc XRS (Bio-Rad Laboratories). L'analisi western blot è stata svolta su almeno 3 esperimenti indipendenti.

10. ANALISI CITOFLUORIMETRICA

Le Hfcm sono state piastrate nel loro mezzo di crescita e mantenute in coltura fino quasi alla confluenza; poi sono state lavate con PBS e incubate in mezzo senza siero *overnight*. Sono poi state stimulate per 24 h con TNFα (10 ng/ml) o IFNγ (1000 U/ml), in presenza o in assenza di BXL-01-0029 (10⁻⁸ M) o MPA (26µg/ml), in mezzo senza siero e senza rosso fenolo contenente 0.1% di BSA. Cellule in mezzo di coltura senza rosso fenolo e senza siero e contenente 0.1% di BSA e veicolo (etanolo assoluto, 0.47% vol/vol) sono state usate come controllo. La citometria a flusso è stata effettuata come dettagliato altrove [117]. Le cellule sono state analizzate in un citometro

BDLSRII, usando il software Diva (BD Biosciences). L'area di positività è stata determinata usando un appropriato mAb isotipo di controllo. Per ogni campione sono stati acquisiti 10000 eventi. La tecnica FASER è stata applicata seguendo le istruzioni del produttore [118]. Gli esperimenti sono stati ripetuti 3 volte, con differenti preparazioni cellulari.

11. SAGGI DI SECREZIONE DI CITOCHINE

Per le cellule aderenti, 4000 cellule/well sono state piastrate in piastre 96-well con il fondo piatto e mantenute come descritto in precedenza [114]. Cellule in mezzo di coltura senza rosso fenolo e senza siero e contenente 0.1% di BSA e veicolo (etanolo assoluto, 0.47% vol/vol) sono state usate come controllo.

(1) Hfcm: le cellule sono state incubate per 24 h con TNF α (0.1, 1, 10, 100 e 500 ng/ml) o con IFN γ (10, 100, 1000, 5000 e 10,000 U/ml), da solo o combinato con TNF α (10 ng/ml); oppure con una combinazione di IFN γ (1000 U/ml) + TNF α (10 ng/ml), con o senza BXL-01-0029 (10^{-8} M), RGZ (5 μ M), MPA (26 μ g/ml), TAC (20 ng/ml), SIR (15 ng/ml), CsA (250 ng/ml) o MeP (250 ng/ml). BXL-01-0029 (10^{-14} - 10^{-6} M), RGZ (0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 30 μ M) e MPA (0.26, 1.3, 2.6, 6.5, 13, 26, 52, 104, 260 μ g/ml) sono stati usati per le curve dose-risposta.

(2) RPTEC: per gli esperimenti con gli inibitori, le cellule sono state stimulate per 24 h con IFN γ (1000 U/ml) + TNF α (10 ng/ml), con o senza 1 h di pre-incubazione con SB203580 (5 μ M), LY294002 (15 μ M), SP600125 (100 μ M), U0126 (20 μ M), fludarabina (50 μ M) o BAY 11-7082 (20 μ M); per gli esperimenti con i farmaci, le cellule sono state stimulate per 24 h con IFN γ (1000 U/ml) + TNF α (10 ng/ml), con o senza BXL-01-0029 (10^{-8} M), elocalcitolo (10^{-8} M), TAC (20 ng/ml), MPA (26 μ g/ml), SIR (15 ng/ml), Hy (100 ng/ml), CsA (250 ng/ml) o MeP (250 ng/ml), o con una combinazione di BXL-01-0029 (10^{-9} - 10^{-8} M) e TAC (2, 10, 20 ng/ml). BXL-01-0029 (10^{-14} - 10^{-6}

M), elocalcitolo (10^{-14} - 10^{-6} M), TAC (2, 5, 10, 20, 50, 200, 500, 1000 ng/ml), MPA (0.26, 2.6, 6.5, 13, 26, 52, 104, 260 µg/ml) sono stati usati per le curve dose-risposta.

(3) linfociti T CD4+: 200000 cellule/well sono state piastrate nel loro mezzo di crescita in piastre 96-well con fondo tondeggiante e stimulate per 48 h con P/I (1 µM/10 ng/ml), con o senza BXL-01-0029 (10^{-8} M), elocalcitolo (10^{-8} M), TAC (20 ng/ml) o MPA (26 µg/ml). Cellule in mezzo di crescita e veicolo (etanolo assoluto, 0.47% vol/vol) sono state usate come controllo.

Il sopranatante è stato poi raccolto (nel caso dei linfociti centrifugato per rimuovere le cellule), e conservato a -20 °C fino al momento dei dosaggi ELISA. Gli esperimenti sono stati piastrati e dosati in esaplicato (Hfcm, RPTE) o triplicato (cellule T CD4+) con 6-10 differenti preparazioni cellulari.

12. DOSAGGI ELISA

I livelli di CXCL10, CCL22, IFN γ e TNF α sono stati misurati nei sieri dei pazienti o nei sopranatanti delle colture cellulari usando kit disponibili in commercio (R&D Systems, Minneapolis, MN), seguendo le istruzioni del produttore. La sensibilità e i coefficienti di variazione intra- e inter-dosaggio per ogni citochina sono indicati nei rispettivi libretti di istruzioni del produttore. I campioni risultati superiori alla concentrazione massima dosabile sono stati diluiti e dosati nuovamente e solo il valore finale è stato considerato nell'analisi. Per tutti i parametri ad ogni dosaggio sono stati inseriti controlli di qualità a bassa, normale e alta concentrazione. La quantità delle citochine secrete è stata calcolata come pg/ml per i linfociti T CD4+ e come pg/µg di proteine totali per le Hfcm e le RPTEC. L'estrazione e la misurazione delle proteine totali per normalizzare la secrezione di Hfcm e RPTEC sono state effettuate come precedentemente riportato [114].

13. VITALITÀ CELLULARE

(1) Le Hfcm (25000 cellule/well) sono state piastrate nel loro mezzo di crescita in piastre 24-well, dopo 24 h sono state messe in mezzo senza rosso fenolo e senza siero *overnight* e poi incubate con BXL-01-0029 (10^{-8} M) o MPA (26 μ g/ml) per 1-7 giorni.

(2) Le RPTEC (30000 cellule/well) sono state piastrate nel loro mezzo di crescita in piastre 12-well, dopo 24 h sono state messe in mezzo senza rosso fenolo e senza siero *overnight* e poi incubate con BXL-01-0029 (10^{-8} M), elocalcitolo (10^{-8} M), TAC (20 ng/ml) o MPA (26 μ g/ml) per 1-6 giorni.

Per entrambi i tipi cellulari, cellule in mezzo di coltura senza rosso fenolo e senza siero e contenente 0.1% di BSA e veicolo (etanolo assoluto, 0.47% vol/vol) sono state usate come controllo.

(3) I linfociti T CD4+ (150000 cellule/well) sono stati piastrati nel loro mezzo di crescita in piastre 96-well e stimolati per 1-6 giorni con P/I (1 μ m/10 ng/ml), con o senza gli stessi farmaci utilizzati nelle RPTEC. Cellule nel mezzo di crescita e veicolo (etanolo assoluto, 0.47% vol/vol) sono state usate come controllo.

Per tutti i tipi cellulari, gli stimoli sono stati aggiunti ogni 48 h. La vitalità delle cellule è stata valutata ogni giorno con il metodo di esclusione del trypan blue (soluzione 0.05% vol/vol in PBS), miscelati in un rapporto 1:1. Il conteggio del numero di cellule è stato fatto con un emocitometro (camera di Burkner), solo le cellule che escludevano il trypan blue sono state incluse nell'analisi ed espresse come percentuale del controllo, per Hfcm e RPTEC, o delle cellule P/I-attivate per i linfociti T CD4+. Gli esperimenti sono stati ripetuti 3-5 volte, con differenti preparazioni cellulari.

14. ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il programma SPSS 12.0 (SPSS forWindows12.0, SPSS Inc, Chicago, IL,USA). Per verificare la distribuzione normale dei dati è stato usato il test di Kolmogorov-Smirnov. E' stato eseguito il test ANOVA (*One-way analysis of variance*). Un valore

di $P < 0.05$ è stato considerato significativo ed è stato corretto per confronto con i test *post hoc* di Dunnett o di Bonferroni, dove appropriato. Il programma ALLFIT (NIH, Bethesda, MD, USA) [119] è stato utilizzato per analizzare le curve dose-risposta ed ottenere i valori di IC50. L'analisi matematica e statistica dei dati elettrofisiologici è stata effettuata con pClamp9 (Axon Instruments) e SigmaPlot (Jandel Scientific). I dati sono stati espressi come $\text{media} \pm \text{errore standard (SE)}$.

RISULTATI

1. PAZIENTI

1.1. Valore predittivo di CXCL10 per il rigetto acuto di trapianto cardiaco

I livelli serici pre-trapianto di CXCL10 e CCL22 sono stati misurati in 143 pazienti sottoposti a trapianto cardiaco e in 67 soggetti sani, omogenei per età e sesso ai pazienti, usati come gruppo di confronto.

I pazienti sottoposti a trapianto mostravano un contenuto medio di CXCL10 nel siero pre-trapianto significativamente più alto dei controlli sani (148.41 vs. 80.08 pg/ml, $P=0.0001$), come mostrato in Figura 10A, mentre non si osservavano differenze nei livelli serici di CCL22 tra i due gruppi (504.14 vs. 517.13 pg/ml, Figura 10B).

Abbiamo poi comparato i livelli serici pre-trapianto di CXCL10 e CCL22 tra i trapiantati che non mostravano segni istologici di rigetto d'organo (non rigettanti) con i soggetti che invece li mostravano (rigettanti).

Abbiamo osservato che i livelli serici pre-trapianto di CXCL10 in soggetti andati poi precocemente incontro a rigetto acuto erano significativamente più alti che in soggetti non rigettanti nei primi 6 mesi dopo il trapianto. Come grafici rappresentativi, sono stati riportati i livelli serici pre-trapianto di CXCL10 misurati in rigettanti e non rigettanti entro 2 mesi (CXCL10: 131.96 pg/ml nei non rigettanti, $n=110$, vs. 204.17 pg/ml nei rigettanti, $n=33$, $P=0.004$, Figura 11A) e entro 6 mesi (CXCL10: 140 pg/ml nei non rigettanti, $n=88$, vs. 166.48 pg/ml nei rigettanti, $n=55$, $P=0.034$, Figura 11B) dal trapianto.

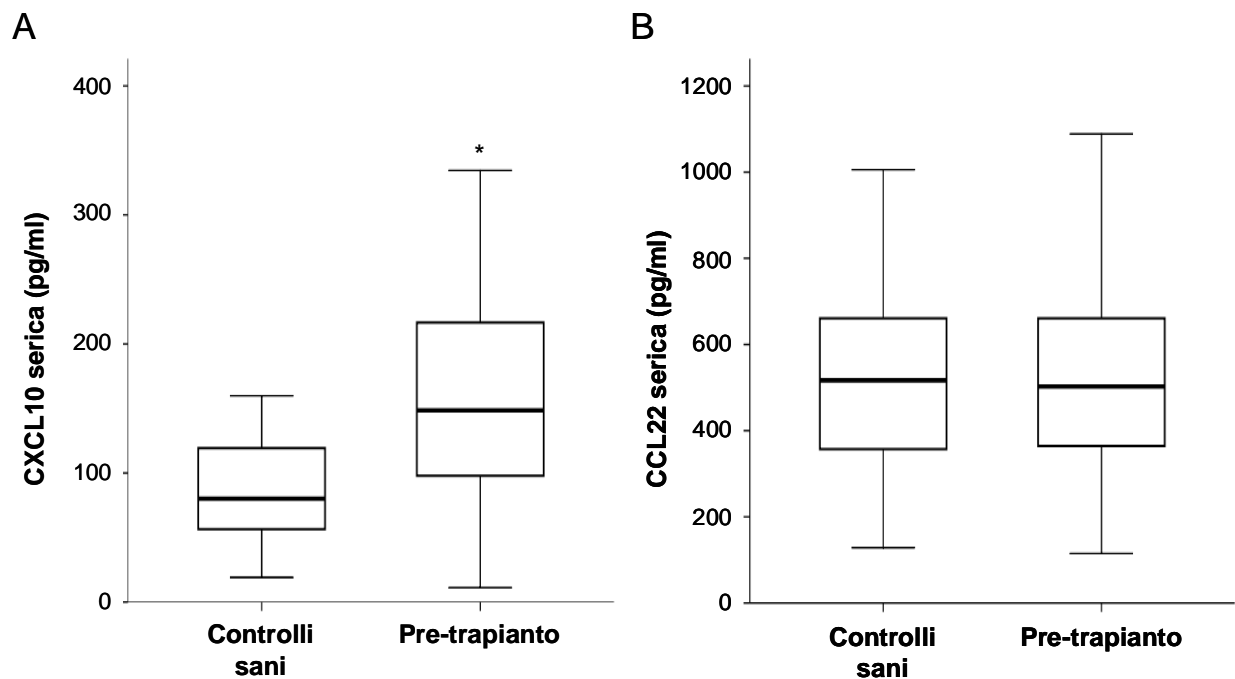


Figura 10. Livelli serici pre-trapianto di CXCL10 e CCL22 pazienti trapiantati di cuore (pre-trapianto) e soggetti sani. (A) Il saggio ELISA rivelava che il contenuto di CXCL10 era significativamente più alto nei pazienti successivamente sottoposti a trapianto (n=143) che nei soggetti sani presi come gruppo di confronto (n=67) (livelli serici medi di CXCL10: 148.41 vs. 80.08 pg/mL, rispettivamente, *P=0.0001). (B) I livelli di CCL22 erano simili nei riceventi il trapianto e nei soggetti sani (livelli serici medi di CCL22: 504.14 vs. 517.13 pg/mL, rispettivamente).

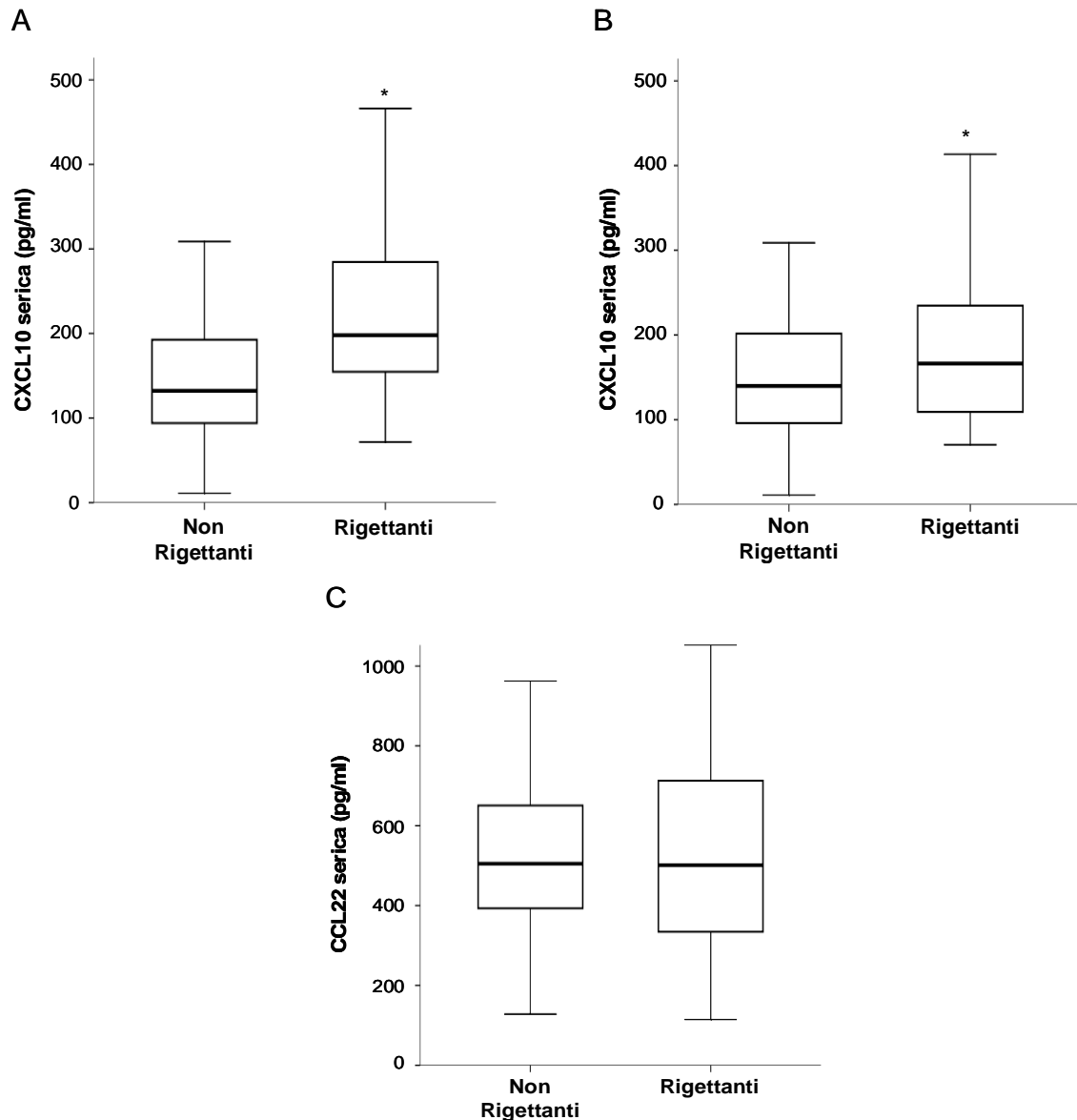


Figura 11. Livelli serici pre-trapianto di CXCL10 e CCL22 in riceventi trapianto di cuore. (A) Nei riceventi che andavano incontro a rigetto (rigettanti) entro 2 mesi dal trapianto i livelli serici pre-trapianto di CXCL10 erano significativamente più alti che nei non rigettanti (204.17 vs. 131.96 pg/mL, *P=0.004, rigettanti n=33, non rigettanti n=110). (B) Risultati analoghi si ottenevano confrontando rigettanti vs. non rigettanti entro 6 mesi dal trapianto (166.48 vs. 140 pg/mL, *P=0.034, rigettanti n=55, non rigettanti n=88). (C) Nessuna differenza era osservata nei livelli serici pre-trapianto di CCL22 entro 6 mesi dal trapianto (501.64 nei rigettanti vs. 504.76 nei non rigettanti).

I livelli di CCL22, invece, non divergevano mai tra rigettanti e non rigettanti ad ogni punto temporale. In Figura 11C sono riportati i livelli serici di CCL22 entro 6 mesi dal trapianto (504.76 pg/ml nei non rigettanti vs. 501.64 pg/ml nei rigettanti).

Nessuna differenza era osservata nei livelli serici pre-trapianto di CXCL10 rispetto alla patologia originaria (cardiomiopatia dilatativa o idiopatica o secondaria a ischemia, antracicline, patologia valvolare, shock cardiaco), alla presenza di diabete o ipertensione polmonare e al tipo di terapia immunosoppressiva peri- o post-trapianto (dati non mostrati).

Per valutare il rischio relativo (RR) dei pazienti con elevati livelli serici di CXCL10 di sviluppare episodi di rigetto precoce, sono state effettuate diverse analisi separate ogni mese dopo il trapianto. E' stata svolta un'analisi multivariata prendendo gli episodi di rigetto precoce come variabile dipendente. L'età e il sesso del ricevente, il numero di *mismatches* HLA-A, -B e -DR, la patologia primaria, il tipo di immunosoppressione, il tempo di ischemia dell'organo, CCL22, citomegalovirus (CMV), l'età e il sesso del donatore sono state considerate come covariabili. All'analisi multivariata il CXCL10 è risultato l'unico fattore di rischio indipendente per il rigetto acuto entro 5 mesi dal trapianto. L'analisi multivariata entro 2 mesi dal trapianto è mostrata, come rappresentativa, in Tabella 3 (CXCL10: RR=1.22, 95% CI=1.001-1.427, P=0.037). L'analisi multivariata entro 6 mesi dal trapianto ha rivelato l'importanza di altre due variabili, il CMV e l'età del ricevente, in aggiunta al CXCL10 (CXCL10: RR=1.08, 95% CI=1.001-1.224, P=0.039; CMV: RR=4.85, 95% CI=1.715-13.120, P=0.034; età del ricevente: RR=0.90, 95% CI=0.824-0.999, P=0.048; Tabella 3).

Tabella 3. Analisi multivariata indicante il rischio relativo di episodi di rigetto del trapianto in base a fattori di rischio selezionati

	Analisi multivariata entro 2 mesi dal trapianto				Analisi multivariata entro 6 mesi dal trapianto			
	P	Rischio relativo	95% CI		P	Rischio relativo	95% CI	
			Inferiore	Superiore			Inferiore	Superiore
CXCL10	0.037	1.22	1.001	1.427	0.039	1.08	1.001	1.224
CCL22	0.473	0.99	0.997	1.001	0.327	0.99	0.997	1.000
Età del ricevente	0.207	0.93	0.836	1.039	0.048	0.90	0.824	0.999
Diagnosi	0.198	4.05	0.479	34.31	0.100	4.29	0.757	24.390
Tempo di ischemia	0.874	1.00	0.978	1.025	0.146	0.98	0.963	1.005
Età del donatore	0.620	0.98	0.906	1.060	0.735	1.01	0.944	1.084
CMV nel ricevente	0.599	0.54	0.054	6.338	0.034	4.85	1.715	13.120
Terapia di induzione	0.482	3.19	0.125	81.09	0.247	3.74	0.401	34.810
Mismatch HLA A	0.117	0.30	0.066	1.355	0.916	0.93	0.253	3.425
Mismatch HLA B	0.595	0.57	0.073	4.469	0.714	1.36	0.265	6.950
Mismatch HLA DR	0.085	5.32	0.844	33.56	0.444	1.75	0.417	7.338
Mismatch del sesso	0.295	3.73	0.316	44.10	0.123	5.52	0.626	48.622

Le variabili significative sono in grassetto.

CI = intervallo di confidenza

HLA = Human leukocyte antigen

CMV = citomegalovirus

L'analisi ROC (*receiver operating characteristic curve*), effettuata per il rigetto acuto ad ogni mese dopo il trapianto, ha mostrato che i livelli serici pre-trapianto di CXCL10 mantenevano un ruolo predittivo entro 3 mesi, identificando un valore di *cut-off* di 160 pg/ml.

Come mostrato in Figura 12, l'area sotto le curve ROC (AUC) 1 mese e 2 mesi dopo il trapianto era quasi sovrapponibile (1 mese: AUC=0.70, 95% CI=0.56-0.82, SE=0.73, SP=0.63, P<0.001; 2 mesi: AUC=0.70, 95% CI=0.58-0.81, SE=0.75, SP=0.69, P<0.001).

La curva ROC a 3 mesi, sebbene ancora statisticamente significativa, mostrava un'AUC di 0.66 (95% CI=0.55-0.76, SE=0.69, SP=0.66, P<0.01). L'AUC calcolata per il rigetto acuto 4, 5 (dati non mostrati) o 6 mesi dopo il trapianto (AUC=0.58) non raggiungeva invece la significatività statistica (95% CI=0.47-0.67, SE=0.36, SP=0.75, Figura 12).

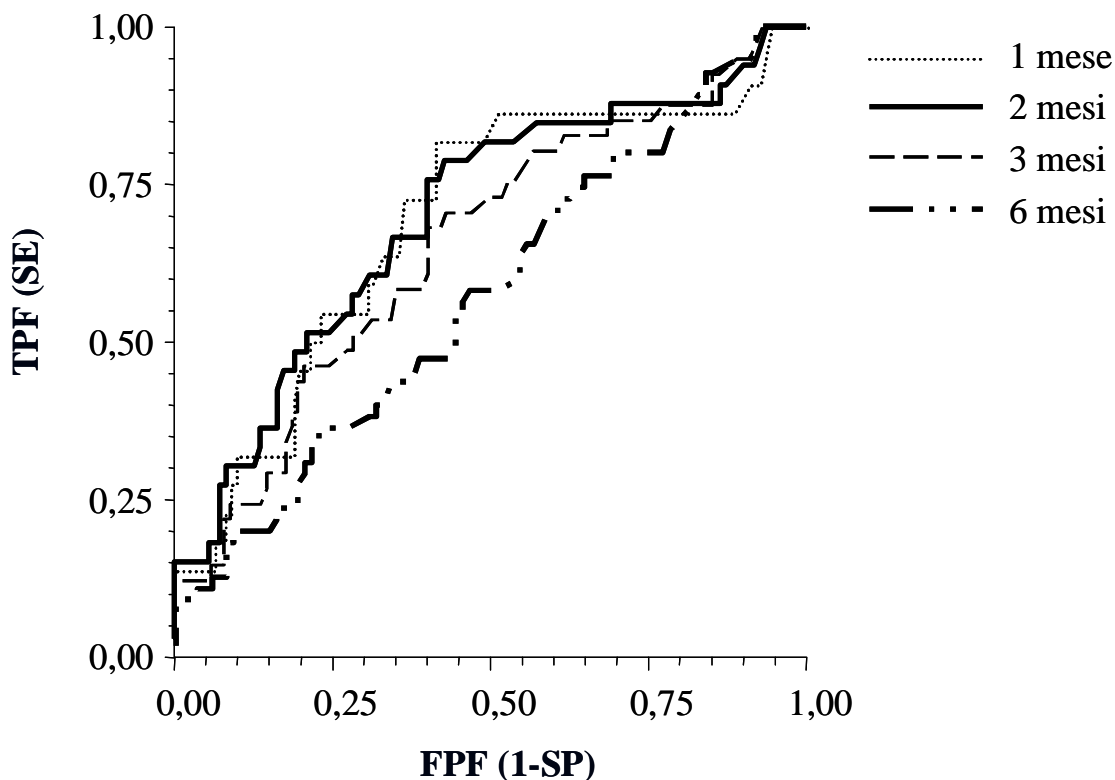


Figura 12. Curve ROC (*receiver operating characteristic*) calcolate per i livelli serici pre-trapianto di CXCL10 come potenziale predittore per il rigetto acuto a vari mesi dopo il trapianto di cuore. Il grafico mostra una tendenza alla riduzione dell'area sotto la curva (AUC) da 1 a 6 mesi dopo il trapianto. L'AUC era 0.70 (con un intervallo di confidenza [CI] al 95% tra 0.56 e 0.82, $P=0.001$) ad 1 mese; 0.70 (95% CI=0.58-0.81, $P=0.001$) a 2 mesi; 0.66 (95% CI=0.55-0.76, $P=0.01$) a 3 mesi; e 0.58 (95% CI=0.47-0.67) a 6 mesi dal trapianto.

TPF, *true-positive fraction*; FPF, *false-positive fraction*; SP, specificità; SE, sensibilità.

2. CELLULE CARDIACHE Hfcm

2.1. Caratterizzazione delle Hfcm

2.1.1. Morfologia e durata di vita delle Hfcm

Nelle cellule sono stati osservati percepibili cambiamenti morfologici nel tempo. Le cellule isolate, di forma rotondeggiante, iniziavano ad attaccarsi alla piastra di coltura e crescevano come monostrato entro 24-48 h dalla piastratura. Le prime cellule aderenti esibivano una forma rotondeggiante entro il passaggio (p) 2-3, come valutato da microscopio a contrasto di fase (Figura 13A, pannello sinistro, p1/2). Nei passaggi successivi le cellule acquisivano una morfologia fusiforme, simile ai fibroblasti (Figura 13A, pannello centrale, p5/6). Con il passare del tempo si osservava un fenotipo ancora più affusolato, analogo a quello “a bastoncino” delle cellule adulte (Figura 13A, pannello destro, p8/9).

La durata della vita delle cellule è stata determinata con continui passaggi. Le cellule mostravano un costante incremento del tempo di raddoppiamento (*doubling time*) fino ad arrivare all’arresto della crescita dopo 11-13 *population doublings* (PDs) (Figura 13B).

2.1.2. Espressione dei marker specifici di *lineage* cardiaco

Le Hfcm esprimevano trascritti specifici per GATA4, un potente transattivatore di diversi promotori cardiaci, inclusi la Troponina I cardiaca e il fattore di trascrizione Nkx2.5 (*Nkx2 related locus 5*), indispensabile come attivatore trascrizionale negli stadi precoci della formazione del cuore e coinvolto nella differenziazione dei cardiomiociti. Era inoltre espresso anche Islet1 (Isl1), fattore di trascrizione dell’omeodominio LIM, che identifica i progenitori cardiaci ed è necessario per la loro conversione al fenotipo maturo. Il livello di espressione di questi fattori di trascrizione era massimo

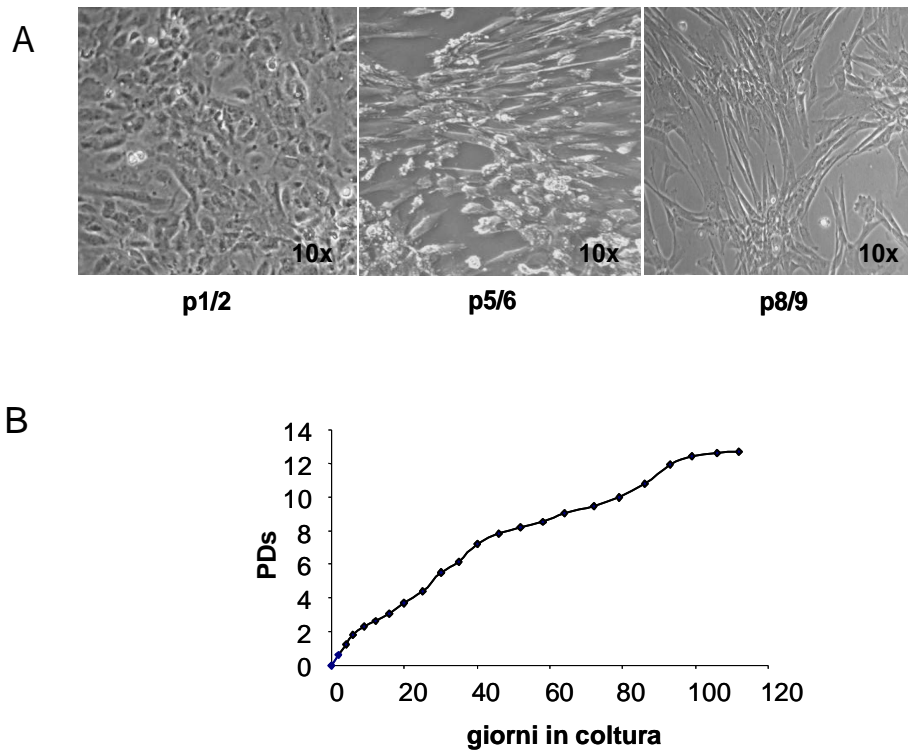


Figura 13. Caratteristiche morfologiche e *population doublings* (PDs) nelle Hfcm. (A) *Pannello sinistro*, le Hfcm esibivano una morfologia tondeggiante nei primi passaggi (p1/2). *Pannello centrale*, a partire da p5/6 le cellule acquisivano una morfologia fusiforme. *Pannello destro*, a passaggi più avanzati (p8/9), le cellule mostravano un fenotipo più “a bastoncino”, simile alle cellule adulte. (B) Crescita *in vitro* delle popolazioni di Hfcm. Le cellule sono state espanse in coltura per 11-13 PDs per circa 3-mesi.

ai primi passaggi e diminuiva con il progredire dei passaggi, in accordo con un aumento dello stato differenziativo (Figura 14A).

2.1.3. Evoluzione della capacità di membrana (Cm)

La crescita delle Hfcm da p0 a p9 è stata quantificata in modalità *voltage-clamp*, mediante la tecnica del *patch-clamp* nella configurazione *whole-cell*, misurando la capacità di membrana (Cm). Questo parametro, considerato una stima dell'area superficiale della cellula, essendo la capacità membrano-specifica costante a $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, è stato calcolato come precedentemente riportato [120]. Cm aumentava significativamente da p2 (circa 90 pF) a p3 (circa 150 pF) e rimaneva quasi costante fino a p9 (Figura 14B). Quindi, i cambiamenti della Cm rivelavano un significativo processo ipertrofico che caratterizzava lo sviluppo cellulare fino a p3.

2.1.4. Potenziale di riposo di membrana e potenziale d'azione

Il potenziale di riposo di membrana è stato valutato in modalità *current-clamp* nella soluzione NT. In p0 e p1 esso era -45 ± 6 mV; diventava -54 ± 6 mV in p2–p3 e -76 ± 8 mV in p4–p9 (dati non mostrati). I cambiamenti nel potenziale di riposo di membrana rivelavano un sviluppo significativo delle Hfcm fino a p3. Il potenziale d'azione (PA) poteva essere registrato in modalità *current-clamp* a partire dalle cellule a p3. In queste cellule la fase di ripolarizzazione (Figura 15A) era più lenta di quella registrata in cellule più vecchie (p4–p9). Inoltre, il PA registrato da una cellula a p5 (Figura 15B) mostrava una fase di ripolarizzazione più rapida, analoga a quella registrata nel ventricolo cardiaco adulto.

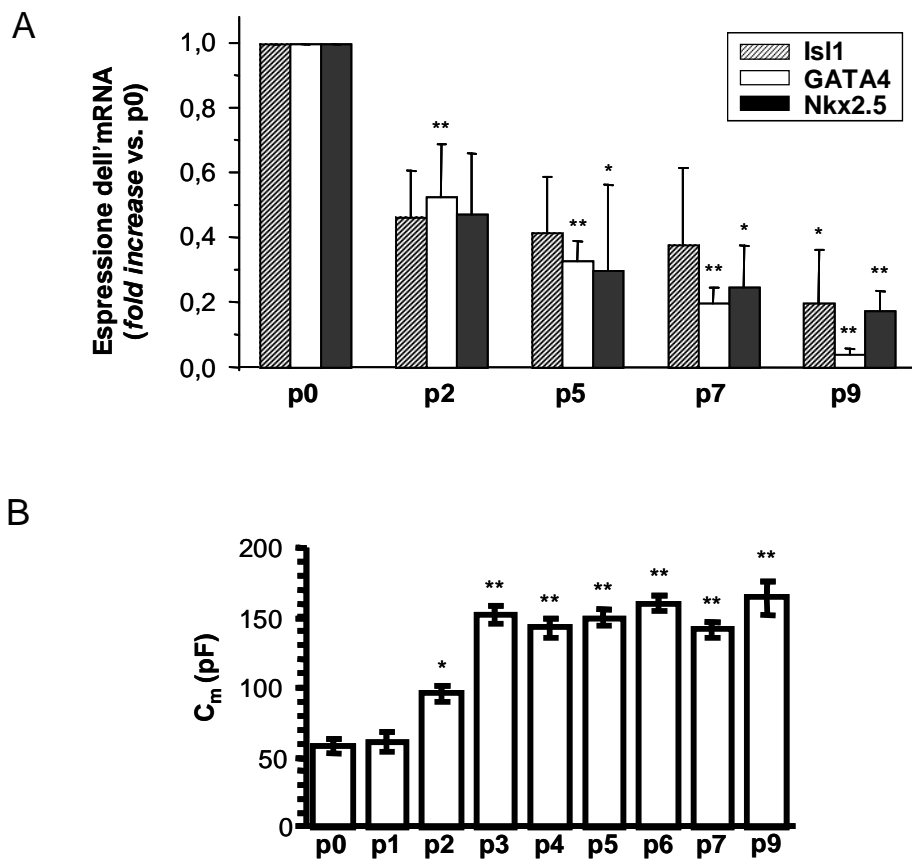


Figura 14. Espressione dei marker di lineage cardiaco, evoluzione della capacità di membrana (C_m) nelle Hfcm. (A) Gli specifici trascritti di GATA4, Nkx2.5 e IsI1 diminuivano gradualmente con il progredire dei passaggi (*P<0.05, **P<0.01 vs. p0). (B) I valori di C_m, indice di superficie cellulare, aumentavano progressivamente da p0 a p3 e rimanevano quasi costanti nei passaggi successivi (*P<0.05, **P<0.01 vs. p0).

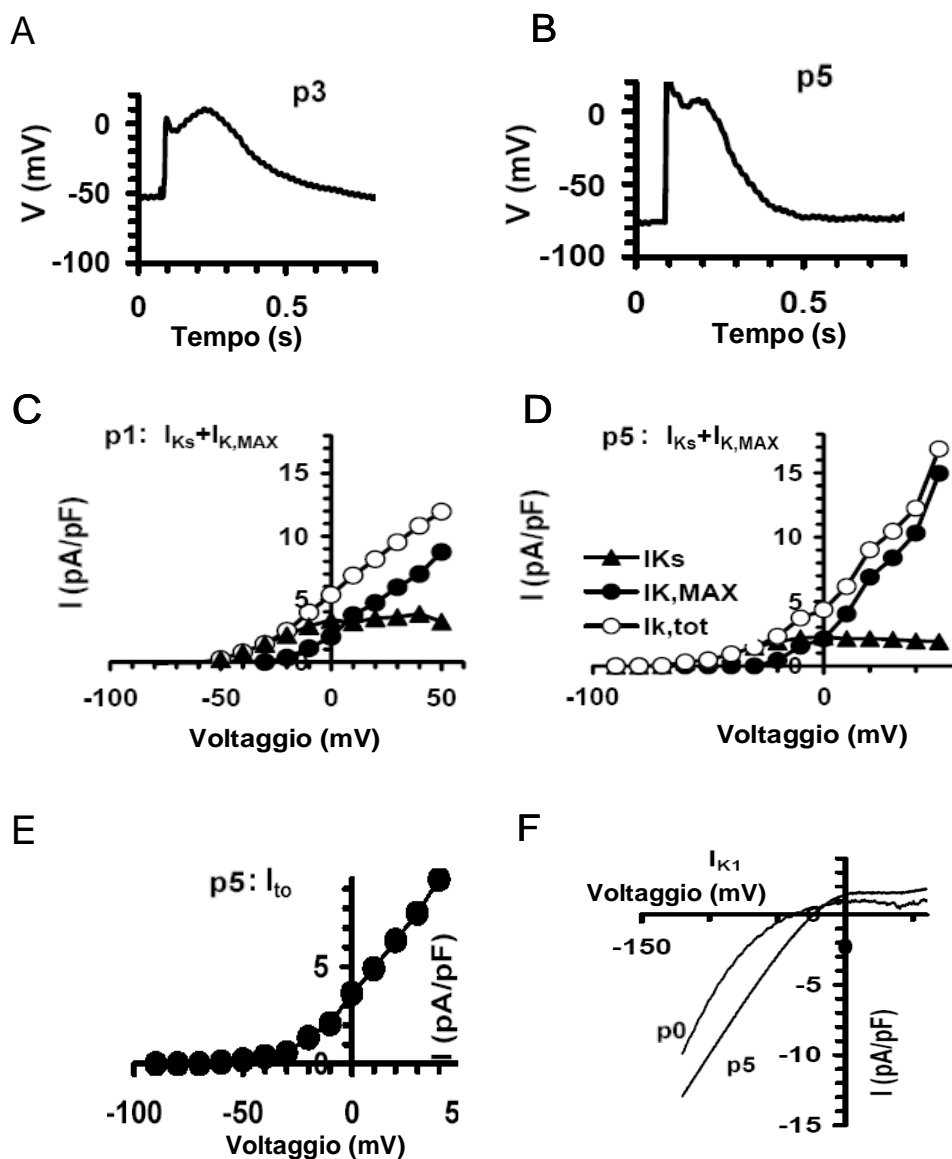


Figura 15. Potenziale d'azione e modificazioni nelle correnti al K^+ *delayed outward rectifier*, *transient outward* (I_{to}), *inward rectifier* ($IK1$). (A, B) Potenziale d'azione di tipo ventricolare registrato in modalità *current-clamp* in una cellula a p3 (A) e a p5 (B). Corrente transiente precoce dovuta a INa . (C, D) Tipiche curve I - V correlate a correnti ritardate del K^+ registrate a HP= -60 mV (IK_{tot} , cerchi bianchi) o -30 mV (IK_{MAX} , cerchi neri); IK_s (triangoli) ottenuta sottraendo IK_{MAX} da IK_{tot} ; curve I - V da cellule a p1 (C) e a p5 (D). (E) Tipica curva I_{to} - V da una cellula a p5. (F) $IK1$ indotta da una rampa di potenziale in una cellula a p0 e a p5.

2.1.5. Modificazioni delle correnti di potassio durante lo sviluppo

Dal momento che le correnti in uscita (*outward*) che passano attraverso i canali del potassio (K⁺) controllano il potenziale di riposo di membrana, l'automaticità, la forma del PA e la ripolarizzazione, abbiamo controllato nelle Hfcm l'espressione funzionale delle principali correnti del K⁺ descritte nei cardiomiociti adulti. Precedenti lavori riportano due distinte correnti *outward* del K⁺ attivate dalla depolarizzazione in cardiomiociti isolati da ventricoli di ratti adulti: la corrente *delayed outward rectifier* IK ed la corrente *transient outward* Ito [121]. Nelle Hfcm abbiamo trovato le prove funzionali di entrambe queste correnti di K⁺ tipiche del tessuto cardiaco. Tutte le Hfcm analizzate in soluzione NT mostravano correnti *outward* del K⁺ che cambiavano in alcune proprietà durante la differenziazione. La maggior parte di esse mostravano una corrente attivante relativamente lenta, che si attivava a partire da -40 mV e si disattivava leggermente a potenziali positivi.

In cellule p0-p1, la densità media di corrente era 12 ± 1.8 pA/pF a +50 mV. La curva corrente-voltaggio (I-V) mostrava un cambiamento nella pendenza a -20/10 mV, suggerendo la presenza di due differenti tipi di correnti *outward* (Figura 15C; IK,tot, cerchi bianchi). Per testare questa ipotesi l'HP è stato settato a -30 mV per bloccare una componente. In questa condizione, la corrente *outward* partiva da -30/-20 mV, la densità media di corrente era 9 ± 2.8 pA/pF a +50 mV e per la sua curva I-V appariva come una corrente IKr (o IK,MAX) (Figura 15C, cerchi neri). L'altra componente è stata poi ottenuta sottraendo IKr dai valori di IK,tot registrati a -60 mV (Figura 15C, triangoli); per la sua curva I-V appariva come una corrente IKs e la densità di corrente era 4 ± 1 pA/pF a +50 mV. IK,tot aumentava progressivamente in cellule da p1 a p3 e rimaneva quasi costante da p4 a p9, dove era 17 ± 5 pA/pF ($P < 0.05$). In conclusione, le Hfcm mostravano almeno due tipi di corrente di K⁺ corrispondenti approssimativamente a IKs e IKr (IK,MAX), come descritto precedentemente [112,122]. Dato che queste correnti erano bloccate da TEA 20 mM, esse

erano in realtà correnti ritardate del K⁺, responsabili della fase lenta di ripolarizzazione del PA verso il potenziale di riposo. Da notare che la loro densità cambiava durante la differenziazione e raggiungeva valori costanti nelle cellule a p4-p9: IK_{MAX} aumentava significativamente fino a 15±6 pA/pF (P<0.05) e IKs diminuiva fino a 2±1 pA/pF (P<0.05, Figure 15C,D; cellule a p1 e p5 sono riportate come rappresentative). La riduzione della IKs concorda con la più rapida ripolarizzazione osservata nel PA, mostrato in Figura 15B. La corrente I_{to} sembra essere alla base della iniziale fase di depolarizzazione rapida del PA [121] ed è stato riportato che la sua densità aumenta significativamente durante i cambiamenti dovuti allo sviluppo in cardiomiociti ventricolari di ratti neonati [123]. In accordo con studi recenti [120], I_{to}, insieme alla corrente *inward rectifier* IK1, è un buon *marker* del fenotipo cardiomiocitario, non essendo espressa in cellule non differenziate. Noi abbiamo osservato una significativa corrente I_{to} in tutte le Hfcm, con un'ampiezza del 20% nelle cellule a p0-p1 rispetto a quelle a p4-p9. I_{to} è stata registrata nella soluzione di TEA 20 mM come le correnti rapide *transient outward* con un tempo di picco di 10±2 ms a 50 mV. In Figura 15E è riportata una curva di attivazione di I_{to} rappresentativa, registrata da una cellula a p5. Questa corrente era bloccata dalla 4-aminopiridina (2mM). Infine, anche la corrente rettificante *inward* IK1 era registrata in tutte le Hfcm. Abbiamo osservato cambiamenti dipendenti dall'ampiezza e dal voltaggio da p0 a p3, mentre nessuna ulteriore significativa modificazione da p4 a p9. Da esperimenti effettuati imponendo un protocollo di *voltage-clamp* definito "rampa", la sua ampiezza a -120 mV era 9±2 in cellule p0-p1 e 13±2 (P<0.05) pA/pF in cellule p4-p9. Inoltre, la curva I-V era spostata positivamente di circa 12 mV (Figura 15F), suggerendo una maturazione della dipendenza dal voltaggio della corrente IK1 a partire da p4.

2.1.6. Gap Junctions

Nelle Figure 16A,C sono mostrate tipiche correnti trans-giunzioni (I_j) evocate da un protocollo di impulso bipolare applicato da HP=0 mV e compreso tra ± 150 mV con incrementi di 20 mV. La durata di un impulso e il tempo tra un impulso e l'altro erano 2 e 0.7 secondi, rispettivamente. In Figura 16A sono mostrate tracce simmetriche, a suggerire il legame tra due connessioni omomeriche omotipiche. Il *plot* G_j-V_j delle conduttanze totali normalizzate è riportato in Figura 16B, in cui le linee continue sovrapposte ai dati sperimentali rappresentano la funzione di Boltzmann ottenuta con il *fitting* (per i dettagli vedere la sezione Materiali e Metodi). La maggior parte delle cellule mostrava tracce di correnti simmetriche come quelle rappresentate nelle Figure 16A,B, che mostravano parametri tipici della Cx43 (per i dettagli vedere la legenda della Figura 16). Registrazioni rappresentative di una *gap junction* asimmetrica riferita a una coppia di cellule a p5 sono riportate in Figure 16C,D. Come è evidente dalle figure, è asimmetrica sia la *time-course* di I_j (Figura 16C) che il *plot* G_j-V_j (Figura 16D). Circa l'80% delle coppie di cellule mostravano questo comportamento asimmetrico, suggerendo la presenza di *gap junctions* eteromeriche eterotipiche.

2.1.7. Espressione delle proteine specifiche cardiache

L'immunocitochimica effettuata su cellule a p5 ha confermato la presenza di Cx43, una dei principali componenti necessari per le giunzioni elettromeccaniche tra cardiomiociti di tipo ventricolare (Figura 17A). La Troponina I cardiaca (cTnI), una subunità del complesso Ca²⁺-sensibile della troponina (Figura 17B), e la miosina I β (Figura 17C), una proteina motrice, entrambe coinvolte nella contrazione funzionale dei cardiomiociti, erano virtualmente espresse in tutte le cellule. Lo stesso pattern di espressione proteica è stato individuato tramite analisi western blot in lisati totali di Hfcm a p0 e p5. E' stata inoltre rilevata la tropomiosina, una proteina regolatrice della contrazione muscolare (Figura 17D). Tessuti cardiaci adulti e fetali sono stati usati per confronto.

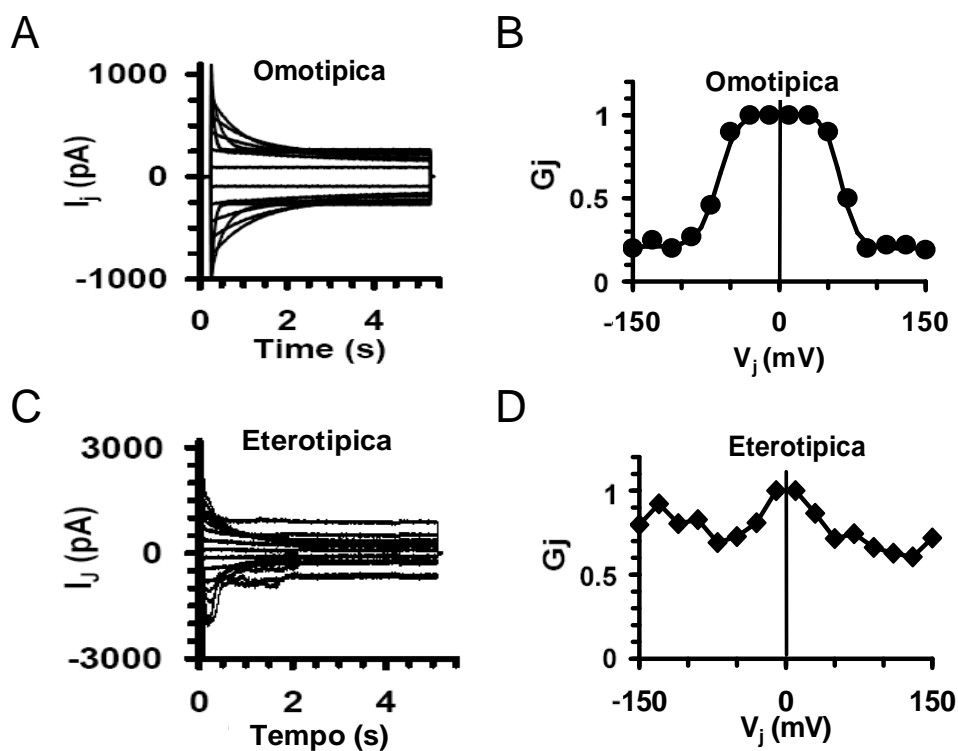


Figura 16. Correnti delle *gap junctions* nelle Hfcm. (A-D) *Gap junctions* omotipiche e eterotipiche in coppie di cellule Hfcm. Tipica corrente trans-giunzionale (I_j) evocata da un protocollo di impulso bipolare. Tracce di correnti simmetriche (A, registrate da una coppia di cellule a p5) e *plot* G_j - V_j simmetrico (B); parametri Boltzmann correlati a $+V_j$: $V_0=+63.2\pm 6.0$ mV, $A=0.1\pm 0.03$ mV $^{-1}$, $G_{min}=0.2\pm 0.01$; e a $-V_j$: $V_0=-62.4\pm 6.2$ mV, $A=0.1\pm 0.02$ mV $^{-1}$, $G_{min}=0.2\pm 0.04$. Registrazioni rappresentative di corrente asimmetrica da una coppia di cellule a p5 (C) e *plot* G_j - V_j correlato (D).

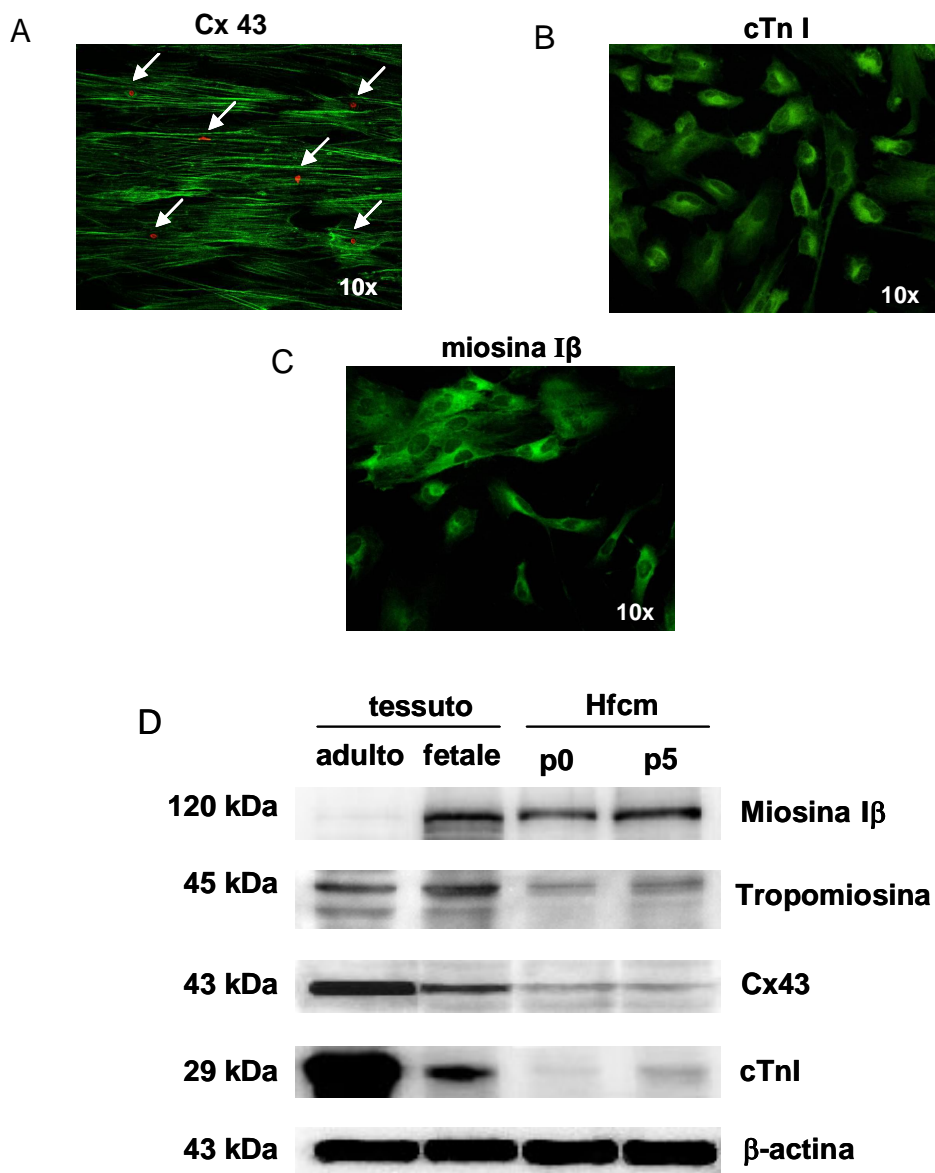


Figura 17. Espressione di Cx43 e di proteine strutturali cardiache. (A, B, C) Le Hfcm risultavano positive per Cx43 nei punti di contatto cellula-cellula (A, colorazioni puntiformi rosse, indicate da frecce). Virtualmente tutte le cellule erano positive per α -SMA (A, colorazione verde), e per specifiche proteine strutturali cardiache, come cTnI (B) e miosina I β (C). (D) Estratti di Hfcm (p0 and p5) e tessuti adulti e fetali, usati come controlli positivi, sono stati incubati con specifici anticorpi. Lo stesso pattern di espressione proteica veniva osservato in cellule e tessuti; era rivelata anche la tropomiosina. La β -actina è stata usata come controllo della quantità di proteine caricate.

2.2. Effetto delle citochine proinfiammatorie nelle Hfcm

Il trattamento per 24 h delle Hfcm con concentrazioni crescenti di IFN γ (10-10000 U/ml) aumentava significativamente la secrezione proteica di CXCL10 rispetto a livelli basali non misurabili ($P < 0.01$, $P < 0.05$ vs. controllo, a partire da 1000 U/ml Figura 18A). Questo effetto era dose-dipendente e non raggiungeva il *plateau* ($314,30 \pm 81,46$ pg/ μ g proteina, valore medio alla dose piú alta). Un incremento nella secrezione di CXCL10 (31.47 ± 11.11 pg/ μ g proteina, valore medio alla dose piú alta) rispetto ai livelli di controllo era osservato anche in presenza di TNF α (0.1–100 e 500 ng/ml, $P < 0.05$, $P < 0.01$ vs. controllo, a partire da 100 ng/ml, Figura 18B), sebbene di entità molto minore rispetto a IFN γ . E' stata poi valutata l'eventuale attivazione delle vie intracellulari specifiche delle due citochine proinfiammatorie: con la microscopia a immunofluorescenza sono state identificate fosforilazione e traslocazione nucleare di Stat1 (Figura 18C) e NF-kB (Figura 18D) conseguenti, rispettivamente, a 30 minuti di trattamento con IFN γ (1000 U/ml) e TNF α (10 ng/ml).

La simultanea aggiunta di una dose fissa di TNF α (10 ng/ml) all'IFN γ (10-10000 U/ml) amplificava la secrezione di CXCL10 indotta dall'IFN γ ad ogni dose testata (3609.47 ± 458.82 pg/ μ g proteina, valore medio a IFN γ 10000 U/ml) ($P < 0.05$, $P < 0.01$ vs. controllo; $P < 0.01$ vs. IFN γ da solo alla dose corrispondente, Figura 18E). Questo effetto non raggiungeva il *plateau*. In altri modelli cellulari la combinazione di TNF α (10 ng/ml) + IFN γ (1000 U/ml) era stata descritta produrre la risposta piú elevata [114,124,125]. Nelle Hfcm, la secrezione di CXCL10 indotta da queste due concentrazioni combinate, sebbene non massimale, era significativamente differente vs. la dose precedente ($P < 0.05$) mentre non era significativamente differente vs. le concentrazioni piú alte, e, quindi, è stata utilizzata negli esperimenti successivi. L'analisi *Real Time* PCR (Taqman) ha mostrato che la combinazione delle citochine risultava in un aumento nell'mRNA del CXCL10 di 4 volte vs. l'espressione indotta da IFN γ da solo (Figura 18F, $P < 0.01$).

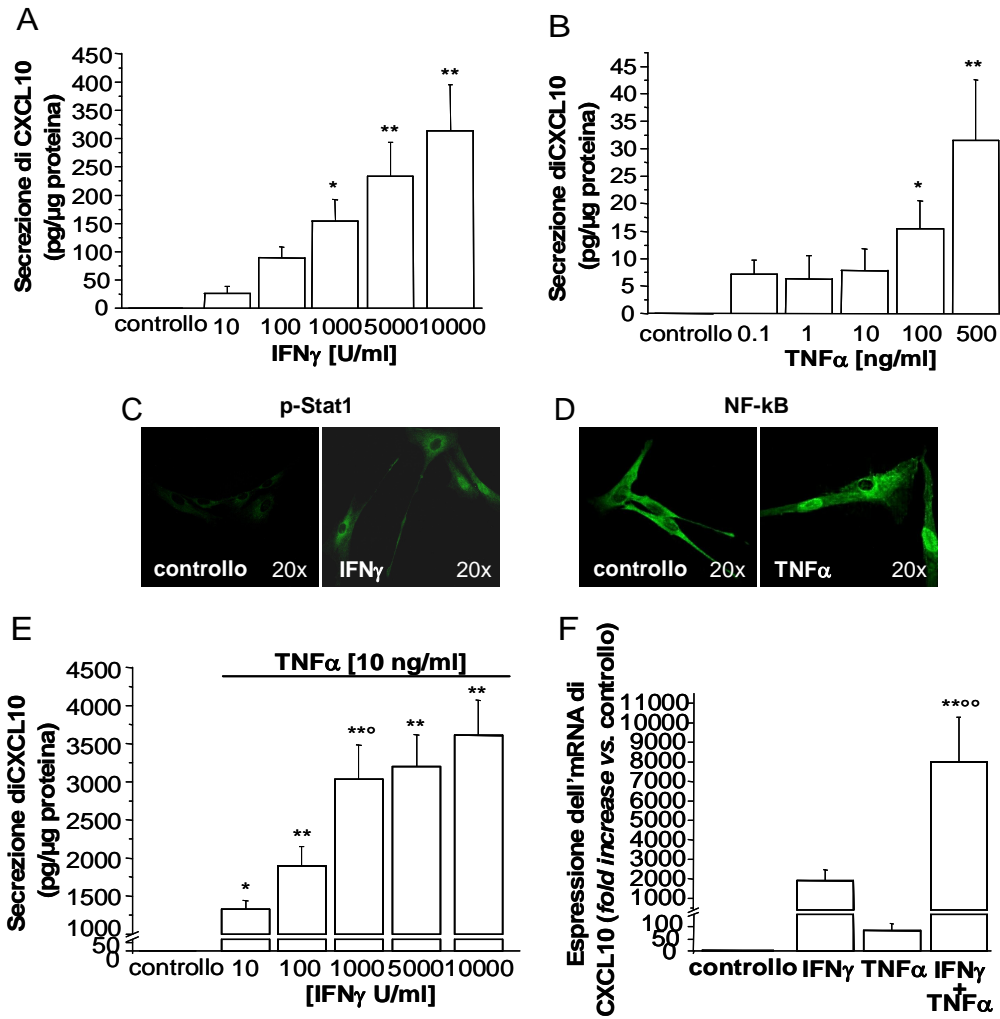


Figura 18. Effetto di IFN γ e TNF α nelle Hfcm. (A) IFN γ induceva in modo dose-dipendente la secrezione di CXCL10 (*P<0.05,**P<0.01 vs. controllo) senza arrivare a *plateau*. (B) TNF α aumentava la secrezione di CXCL10 (*P<0.05,**P<0.01 vs. controllo) in misura minore a IFN γ . (C) Accumulo nucleare di p-Stat1 senza (controllo) o con IFN γ (1000 U/ml) per 30 min. (D) Accumulo nucleare di NF-kB senza (controllo) o con TNF α (10 ng/ml) per 30 min. (E) TNF α (10 ng/ml) potenziava la secrezione IFN γ -indotta di CXCL10 (*P<0.05,**P<0.01 vs. controllo o vs. IFN γ alla dose corrispondente,°P<0.05 vs. dose precedente); tale sinergia era dose-dipendente e non raggiungeva *plateau*. (F) La combinazione IFN γ (1000 U/ml) + TNF α (10 ng/ml) up-regolava l'espressione dell'mRNA di CXCL10 vs. le citochine da sole (**P<0.01 vs. controllo,°P<0.01 vs. IFN γ).

2.3. Meccanismo di sinergia tra IFN γ e TNF α nelle Hfcm

Dal momento che avevamo precedentemente dimostrato che TNF α induce un'up-regolazione dell'IFN γ R nei tireociti [114], per vedere se questo meccanismo era valido anche nei cardiomiociti, abbiamo effettuato la citofluorimetria e l'analisi dell'mRNA di IFN γ R e TNF α R (tipo I o II) nelle Hfcm stimulate con TNF α (10 ng/ml) o IFN γ (1000 U/ml). Abbiamo verificato che TNF α up-regolava l'espressione proteica di IFN γ R, mentre il trattamento con IFN γ non aveva effetti significativi. Nessun effetto significativo era inoltre osservato sull'espressione di TNF α RI o II (dati non mostrati). Questi risultati erano confermati a livello genico ($P < 0.01$ vs. controllo, *inset* di Figura 19A). L'effetto indotto da TNF α sull'espressione proteica di IFN γ R era anche più evidente quando veniva usata la tecnica FASER, un metodo capace di aumentare il segnale di fluorescenza (Figura 19B, esperimento rappresentativo).

2.4. Risposta delle Hfcm ai farmaci immunosoppressori

Per valutare il possibile ruolo degli immunosoppressori sulla secrezione di CXCL10 indotta dalle citochine proinfiammatorie nei cardiomiociti umani, le Hfcm sono state incubate con IFN γ (1000 U/ml) + TNF α (10 ng/ml), con o senza BXL-01-0029 (10^{-8} M), RGZ (5 μ M), MPA (26 μ g/ml), TAC (20 ng/ml), SIR (15 ng/ml), CsA (250 ng/ml) o MeP (250 ng/ml). Le concentrazioni dei farmaci sono state selezionate in base alla loro dose terapeutica, e alle loro proprietà farmacocinetiche (C_{max} e area sotto la curva tempo-concentrazione, AUC). Come mostrato in Figura 20A il trattamento delle Hfcm per 24 h con BXL-01-0029, RGZ, MPA e SIR diminuiva significativamente la secrezione di CXCL10 indotta dalle citochine ($P < 0.05$ o $P < 0.01$ vs. la secrezione IFN γ +TNF α -indotta). In particolare, BXL-01-0029, RGZ e MPA riducevano di più del 50% la secrezione di CXCL10 indotta da IFN γ +TNF α , esercitando un effetto inibitorio massimo comparabile (% massima di inibizione, BXL-01-0029: $57.74 \pm 10.17\%$, RGZ: $54.08 \pm 10.52\%$, MPA: $52.34 \pm 8.62\%$).

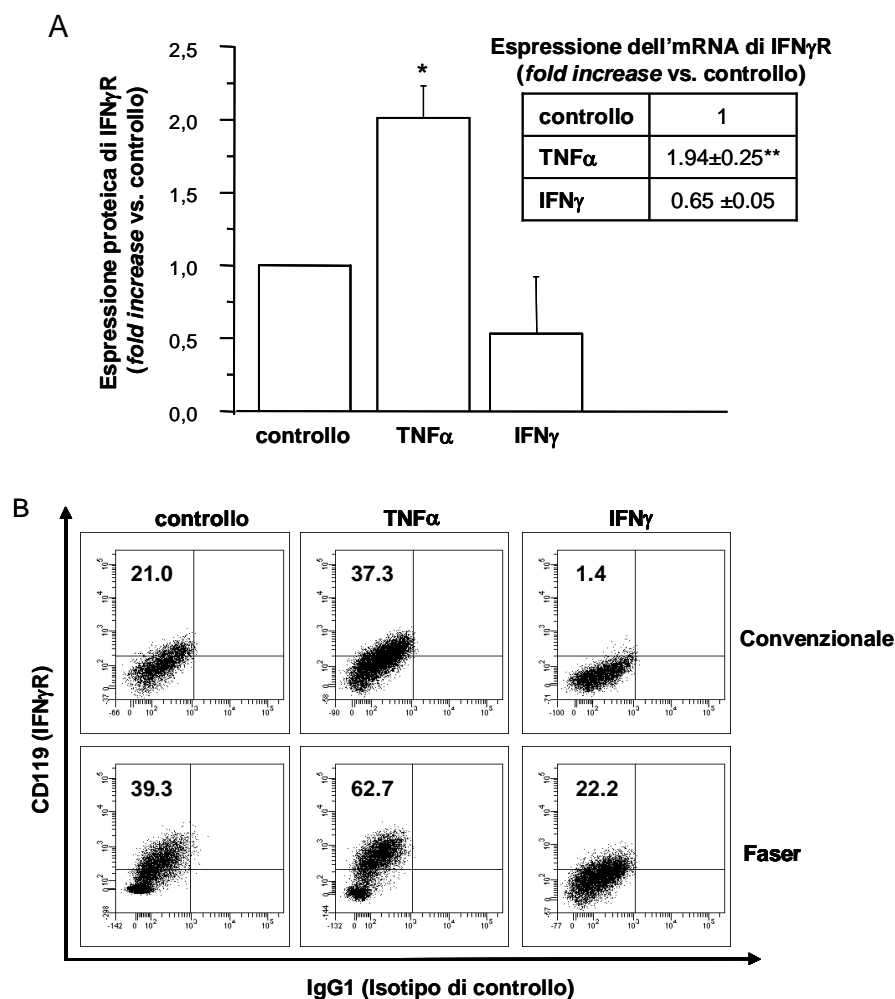


Fig. 19. Effetto di TNF α sull'espressione di IFN γ R a livello proteico e genico. (A) La citofluorimetria rivelava che TNF α (10 ng/ml) up-regolava l'espressione proteica di IFN γ R (*P<0.05 vs. controllo, preso come 1); IFN γ (1000 U/ml) non mostrava effetti significativi sul proprio recettore. La real time RT-PCR mostrava un significativo aumento TNF α -indotto dell'espressione genica di IFN γ R, mentre IFN γ non aveva effetti significativi (**P<0.01 vs. controllo, *inset*). (B) Esperimento rappresentativo dell'espressione proteica di IFN γ R (CD119) nelle Hfcm dopo 24 h di coltura nelle condizioni indicate. I *dot plot* rappresentano la marcatura ottenuta incubando le Hfcm con l'mAb per CD119 e con l'mAb isotipo di controllo, con (pannelli inferiori) o senza (pannelli superiori) l'uso della tecnica FASER. In ogni *plot* è indicata la percentuale di cellule positive per CD119 (IFN γ R).

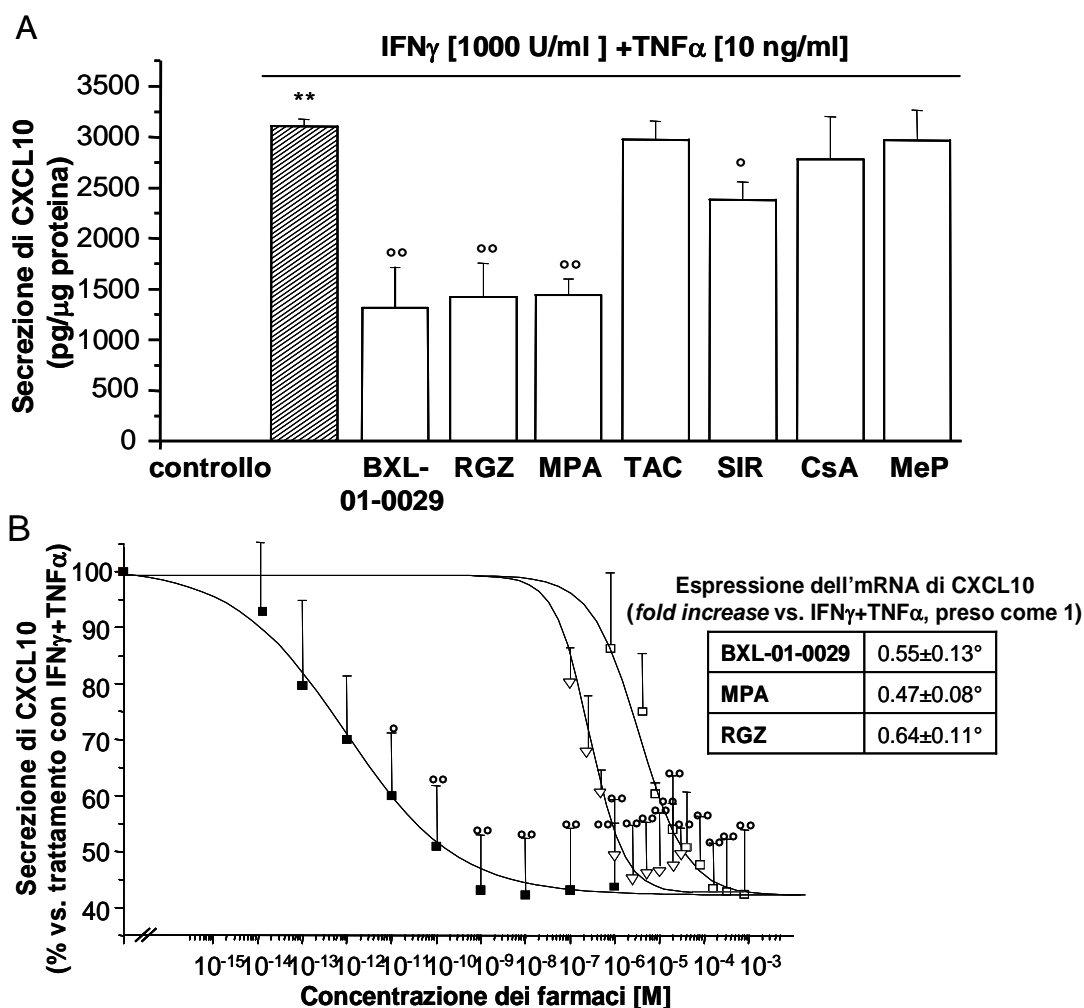


Figura 20. Risposta delle Hfcm agli immunosoppressori in presenza di citochine proinfiammatorie. (A) BXL-01-0029 (10^{-8} M), RGZ (5 μ M) e MPA (26 μ g/ml) inibivano di più del 50% la secrezione di CXCL10 da parte delle Hfcm (** $P < 0.01$ vs. controllo, ° $P < 0.05$, °° $P < 0.01$ vs. IFN γ +TNF α). (B) Dopo incubazione con IFN γ (1000 U/ml) + TNF α (10 ng/ml) e con dosi crescenti di BXL-01-0029 (quadrati neri), RGZ (triangoli) e MPA (quadrati bianchi), BXL-01-0029 risultava il farmaco più potente (BXL-01-0029: $IC_{50} = 9.01 \times 10^{-13} \pm 2.68 \times 10^{-13}$ M; MPA: $IC_{50} = 4.21 \pm 0.55$ μ M, RGZ: $IC_{50} = 178 \pm 27.3$ nM; BXL-01-0029: $P < 0.01$ ogni farmaco vs. gli altri; ° $P < 0.05$, °° $P < 0.01$ vs. IFN γ +TNF α). BXL-01-0029, RGZ e MPA riducevano significativamente l'espressione dell'mRNA di CXCL10 indotta da IFN γ +TNF α (° $P < 0.05$ vs. IFN γ +TNF α , *inset*).

Per valutare la potenza farmacologica di BXL-01-0029, MPA e RGZ, le Hfcm sono state stimulate con IFN γ (1000 U/ml) + TNF α (10 ng/ml) e dosi crescenti dei tre farmaci. Come riportato in Figura 20B, BXL-01-0029, RGZ e MPA diminuivano in modo dose-dipendente la secrezione di CXCL10 indotta dalle citochine proinfiammatorie (P<0.05, P<0.01 vs. la secrezione IFN γ +TNF α -indotta), ma con potenze differenti; in particolare, BXL-01-0029 risultava il farmaco più potente, come mostrato dal *fitting* delle curve dose-risposta (BXL-01-0029: IC50 = $9.01 \times 10^{-13} \pm 2.68 \times 10^{-13}$ M RGZ: IC50 = 178 ± 27.3 nM; MPA: IC50 = 4.21 ± 0.547 μ M; BXL-01-0029: P<0.01 ogni farmaco vs. gli altri) ottenuto usando il programma ALLFIT.

Inoltre, sia BXL-01-0029 (10^{-8} M), che RGZ (5 μ M) e MPA (26 μ g/ml) diminuivano significativamente l'espressione dell'mRNA di CXCL10 indotta da IFN γ (1000 U/ml) + TNF α (10 ng/ml) (P<0.05 vs. IFN γ +TNF α , *inset* di Figura 20B).

2.5. Meccanismi d'azione intracellulare di BXL-01-0029 e MPA nelle Hfcm

Abbiamo poi approfondito lo studio sui meccanismi d'azione di BXL-01-0029 nelle Hfcm, usando per confronto MPA. Per verificare se BXL-01-0029 e MPA fossero capaci di colpire il meccanismo alla base della sinergia tra IFN γ e TNF α osservata nelle Hfcm, abbiamo analizzato l'espressione di IFN γ R indotta da TNF α (10 ng/ml) in presenza di BXL-01-0029 (10^{-8} M) o MPA (26 μ g/ml). L'analisi citofluorimetrica (Fig. 21A) ha mostrato che 24 h di trattamento delle Hfcm con BXL-01-0029 riduceva di più del 50% l'espressione proteica di membrana di IFN γ R indotta da TNF α (TNF α : 2.07 ± 0.14 *fold increase* vs. controllo, P<0.01; BXL-01-0029: 0.92 ± 0.05 *fold increase* vs. controllo, P<0.05 vs. l'espressione TNF α -indotta), mentre MPA non aveva effetti significativi. Questo risultato era confermato a livello genico dall'analisi real time RT-PCR (P<0.05 vs. l'espressione TNF α -indotta, P<0.01 vs. controllo, Figura 21B).

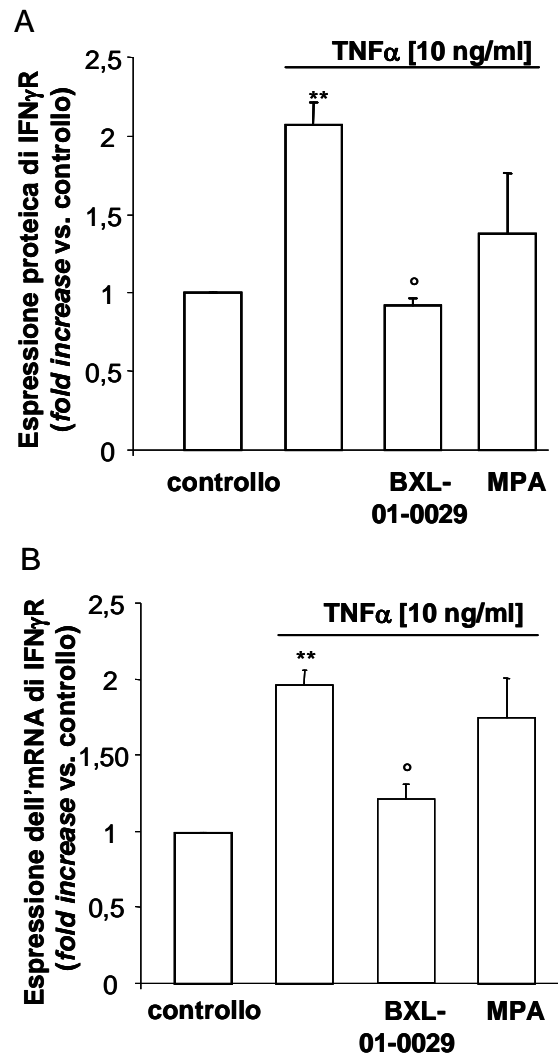


Figura 21. Effetto di BXL-01-0029 sull'espressione di IFN γ R indotta da TNF α a livello genico e proteico nelle Hfcm. (A) La citofluorimetria rivelava che nelle Hfcm BXL-01-0029 era capace di ridurre significativamente l'espressione proteica di membrana di IFN γ R up-regolata da TNF α (10 ng/ml) (°P<0.05 vs. l'espressione TNF α -indotta, **P<0.01 vs. controllo), mentre MPA non esercitava nessun effetto significativo. (B) L'analisi RT-PCR quantitativa mostrava che BXL-01-0029 (10⁻⁸ M), al contrario di MPA (26 μ g/ml), inibiva l'espressione dell'mRNA di IFN γ R indotta da TNF α (10 ng/ml) (°P<0.05 vs. l'espressione TNF α -indotta, **P<0.01 vs. controllo).

L'analisi western blot rivelava che nelle Hfcm BXL-01-0029 (10^{-8} M) e MPA (26 μ g/ml) erano capaci di bersagliare le vie intracellulari delle citochine proinfiammatorie, bloccando la fosforilazione di Stat1 indotta da IFN γ (1000 U/ml, Figura 22A), e la fosforilazione di NF-kB indotta da TNF α (10 ng/ml, Figura 22B).

La capacità di entrambi i farmaci di bloccare l'attivazione di Stat1 e NF-kB è stata inoltre confermata con un saggio di traslocazione nucleare (Figura 23). Come già detto precedentemente, la stimolazione con IFN γ (1000 U/ml, Figura 23A) o TNF α (10 ng/ml, Figura 23B) causava un compatto incremento della traslocazione di pStat1 o NF-kB dal compartimento citoplasmatico a quello nucleare (*staining* nucleare di pStat1: $79.42 \pm 5.85\%$ in IFN γ vs. $0.73 \pm 0.27\%$ nel controllo; *staining* nucleare di NF-kB: $83.66 \pm 2.00\%$ in TNF α vs. $1.10 \pm 0.28\%$ nel controllo, Figura 23C). La co-incubazione con BXL-01-0029 (10^{-8} M) o MPA (26 μ g/ml) riduceva significativamente la traslocazione citochine-indotta di pStat1 (Figura 23A) e NF-kB (Figura 23B) (*staining* nucleare di pStat1: BXL-01-0029= $23.72 \pm 3.29\%$, MPA= $16.43 \pm 3.87\%$, $P < 0.01$ vs. trattamento con IFN γ ; *staining* nucleare di NF-kB: BXL-01-0029= $1.70 \pm 0.30\%$, MPA= $34.77 \pm 5.29\%$, $P < 0.01$ vs. trattamento con TNF α).

Da notare che BXL-01-0029 sembrava non solo diminuire l'attivazione di NF-kB - come faceva MPA - ma addirittura prevenire completamente la sua traslocazione nel nucleo.

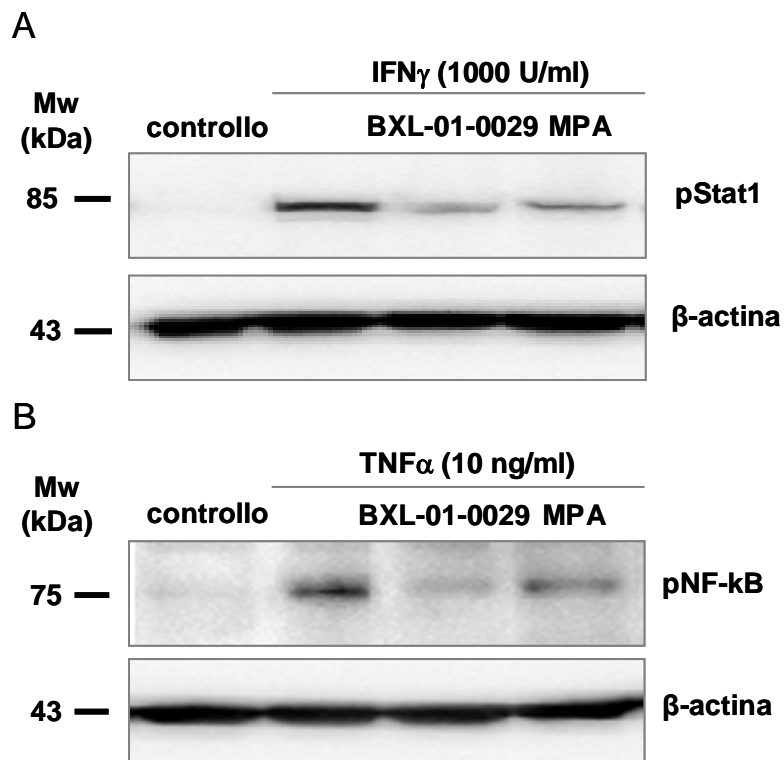


Figura 22. Effetto di BXL-01-0029 e MPA sulla fosforilazione di Stat1 e NF-kB nelle Hfcm. Estratti di Hfcm stimulate con IFN γ (1000 U/ml, A) o TNF α (10 ng/ml, B) per 15 min, con o senza BXL-01-0029 (10^{-8} M) o MPA (26 μ g/ml), sono stati incubati con specifici anticorpi per valutare l'attivazione di Stat1 (A) e NF-kB (B). La fosforilazione di Stat1 e NF-kB veniva indotta, rispettivamente, da IFN γ e TNF α . BXL-01-0029 e MPA inibivano le vie intracellulari di entrambe le citochine, bloccando la fosforilazione di Stat1 e NF-kB. La β -actina è stata usata come controllo della quantità di proteine caricate.

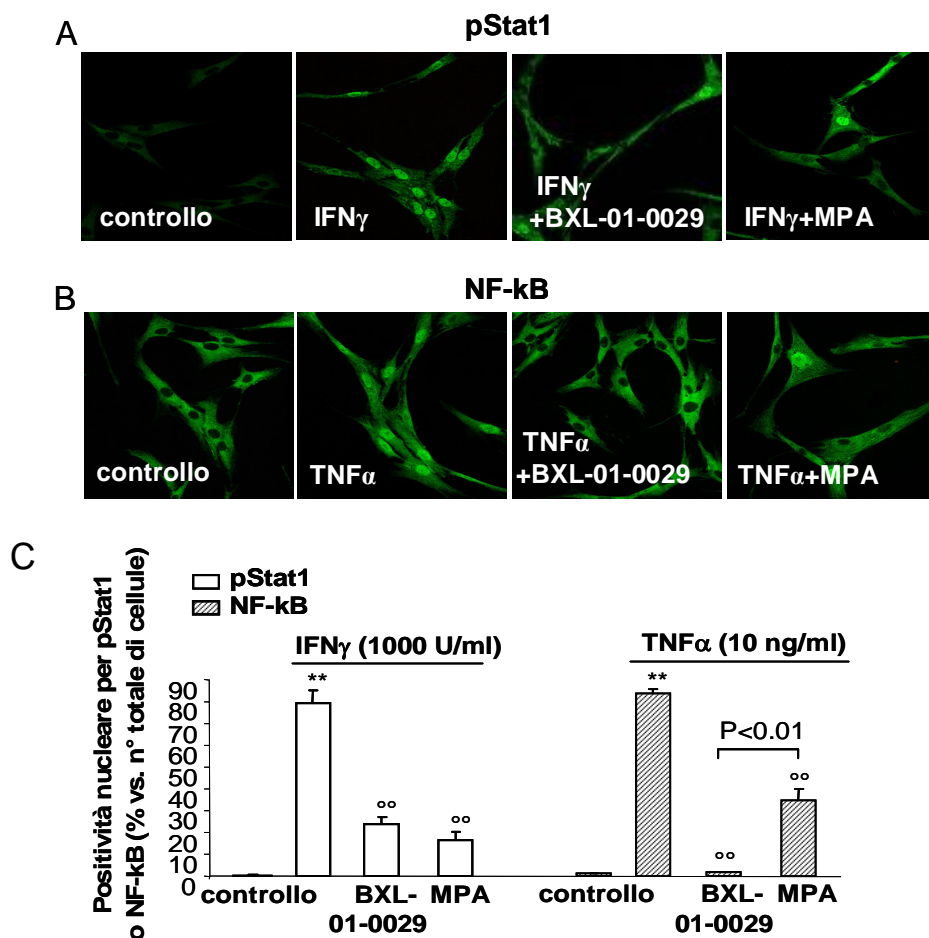


Figura 23. Effetto di BXL-01-0029 e MPA sull'accumulo nucleare di pStat1 e NF-kB nelle **Hfcm**. (A) BXL-01-0029 (10^{-8} M) e MPA (26 μ g/ml) inibivano la traslocazione nucleare IFN γ -indotta di pStat1. (B) BXL-01-0029 (10^{-8} M) e MPA (26 μ g/ml) inibivano la traslocazione nucleare TNF α -indotta di NF-kB. Ingrandimento: 20x. (C) La percentuale di nuclei positivi per pStat1 o NF-kB, quasi nulla nel controllo (pStat1: $0.73 \pm 0.27\%$; NF-kB: $1.10 \pm 0.28\%$), dopo stimolazione con IFN γ o TNF α era, rispettivamente, $79.42 \pm 5.85\%$ e $83.66 \pm 2.00\%$ (**P<0.01 vs. controllo). Dopo trattamento con BXL-01-0029 lo *staining* nucleare era $23.72 \pm 3.29\%$ per pStat1 e $1.70 \pm 0.30\%$ per NF-kB; dopo trattamento con MPA era $16.43 \pm 3.87\%$ per pStat1 e $34.77 \pm 5.29\%$ per NF-kB ($^{\circ}$ P<0.01 vs. IFN γ o TNF α). Riguardo a NF-kB, BXL-01-0029 causava una riduzione della positivit  nucleare delle cellule significativamente pi  elevata di MPA (P<0.01).

2.6. Valutazione della tossicità cellulare di BXL-01-0029 e MPA nelle Hfcm

La vitalità cellulare delle Hfcm trattate per 1-7 giorni con BXL-01-0029 (10^{-8} M) e MPA (26 $\mu\text{g/ml}$) era significativamente differente a partire dal terzo giorno di coltura ($P < 0.01$), dal momento che BXL-01-0029 non alterava significativamente la percentuale di cellule vitali rispetto al controllo - preso come 100% - mentre MPA la riduceva significativamente ($P < 0.05$, $P < 0.01$ vs. controllo, Figura 24).

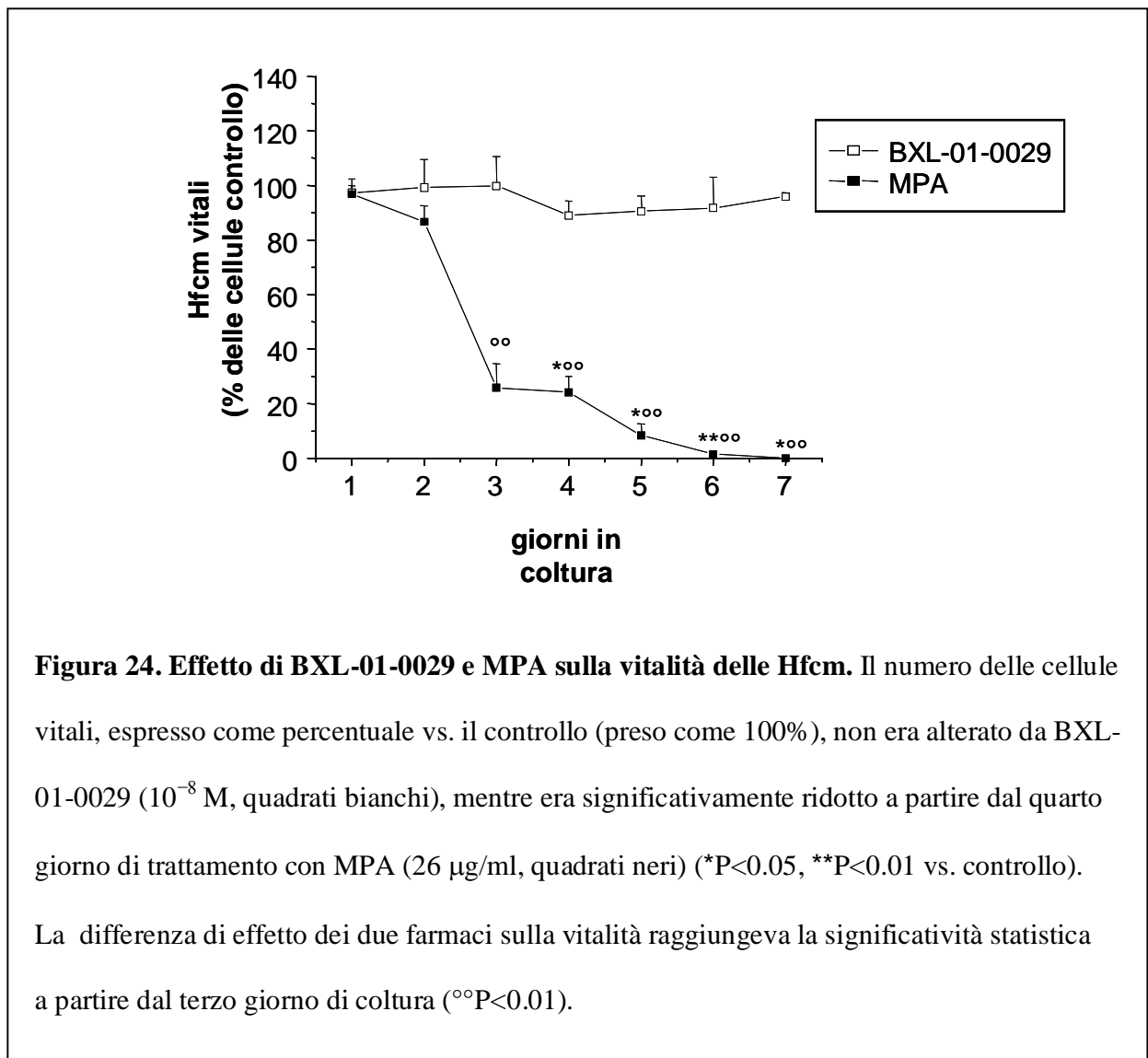


Figura 24. Effetto di BXL-01-0029 e MPA sulla vitalità delle Hfcm. Il numero delle cellule vitali, espresso come percentuale vs. il controllo (preso come 100%), non era alterato da BXL-01-0029 (10^{-8} M, quadrati bianchi), mentre era significativamente ridotto a partire dal quarto giorno di trattamento con MPA (26 $\mu\text{g/ml}$, quadrati neri) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. controllo). La differenza di effetto dei due farmaci sulla vitalità raggiungeva la significatività statistica a partire dal terzo giorno di coltura (°° $P < 0.01$).

3. CELLULE EPITELIALI DEL TUBULO PROSSIMALE RENALE (RPTEC)

3.1. Vie intracellulari coinvolte nella secrezione di CXCL10 nelle RPTEC

Per valutare le vie intracellulari coinvolte nella secrezione proteica di CXCL10, le RPTEC sono state stimolate con IFN γ (1000 U/l) + TNF α (10 ng/ml) in presenza di inibitori selettivi di p38 MAPK (SB203580), PI3K (LY294002), JNK (SP600125), ERK (U0126), Stat1 (fludarabina) e NF-kB (BAY 11-7082). La secrezione proteica di CXCL10, virtualmente assente nel controllo (non mostrato), era significativamente aumentata dalle citochine proinfiammatorie; inoltre quasi tutti gli inibitori diminuivano la secrezione di CXCL10 indotta da IFN γ +TNF α (Figura 25). In particolare, l'inibizione di NF-kB riduceva di più dell'80% la secrezione citochino-indotta di CXCL10 (P<0.01 vs. trattamento con IFN γ +TNF α ; P<0.05 vs. SB203580, U0126, fludarabina). Anche l'inibizione di PI3K e JNK inibiva significativamente la secrezione di CXCL10 (60.5 \pm 6.26% e 51.28 \pm 9.46%, rispettivamente; P<0.01 vs. trattamento con IFN γ +TNF α ; per LY294002: P<0.05 vs. fludarabina). Il blocco di p38 MAPK e Stat1 diminuiva la secrezione di CXCL10 in misura minore (36.36 \pm 8.97% e 30.86 \pm 7.71%, rispettivamente, P<0.05 vs. trattamento con IFN γ +TNF α), mentre l'inibizione di ERK non esercitava nessun effetto significativo.

3.2. Effetto dei farmaci immunosoppressori sulla secrezione di CXCL10 da parte delle RPTEC

Per valutare l'effetto degli immunosoppressori sulla secrezione citochino-indotta di CXCL10, le RPTEC sono state incubate con IFN γ (1000 U/ml) + TNF α (10 ng/ml), con o senza BXL-01-0029 (10⁻⁸ M), elocalcitolo (10⁻⁸ M), TAC (20 ng/ml), MPA (26 μ g/ml), SIR (15 ng/ml), Hy (100 ng/ml), CsA (250 ng/ml) o MeP (250 ng/ml).

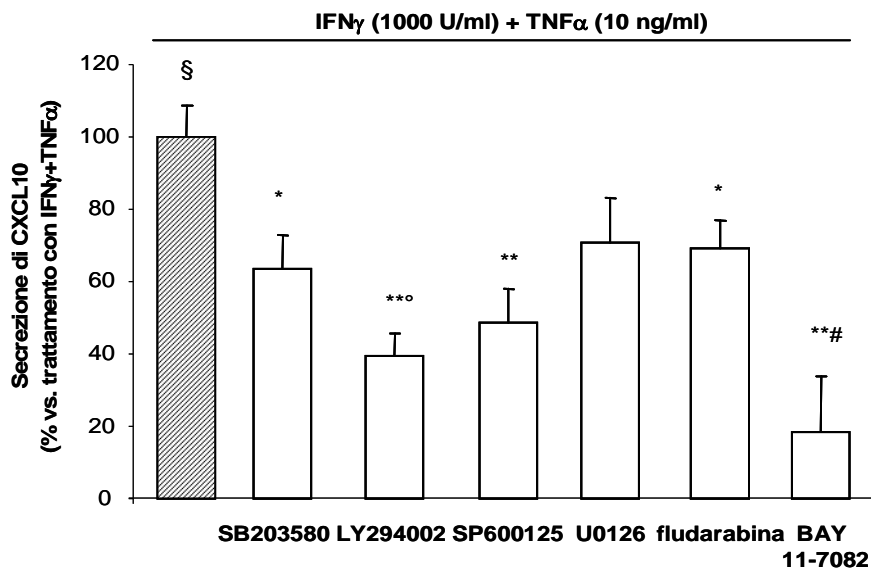


Figure 25. Effetto dell'inibizione di differenti vie intracellulari sulla secrezione IFN γ +TNF α -indotta nelle RPTEC. La secrezione di CXCL10, assente nel controllo (non mostrato), aumentava significativamente dopo trattamento delle cellule con IFN γ (1000 U/ml) + TNF α (10 ng/ml) (preso come 100%, §P < 0.01 vs. controllo). L'inibitore di NF-kB (BAY 11-7082) quasi aboliva la secrezione di CXCL10 citochino-indotta (inibizione: 81.69±15.72%). La secrezione di CXCL10 diminuiva significativamente dopo il blocco di p38 MAPK (SB203580, inibizione: 36.36±8.97%), PI3K (LY294002, inibizione: 60.50±6.26%), JNK (SP600125, inibizione: 51.28±9.46%) e Stat1 (fludarabina, inibizione: 30.86±7.71%). Il blocco di ERK (U0126) non aveva effetti significativi. *P < 0.05, **P < 0.01 vs. trattamento con IFN γ +TNF α ; #P < 0.05 vs. SB203580, U0126 o fludarabina; °P < 0.05 vs. fludarabina.

BXL-01-0029, elocalcitolo, TAC e MPA inibivano significativamente la secrezione proteica di CXCL10 indotta dalle due citochine proinfiammatorie (*range* di inibizione: 33-43%; $P < 0.05$, $P < 0.01$ vs. trattamento con $\text{IFN}\gamma + \text{TNF}\alpha$), mentre SIR, Hy, MeP e CsA non avevano alcun effetto significativo (Figura 26A). L'effetto inibitorio di BXL-01-0029 ($42.58 \pm 1.35\%$) era significativamente maggiore di quello esercitato da TAC ($33.34 \pm 2.77\%$, $P < 0.05$).

L'analisi real time RT-PCR ha inoltre rivelato che BXL-01-0029, analogamente a MPA, riduceva significativamente l'espressione genica di CXCL10 indotta dalle citochine proinfiammatorie ($P < 0.01$, $P < 0.05$ vs. trattamento con $\text{IFN}\gamma + \text{TNF}\alpha$, preso come 1, inset di Figura 26A), mentre TAC e elocalcitolo non la alteravano.

Per comparare la potenza farmacologica dei farmaci efficaci, le RPTEC sono state incubate con $\text{IFN}\gamma + \text{TNF}\alpha$ e concentrazioni crescenti di BXL-01-0029, elocalcitolo, TAC e MPA. Sebbene tutti e quattro i farmaci diminuissero in modo dose-dipendente la secrezione di CXCL10 ($P < 0.05$, $P < 0.01$ vs. trattamento con $\text{IFN}\gamma + \text{TNF}\alpha$, Figura 26B), gli agonisti del VDR risultavano più potenti di TAC e MPA. In particolare, la potenza farmacologica era la seguente: $\text{MPA} < \text{TAC} < \text{elocalcitolo} < \text{BXL-01-0029}$. BXL-01-0029 mostrava la potenza maggiore (BXL-01-0029: $-\log\text{IC}_{50} = 13.79 \pm 0.46$; elocalcitolo: $-\log\text{IC}_{50} = 11.62 \pm 0.28$; TAC: $-\log\text{IC}_{50} = 8.66 \pm 0.24$; MPA: $-\log\text{IC}_{50} = 6.01 \pm 0.29$; $P < 0.01$ ogni farmaco vs. gli altri), come rivelato dal *fitting* simultaneo delle curve dose-risposta, ottenuto usando il programma ALLFIT. Riguardo a MPA, dal *fitting* delle curve abbiamo omissso la sua concentrazione più alta (260 $\mu\text{g}/\text{ml}$), dal momento che essa era risultata citotossica e non avevamo ottenuto risultati affidabili.

Data la loro significativa differenza nell'inibizione della secrezione di CXCL10 (Fig. 26A), per verificare un potenziale effetto additivo, differenti concentrazioni di BXL-01-0029 e TAC sono state simultaneamente aggiunte alle RPTEC stimulate con $\text{IFN}\gamma$ (1000 U/ml) + $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/ml).

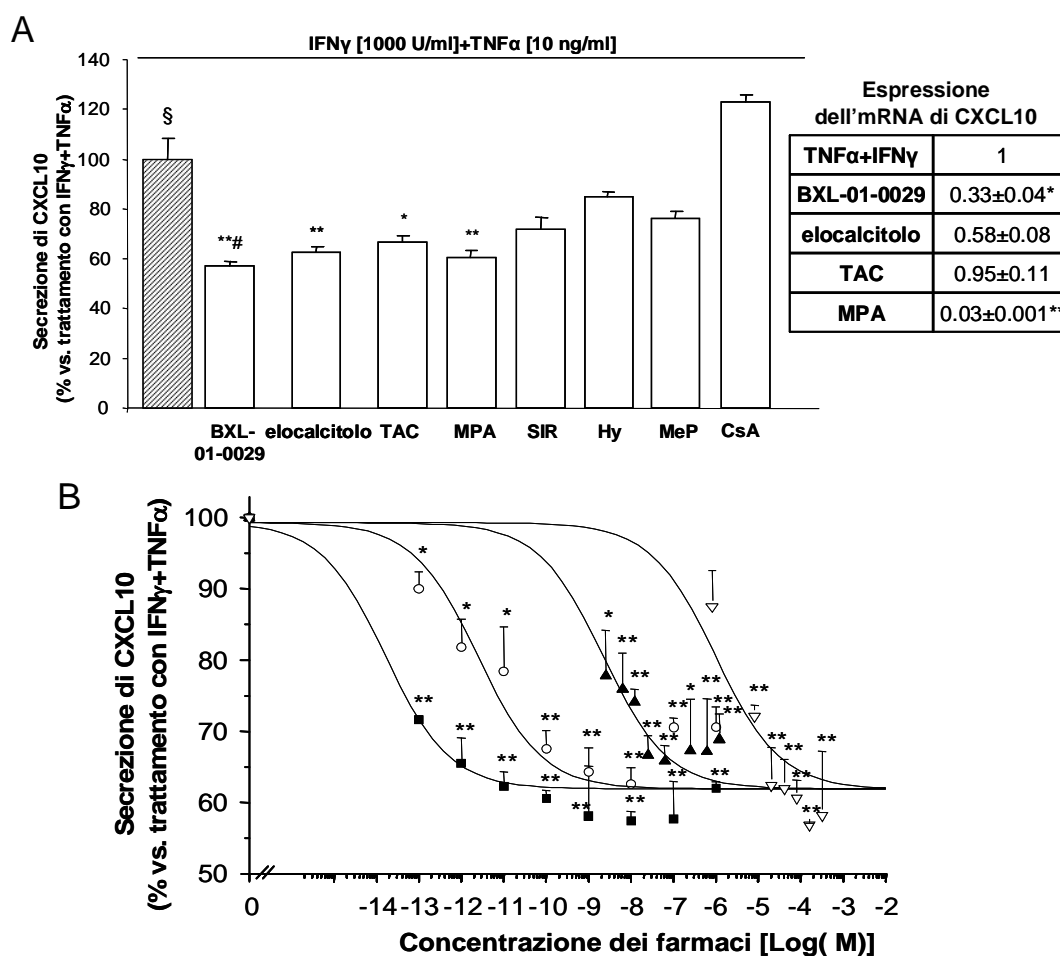
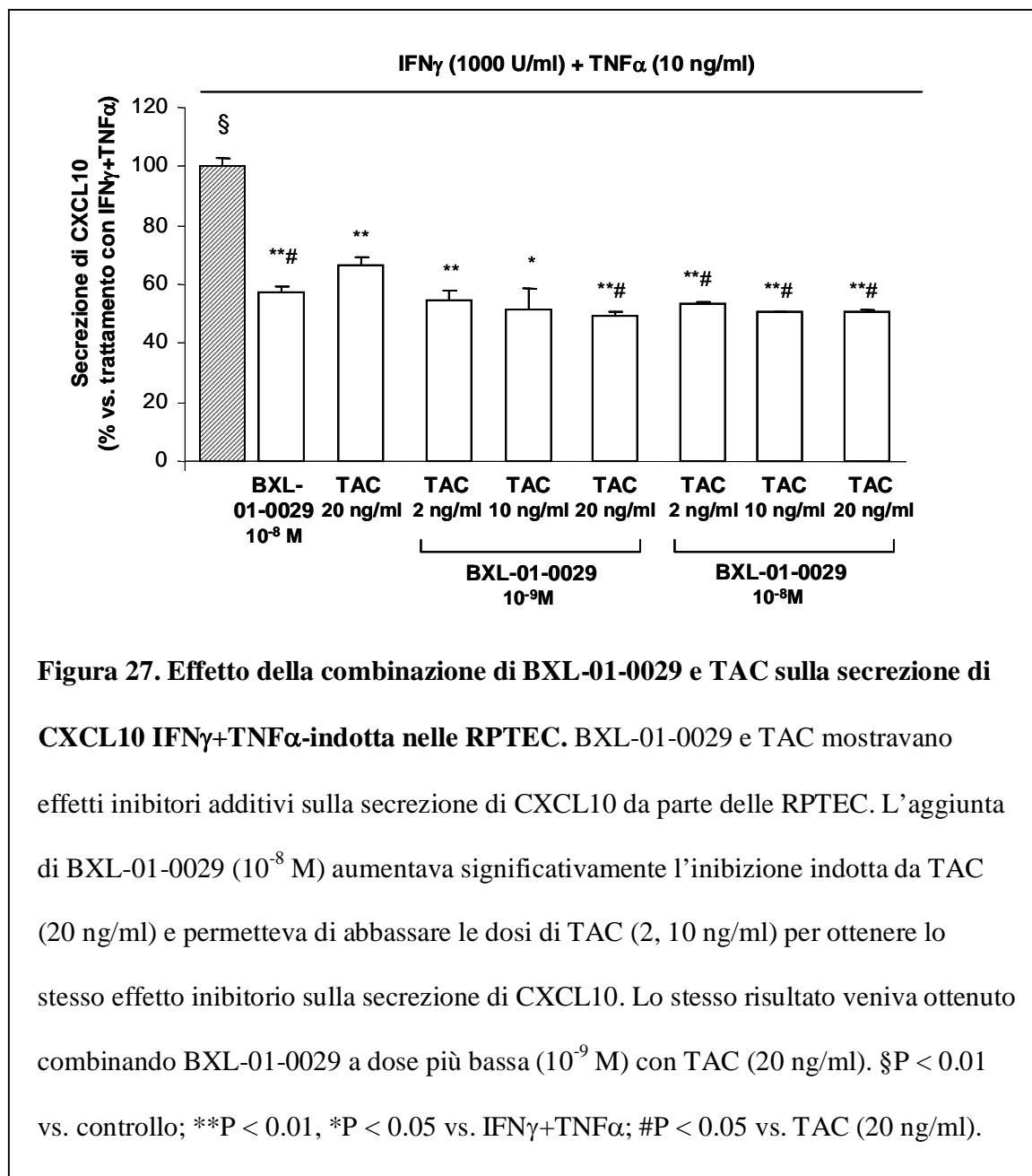


Figura 26. Risposta ai farmaci immunosoppressori delle RPTEC stimulate con citochine proinfiammatorie. (A) BXL-01-0029 (10^{-8} M), elocalcitolo (10^{-8} M), TAC (20 ng/ml) e MPA (26 μ g/ml) riducevano significativamente la secrezione di CXCL10 indotta da IFN γ (1000 U/ml) + TNF α (10 ng/ml) (presa come 100%, §P < 0.01 vs. controllo), mentre SIR (15 ng/ml), Hy (100 ng/ml), MeP (250 ng/ml) e CsA (250 ng/ml) erano inefficaci. *Inset:* MPA e BXL-01-0029 riducevano significativamente l'espressione genica di CXCL10 indotta da IFN γ (1000 U/ml) + TNF α (10 ng/ml) (presa come 1). (B) BXL-01-0029 mostrava la potenza maggiore [BXL-01-0029 (quadrati neri): $-\log IC_{50} = 13.79 \pm 0.46$; elocalcitolo (cerchi bianchi): $-\log IC_{50} = 11.62 \pm 0.28$; TAC (triangoli neri): $-\log IC_{50} = 8.66 \pm 0.24$; MPA (triangoli bianchi): $-\log IC_{50} = 6.01 \pm 0.29$; P < 0.01, ogni farmaco vs. gli altri]. **P < 0.01, *P < 0.05 vs. IFN γ + TNF α ; #P < 0.05 vs. TAC.

La Figura 27 mostra che la simultanea presenza di BXL-01-0029 (10^{-8} M) aumenta significativamente l'effetto inibitorio di TAC (2, 10, 20 ng/ml) sulla secrezione proteica di CXCL10 indotta dalle due citochine nelle RPTEC ($P < 0.05$ vs. TAC 20 ng/ml); una riduzione significativa della secrezione di CXCL10 era osservata anche dopo la combinazione di una concentrazione più bassa di BXL-01-0029 (10^{-9} M) con TAC (20 ng/ml) ($P < 0.05$ vs. TAC 20 ng/ml).



3.3. Valutazione della tossicità cellulare di BXL-01-0029, elocalcitolio, TAC e MPA nelle RPTEC

La vitalità cellulare delle RPTEC, trattate per 1-6 giorni con BXL-01-0029 (10^{-8} M), elocalcitolio (10^{-8} M), TAC (20 ng/ml) e MPA (26 μ g/ml) è stata stimata per valutare la potenziale citotossicità dei farmaci. BXL-01-0029, elocalcitolio e TAC non modificavano significativamente il numero delle cellule vitali rispetto al controllo (preso come 100%, non mostrato). Al contrario, MPA riduceva significativamente le cellule vitali a partire dal terzo giorno di trattamento ($P < 0.05$, $P < 0.01$ vs. controllo o trattamento con gli altri farmaci; Figura 28).

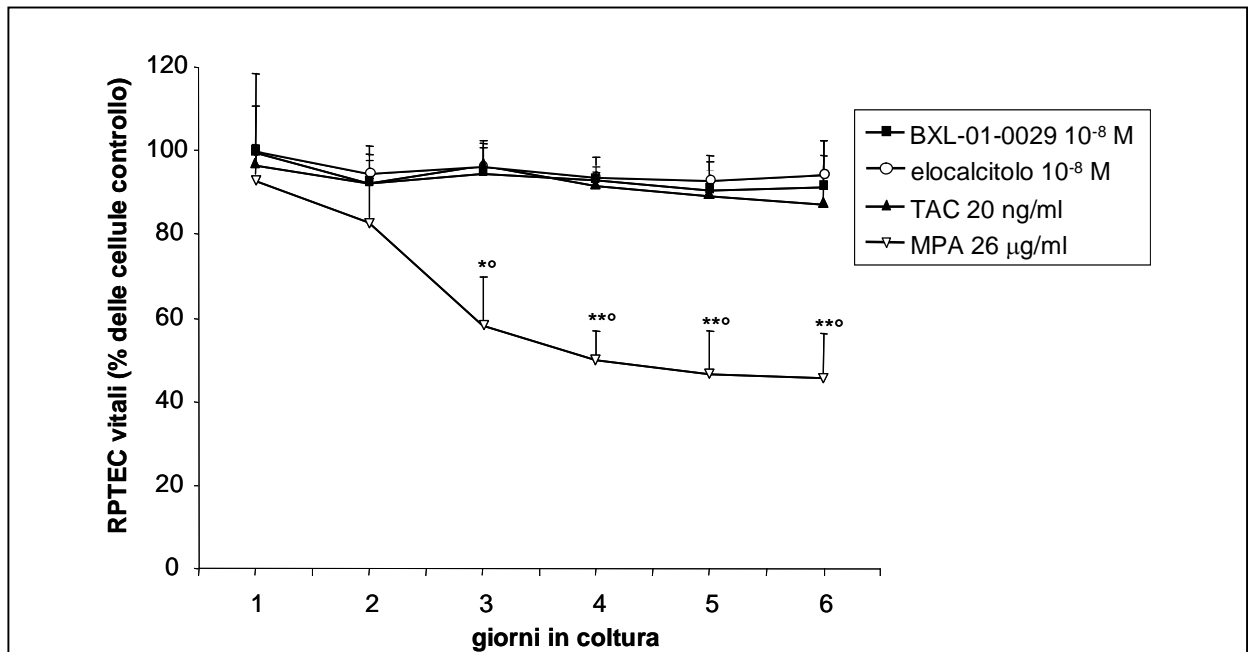


Figura 28. Effetto di BXL-01-0029, elocalcitolio, TAC e MPA sulla vitalità delle RPTEC.

BXL-01-0029 (10^{-8} M, quadrati neri), elocalcitolio (10^{-8} M, cerchi bianchi) e TAC (20 ng/ml, triangoli neri) non alteravano la vitalità delle RPTEC vs. il controllo, a differenza di MPA (26 μ g/ml), che la riduceva significativamente a partire dal terzo giorno di trattamento.

** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs. controllo; MPA: $^{\circ\circ}P < 0.01$, $^{\circ}P < 0.05$ vs. gli altri tre farmaci.

4. LINFOCITI T CD4+

4.1. Effetto di BXL-01-0029, elocalcitolo, TAC e MPA sui linfociti T CD4+

Abbiamo valutato l'effetto di BXL-01-0029, TAC e MPA sulla secrezione di CXCL10, indotta da stimoli proinfiammatori, in linfociti T CD4+. Per confronto è riportato anche elocalcitolo, di cui avevamo dimostrato gli effetti sui linfociti T CD4+ in un precedente lavoro [95].

I linfociti T CD4+ trattati per 48 h con P/I (1 μ M/10 ng/ml) secreverano grandi quantità di CXCL10 (244.54 \pm 46.67 pg/ml), IFN γ (103558.11 \pm 14294.40 pg/ml) e TNF α (50920.56 \pm 6203.17 pg/ml), rispetto a livelli quasi irrilevanti nelle cellule controllo, come precedentemente riportato [95]. La co-incubazione con BXL-01-0029 (10^{-8} M), elocalcitolo (10^{-8} M), TAC (20 ng/ml) o MPA (26 μ g/ml) diminuiva significativamente la secrezione P/I-indotta di CXCL10 da parte delle cellule T CD4+ (BXL-01-0029 = 28.18 \pm 6.75%, elocalcitolo = 25.49 \pm 7.68%, TAC = 29.18 \pm 12.74%, MPA = 35.79 \pm 15.76%; P<0.01 vs. trattamento con P/I, preso come 100%, Figura 29A).

L'analisi real time RT-RPCR ha mostrato che BXL-01-0029, elocalcitolo [95] e TAC erano capaci di ridurre significativamente l'espressione dell'mRNA di CXCL10 indotta da P/I nelle cellule T CD4+; al contrario MPA non aveva effetti significativi (Figura 29B).

TAC e MPA, come dimostrato in precedenza per elocalcitolo [95], inibivano significativamente la secrezione proteica di IFN γ (TAC=8.02 \pm 5.02%, MPA=17.78 \pm 2.75%, elocalcitolo=48.6 \pm 6.68%, P<0.01, P<0.05 vs. trattamento con P/I, preso come 100%) e TNF α (TAC=2.05 \pm 0.03%, MPA=35.31 \pm 9.62%, elocalcitolo=47.92 \pm 11.96%, P<0.01, P<0.05 vs. trattamento con P/I, preso come 100%), mentre BXL-01-0029 non esercitava nessun effetto significativo sulla secrezione delle citochine proinfiammatorie (Figure 29C,D).

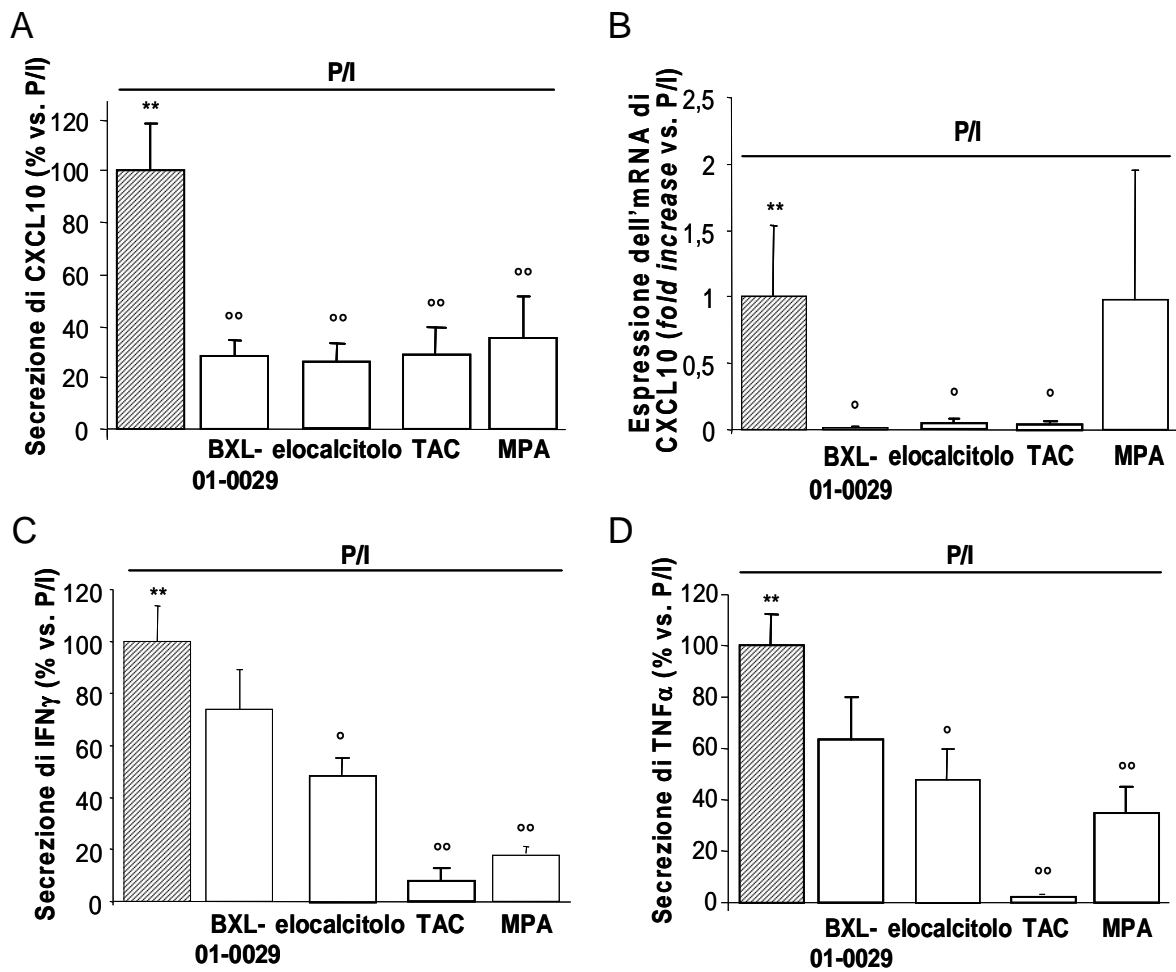


Figura 29. Effetto di BXL-01-0029, elocalcitol, TAC e MPA nelle cellule T CD4+. (A) BXL-01-0029 (10^{-8} M), elocalcitol (10^{-8} M), TAC (20 ng/ml) o MPA (26 μ g/ml) inibivano significativamente la secrezione di CXCL10 indotta da P/I (1 μ M/10 ng/ml) ($^{\circ}$ P<0.01 vs. trattamento con P/I). (B) BXL-01-0029, elocalcitol e TAC riducevano significativamente l'espressione P/I-indotta dell'mRNA di CXCL10 ($^{\circ}$ P<0.05 vs. trattamento con P/I), mentre MPA non mostrava alcun effetto significativo. (C-D) Elocalcitol, TAC e MPA diminuivano significativamente la secrezione di IFN γ e TNF α nelle cellule T CD4+ P/I-attivate, a differenza di BXL-01-0029 ($^{\circ}$ P<0.05, $^{\circ}$ P<0.01 vs. trattamento con P/I).

4.2. Valutazione della tossicità di BXL-01-0029, elocalcitololo, TAC e MPA nei linfociti T CD4+

La tossicità dei farmaci è stata valutata anche nei linfociti T CD4+, attivati con P/I (1 μ M/10 ng/ml) e trattati per 1-6 giorni (Figura 30). Né BXL-01-0029 né elocalcitololo avevano alcun effetto significativo sulla vitalità delle cellule T CD4+ P/I-attivate (prese come 100%, non mostrato). TAC e MPA riducevano il numero delle cellule T CD4+ vitali rispettivamente 4 e da 3 giorni dopo il trattamento ($P < 0.05$, $P < 0.01$ vs. trattamento con P/I). In particolare, la differenza tra l'effetto esercitato da MPA e gli altri tre farmaci raggiungeva la significatività statistica a partire dal terzo giorno di trattamento ($P < 0.05$, $P < 0.01$).

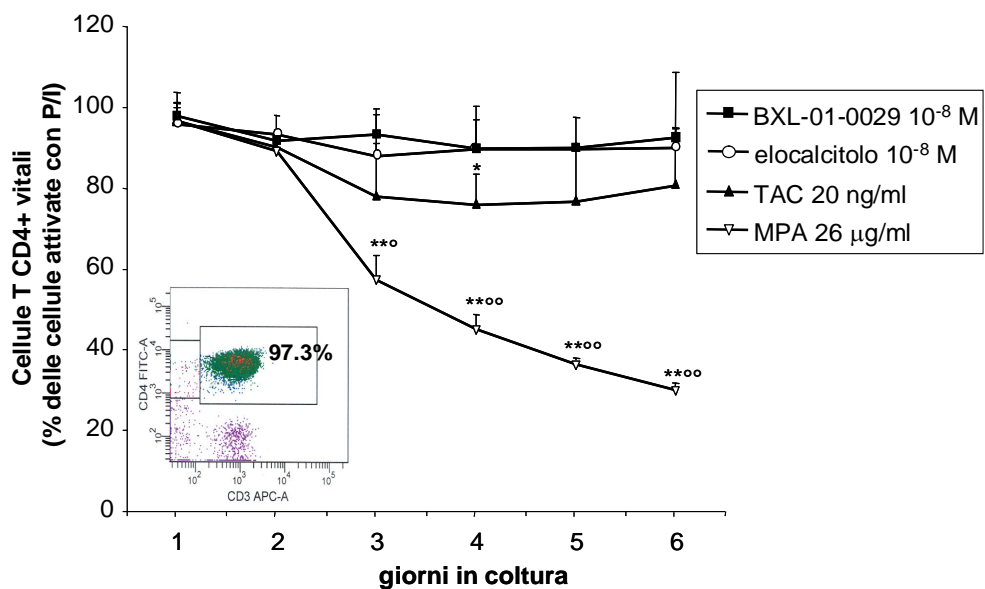


Figura 30. Effetto di BXL-01-0029, elocalcitololo, TAC e MPA sulla vitalità dei linfociti T CD4+.

La vitalità dei linfociti T CD4+ P/I-attivati, presa come 100%, non era alterata da BXL-01-0029 (10⁻⁸ M, quadrati neri) e elocalcitololo (10⁻⁸ M, cerchi bianchi). TAC (20 ng/ml, triangoli neri) e MPA (26 μ g/ml, triangoli bianchi) riducevano significativamente il numero di cellule vitali, rispettivamente il quarto e dal terzo giorno di coltura. *Inset*: la purezza della popolazione di cellule T CD4+ era 97.3%.

** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs. P/I; MPA: ° $P < 0.05$, °° $P < 0.01$ vs. gli altri tre farmaci.

DISCUSSIONE

Il successo del trapianto d'organo è stato principalmente raggiunto attraverso una migliore comprensione dell'immunologia del rigetto e l'applicazione di strategie per la ricognizione, il trattamento e la prevenzione del rigetto stesso.

Nonostante la prolungata terapia immunosoppressiva, il rigetto acuto rappresenta ancora la maggior causa di morbilità e mortalità entro il primo anno dal trapianto di cuore [2]. Episodi frequenti e ricorrenti di rigetto acuto sfociano in disfunzione cardiaca e precoce fallimento del trapianto [126] o nello sviluppo a lungo termine di rigetto cronico. Il rigetto acuto può avvenire in un *range* di gravità da medio a severo, a seconda di una moltitudine di fattori correlati al regime di sorveglianza e alla risposta del ricevente all'immunosoppressione e all'allo-sensibilizzazione. L'induzione e il mantenimento dell'immunosoppressione sono al momento le principali modalità terapeutiche, ma continuano a rimanere insufficienti e il rigetto cardiaco acuto continua ad essere un problema clinico significativo da risolvere. Attualmente, la sorveglianza del rigetto del trapianto cardiaco è effettuata solo attraverso biopsia endomiocardica, che è la procedura *gold standard*, con elevate sensibilità e specificità, ma che è invasiva e fastidiosa per il paziente. Inoltre, recentemente alcuni autori hanno suggerito che la sua utilità dovrebbe essere rivalutata entro il primo anno dal trapianto [127]. Sebbene uno degli scopi principali degli immunologi trapiantologi sia stato quello di sviluppare test per valutare il rischio pre-trapianto dei pazienti di sviluppare episodi di rigetto, finora non sono stati stabiliti in modo definitivo dei *biomarker* nella sorveglianza dei pazienti pre- o post-trapianto [128]. Senza dubbio, un *marker* pre-trapianto non invasivo e predittivo della funzionalità del trapianto sulla base dello stato immunitario del ricevente sarebbe di grande utilità in clinica. E' noto che il risultato del trapianto sia strettamente correlato alle variabili che agiscono nell'immediato periodo peri-

trapianto [129]; prove crescenti enfatizzano il ruolo di CXCL10 nell'inizio e nell'amplificazione dell'allorispota precedente il rigetto dell'organo [33]. La risposta immunitaria nel rigetto del trapianto è legata al *trafficking* delle cellule Th1 guidato dalle chemochine leganti CXCR3, come CXCL9, CXCL10 e CXCL11, note per essere criticamente coinvolte nella patogenesi del rigetto acuto e nello sviluppo di CAV [17,105,130]. Al contrario, CCL22, che appartiene ai ligandi di CCR4, sembra mediare la tolleranza [101], sebbene essa possa reclutare i linfociti T.

L'analisi di biopsie cardiache ha rivelato infiltrati di cellule T, con una predominanza del profilo secernente IFN γ e una forte up-regolazione delle chemochine IFN γ -indotte [114], dimostratesi associate allo sviluppo di CAV e rigetto [117].

E' stato anche osservato che il declino della funzionalità renale seguente a rigetto del trapianto di rene correla con il danno tubulo-interstiziale e la fibrosi renale progressivi provocati da accumulo di leucociti Th1 e perpetuate dalla produzione locale di chemochine [14,25,26,131,132]. CXCL10 non solo media il reclutamento dei leucociti verso l'organo rigettato, ma è anche un iniziatore critico della risposta immunitaria agli alloantigeni [133]. Quindi, CXCL10 sembra giocare un ruolo chiave nell'instaurazione di un *loop* infiammatorio auto-promuoventesi durante la risposta immunitaria in corso di rigetto. CXCL10, inoltre, altera la funzionalità delle cellule endoteliali vascolari e delle cellule muscolari lisce [16,134-139]. Questa doppia funzione di CXCL10 nelle cellule immunitarie e vascolari ha già reso questa chemochina un importante elemento di controllo e *target* della terapia per il rigetto del trapianto [17]. Infatti, recentemente è stato dimostrato che i livelli serici pre-trapianto di CXCL10 predicono il rischio di rigetto e di perdita d'organo in riceventi il trapianto di rene [31,33].

In accordo, nel presente studio le analisi multivariata e ROC hanno mostrato che, di vari fattori di rischio - età e sesso di ricevente e donatore, patologia originaria, tempo di ischemia, terapia peri-trapianto, CMV, numero di *mismatches* HLA-A, -B o -DR, e livelli serici pre-trapianto di CCL22 -

livelli serici pre-trapianto di CXCL10 maggiori di 160 pg/mL hanno un significativo potere predittivo di sviluppo di rigetto entro 3 mesi dal trapianto di cuore. Questo risultato sembra particolarmente importante dal momento che degli episodi totali di rigetto che avvenivano entro 6 mesi dal trapianto (38%), la maggior parte aveva luogo nei primi 3 mesi (17%, 23%, e 33% rispettivamente dopo 1, 2 e 3 mesi). Potrebbe essere ipotizzato che la relazione tra i livelli serici pre-trapianto di CXCL10 e il rigetto dell'organo sia correlata a una generica risposta infiammatoria del paziente. Rotondi et al. [33] hanno però dimostrato, in riceventi trapianto di rene, che non c'è una significativa correlazione tra i livelli serici pre-trapianto di CXCL10 e quelli della proteina C-reattiva (CRP), *marker* dello stato infiammatorio sistemico. Una mancanza di correlazione tra CXCL10 e stato infiammatorio sistemico è stato osservato anche nei trapiantati di cuore [140]. E' interessante far notare che, in riceventi trapianto di rene, il ruolo di CXCL10 è stato direttamente collegato alla patogenesi di rigetto acuto, mentre aumentati livelli serici pre-trapianto di CRP non sembrano essere predittivi dell'esito del trapianto [33,141]. Invece, un'analisi combinata dei livelli plasmatici di CRP e del peptide natriuretico cerebrale (*Probrain natriuretic peptide*, proBNP, correlato alla funzione ventricolare) è un significativo predittore di sviluppo di CAV e di mortalità da ogni causa [127].

Il nostro studio dimostra che CXCL10 è un *biomarker* non invasivo predittivo di rigetto acuto nei riceventi trapianto di cuore, principalmente nei primi mesi post-trapianto. Pazienti con livelli serici pre-trapianto di CXCL10 maggiori di 160 pg/mL hanno il 75% e il 70% di rischio di andare incontro a rigetto acuto rispettivamente entro 2 e 3 mesi dal trapianto, come mostrato dalle curve ROC. In seguito, i livelli serici di CXCL10 perdono il loro potere predittivo, sebbene rimangano un fattore di rischio significativo fino a 6 mesi dopo il trapianto. Inoltre, a 6 mesi acquisiscono significatività statistica anche l'età del ricevente e l'infezione da CMV, nota per essere associata ad un aumentato rischio di rigetto del trapianto [142]. I nostri risultati sono in linea con una serie di studi che

mostrano che l'infezione da CMV può avere un ruolo importante nel rigetto cardiaco acuto [143-145]. Comunque, nei riceventi di trapianto cardiaco del nostro studio soggetti a un'infezione da CMV non si è riscontrato un aumentato rischio di rigetto acuto nei primi 5 mesi dopo il trapianto, mentre esso viene osservato dopo 6 mesi. Questo può suggerire che un'infezione subclinica prolungata abbia un ruolo nella fisiopatologia della risposta immunologica che provoca il rigetto del trapianto [144]. D'altra parte, sebbene la variabile "infezione da CMV" sia significativa all'analisi multivariata dopo 6 mesi dal trapianto, il suo rischio relativo elevato (4.85) potrebbe essere dovuto a un risultato matematico per il relativamente piccolo gruppo di pazienti analizzati (Tabella 3). In quest'ottica, la possibilità che la relazione significativa tra CMV e rigetto cardiaco a 6 mesi possa essere meramente un artefatto statistico non deve essere scartata e necessita di essere analizzata in una popolazione più ampia. Questi studi sul potenziale potere predittivo di rigetto dovrebbero essere estesi ad altri *biomarker* non invasivi. La loro analisi combinata potrebbe infatti reciprocamente rafforzare il loro valore predittivo, per identificare i riceventi di trapianto di cuore con un elevato rischio di rigetto acuto, che potrebbero richiedere una gestione diversa dei regimi immunosoppressivi. Sebbene CXCL10 dovrebbe essere oggetto di ulteriori studi, il nostro lavoro dimostra che la misurazione dei livelli serici pre-trapianto di CXCL10 potrebbe essere un utile strumento in clinica.

Come detto precedentemente, le colture di cardiomiociti umani rappresentano uno strumento unico per la ricerca sul rigetto del trapianto di cuore, ma è molto difficile ottenere e mantenere culture affidabili e riproducibili. Oltre alla mancanza di metodologie rigorose per la differenziazione delle cellule in cardiomiociti [146], la limitata purezza delle preparazioni cellulari, spesso associata all'isolamento delle cellule staminali embrionali [146,147], e la limitata durata di vita *in vitro*, mostrata ad esempio dai miociti umani adulti post-mitotici [148], sono i principali limiti incontrati. Inoltre, le cellule trasformate verso l'immortalizzazione spesso soffrono della mancanza del fenotipo

tipico [148-150]. A differenza delle cellule adulte, i cardiomiociti fetali si sono dimostrati capaci di proliferare e differenziare sotto ristrette condizioni sperimentali [151,152]. Studi su trapianti cellulari come terapia per l'insufficienza cardiaca hanno mostrato che queste cellule possono sopravvivere e differenziare, divenendo funzionalmente accoppiate [153-155]. Nel nostro studio abbiamo dimostrato che le Hfcm, ottenute da tessuti cardiaci fetali (10-12 settimane di gestazione), differenziano spontaneamente in cellule cardiache mature. Le Hfcm derivano da una popolazione non ancora differenziata ma già commissionata verso il *lineage* cardiaco, come mostrato dall'espressione dei trascritti di *marker* specifici (GATA4, Nkx2.5, Isl1) [156,157]. L'assenza di cellule positive per Sca-1 e CD133 (dati non mostrati) e la presenza di canali ionici di tipo cardiaco funzionali già in coltura primaria esclude una popolazione di cellule staminali. In particolare, l'espressione di Isl1, un fattore di trascrizione associato al commissionamento delle cellule verso il *lineage* cardiaco [158], documenta che le Hfcm hanno perso il loro stato di cellule staminali indifferenziate. Le cellule Isl1+ sono state riportate come gli autentici progenitori cardiaci endogeni, con un'efficiente conversione al fenotipo cardiaco maturo, con un'espressione stabile di *markers* cardiomiocitari e con ricircolo del Ca²⁺ e generazione di potenziali d'azione intatti [157]. Coerentemente, l'analisi *patch-clamp* ha mostrato il progressivo spostamento delle Hfcm verso un fenotipo pienamente maturo. Infatti, alcune correnti ioniche tipiche cardiache (Ito, IK1) erano esibite già in coltura primaria, e, più tardi, quasi tutte le correnti cardiache erano ben misurabili, con un'ampiezza aumentata rispetto ai primi passaggi. Infine, è stata osservata anche la generazione di potenziali d'azione con l'andamento tipico dei potenziali di tipo ventricolare adulto differenziato. Allo stesso tempo, sono state osservate *gap junctions* eterotipiche e omotipiche. La maggior parte delle *gap junctions* omotipiche esprimono Cx43, l'isoforma che rimpiazza Cx40 e Cx45 durante lo sviluppo nel miocardio adulto ventricolare [159]. L'analisi dell'espressione proteica ha confermato la presenza di Cx43 e un *pattern* proteico tipico del fenotipo di cellule cardiache mature. Quindi, le

Hfcm spontaneamente esibiscono e mantengono la competenza funzionale di cardiomiociti maturi, allo stesso tempo mantenendo la capacità di proliferare, sebbene con una durata di vita limitata nel tempo.

La cascata chemochinica osservata nel rigetto del trapianto dipende dalla produzione locale di IFN γ e probabilmente dirige il reclutamento delle cellule T attivate dagli alloantigeni [17]. In particolare, la produzione di CXCL10 dentro all'organo trapiantato, probabilmente da parte delle cellule endoteliali del donatore, sembra mediare la chemoattrazione di diverse sottopopolazioni di leucociti che esprimono CXCR3 [130], contribuendo potentemente al rigetto di cuore [20]. Nonostante le intense ricerche, la fonte e i meccanismi che inducono la produzione di CXCL10 nei trapianti rimane ancora poco chiara.

Nelle Hfcm, la secrezione di CXCL10 è stimolata da IFN γ , in linea con diversi studi precedenti in vari tipi di cellule residenti d'organo [124,125] e anche da TNF α , in linea con la nostra recente osservazione nei tireociti [114]. In accordo, le vie di segnalazione intracellulare Stat1 e NF-kB vengono attivate dalle due citochine. Inoltre, la combinazione delle due citochine proinfiammatorie esercita un potente effetto sinergico a livello genico e proteico sull'induzione di CXCL10. La sinergia con TNF α è un passaggio essenziale per potenziare la risposta infiammatoria Th1 IFN γ -indotta [160]. Nelle Hfcm, TNF α aumenta l'espressione di IFN γ R, in linea con dati simili da noi ottenuti nei tireociti umani [114]. L'up-regolazione di IFN γ R potrebbe spiegare l'aumentata entità di risposta delle cellule a IFN γ in termini di secrezione di CXCL10. Quindi, sembra che si instauri un *loop* infiammatorio auto-alimentantesi, dal momento che CXCL10 potenzia l'immunità Th1, guidata dai linfociti T CD4+ reclutati ai siti di infiammazione [133,139,161]. In conclusione, abbiamo mostrato che i cardiomiociti sono una fonte di CXCL10, contribuendo così a perpetuare la cascata immunitaria Th1-mediata; quindi, sebbene le cellule fetali abbiano una ridotta immunogenicità

rispetto alle cellule adulte [162,163], le Hfcm rappresentano un modello *in vitro* utile per ulteriori studi sul rigetto del trapianto.

Questo studio mostra che in cardiomiociti umani solo il MPA, tra gli immunosoppressori classicamente utilizzati in clinica, riduce in maniera consistente il *loop* infiammatorio che si instaura. I regimi immunosoppressivi correnti, come inibitori della calcineurina (CsA e TAC), corticosteroidi (MeP, Hy), inibitori dei segnali proliferativi (SIR) e immunosoppressori anti-proliferativi (MPA), consistono di agenti selezionati per lavorare in combinazione, dal momento che essi bersagliano parti diverse della risposta delle cellule T al trapianto. MPA, combinato con TAC, sembra essere uno dei più efficaci nei riceventi il trapianto di cuore [34,164], ma la combinazione migliore non è stata ancora trovata.

E' quindi particolarmente interessante che nelle Hfcm l'agonista del VDR BXL-01-0029 e RGZ riducano la secrezione di CXCL10 in modo simile a MPA, ma con una potenza farmacologica maggiore; in particolare BXL-01-0029 emerge come il farmaco significativamente più potente.

Le pronunciate proprietà immunoregatorie degli agonisti del VDR li hanno resi possibili interessanti strumenti terapeutici [165]. I regimi immunosoppressivi convenzionali, l'unica opzione terapeutica per i riceventi trapianto d'organo, esercitano i loro effetti a dosi vicine al *range* di tossicità; quindi potrebbe essere altamente utile l'aggiunta di nuovi agenti immunosoppressivi mirata a ridurre le dosi di impiego e di conseguenza gli effetti collaterali.

L'efficacia del calcitriolo, metabolita attivo della vitamina D, è stata descritta in vari modelli di trapianto d'organo [16,138,139,165], ma l'uso clinico del calcitriolo è impedito dallo sviluppo di ipercalcemia e ipercalciuria [69]. Di conseguenza, analoghi della vitamina D meno o non ipercalcemizzanti sono stati sviluppati e applicati con successo in diversi modelli di rigetto d'organo, sia acuti che cronici [50,138]. Le proprietà immunoregatorie degli agonisti del VDR, che portano a un'inibizione selettiva delle cellule Th1, può essere spiegata con un bersagliamento

sia diretto che indiretto delle cellule T, attraverso l'inibizione delle citochine di tipo Th1 o la modulazione delle funzioni delle cellule dendritiche [68,71,166].

Sebbene l'inibizione delle cellule Th1 rappresenti un *pattern* comune, sono stati dimostrati anche meccanismi regolatori diretti degli agonisti del VDR sulla produzione di chemochine da parte dei tessuti *target* [59]. In accordo, BXL-01-0029 bersaglia i cardiomiociti umani inibendo la secrezione indotta da $IFN\gamma+TNF\alpha$ con una potenza maggiore di MPA - l'unico immunosoppressore classico efficace sulle cellule cardiache. Questa differenza di potenza potrebbe dipendere, almeno in parte, dall'interferenza da parte del ligando del VDR sul meccanismo alla base della sinergia tra le due citochine proinfiammatorie, guidata da $TNF\alpha$. Questo effetto sembra particolarmente rilevante, poiché altera l'entità della risposta delle cellule a $IFN\gamma$, almeno in termini di secrezione di CXCL10. L'importanza di $TNF\alpha$ nello stato funzionale del cuore è, d'altra parte, nota da tempo [167]. In particolare, BXL-01-0029 sembra abolire l'attivazione della via di $TNF\alpha$ - come mostrato dall'assenza virtuale sia della fosforilazione che della traslocazione nucleare di NF-kB.

E' inoltre importante sottolineare che, mentre MPA causa una significativa riduzione nel numero di cardiomiociti vitali, BXL-01-0029 non esercita nessun effetto tossico diretto in queste cellule.

Per quanto riguarda le cellule renali tubulari, sia elocalcitololo che BXL-01-0029 riducono significativamente la secrezione di CXCL10 indotta da $IFN\gamma+TNF\alpha$ nelle RPTEC; degli immunosoppressori classici solo TAC e MPA bersagliano la secrezione di CXCL10, mentre SIR, Hy, MeP e CsA sono inefficaci. BXL-01-0029 e MPA diminuiscono significativamente anche l'espressione del gene di CXCL10. BXL-01-0029 riduce la secrezione di CXCL10 da parte delle RPTEC con la potenza maggiore. La simultanea presenza di BXL-01-0029 e TAC mostra effetti additivi sulla secrezione citochino-indotta di CXCL10 nelle RPTEC.

Dal momento che il bersagliamento dell'asse CXCL10-CXCR3 potrebbe essere essenziale nella risoluzione o progressione delle patologie renali, l'osservazione che elocalcitololo e, con una potenza maggiore, BXL-01-0029 diminuiscano la secrezione di CXCL10 indotta dalle citochine proinfiammatorie nelle RPTEC appare particolarmente interessante.

E' stato dimostrato che gli agonisti del VDR inibiscono l'infiammazione renale e la fibrosi interstiziale in modelli sperimentali [82,84,168-170] e riducono la proteinuria e la mortalità da ogni causa in pazienti con patologie renali croniche [76-81]. Oltre all'inibizione del sistema renina-angiotensina [82, 84-88] gli effetti benefici renali degli agonisti del VDR sembrano attribuibili alle loro proprietà anti-infiammatorie intrinseche [44,54], cioè, come precedentemente detto, all'inibizione selettiva della risposta Th1 [165] dovuta alla loro capacità di modulare sia la funzione delle cellule immunitarie che la produzione di chemochine da parte delle cellule degli organi bersaglio [67,171-173]. Questi effetti sembrano ottenuti, in particolare, tramite l'inibizione dell'attivazione di NF-kB [94,95,173,174], che potrebbe risultare una strategia importante per prevenire la progressione della fibrosi renale [175,176]. In base ai nostri esperimenti con inibitori selettivi, NF-kB, JNK e PI3K sembrano le vie intracellulari più coinvolte nella secrezione di CXCL10 indotta dalle citochine proinfiammatorie nelle RPTEC, mentre p38 MAPK e Stat-1 appaiono coinvolte in misura minore. In questo e in precedenti lavori su tipi cellulari diversi, abbiamo osservato che elocalcitololo e BXL-01-0029 esercitano i loro effetti bloccando le vie di NF-kB, Stat1 e PI3K [95,177]. Quindi, sebbene debbano essere condotti ulteriori esperimenti per chiarire il loro meccanismo d'azione nelle RPTEC, possiamo speculare che il blocco di queste vie intracellulari potrebbe spiegare, almeno in parte, gli effetti esercitati dagli agonisti del VDR nelle RPTEC. Inoltre, la scoperta che BXL-01-0029 è il farmaco più potente ed è capace di aumentare significativamente l'effetto inibitorio di TAC sulla secrezione di CXCL10 nelle RPTEC è molto interessante. Infatti, la combinazione di questi due farmaci permette di abbassare le dosi di entrambi

i farmaci per raggiungere lo stesso effetto inibitorio. Il potenziale anti-infiammatorio di TAC in cellule epiteliali renali tubulari è stato recentemente spiegato con la soppressione di NF- κ B [178]. BXL-01-0029, come precedentemente detto, abolisce la traslocazione nucleare di NF- κ B nei cardiomiociti, in accordo con l'osservazione che il suo agente attivo, BXL-219, è un inibitore di NF- κ B mediante l'arresto della traslocazione nucleare della subunità p65 di NF- κ B e l'up-regolazione della trascrizione della subunità inibitoria I κ B α [173]. Quindi, l'effetto sinergico di BXL-01-0029 e TAC potrebbe essere dovuto, parzialmente, al blocco simultaneo della traslocazione di NF- κ B da parte di entrambi i farmaci e, parzialmente, all'inibizione dell'espressione genica di CXCL10 da parte di BXL-01-0029.

Precedenti dati sugli animali hanno mostrato che gli agonisti del VDR, abbassando le dosi terapeutiche di CsA, riducevano il rischio di rigetto acuto [68] o di nefrotossicità cronica [179]. Più recentemente, è stata riportata l'efficacia protettiva di paracalcitolo, un agonista del VDR, combinato con trandolapril, un inibitore dell'enzima convertitore dell'angiotensina, in un modello murino di nefropatia ostruttiva [83].

Queste osservazioni potrebbero essere rilevanti, dal momento che gli immunosoppressori convenzionali esercitano i loro effetti terapeutici a dosi vicine al *range* di tossicità, mentre elocalcitolo e BXL-01-0029 inibiscono la risposta infiammatoria Th1-mediata bersagliando CXCL10, senza alterare la vitalità né delle RPTEC, né dei linfociti T CD4+. Similmente, TAC non influenza la vitalità delle RPTEC, in accordo con precedenti dati dimostranti l'assenza di citotossicità a basse concentrazioni nelle cellule tubulari renali [180]. MPA, precedentemente riportato abrogare la proliferazione delle cellule tubulari renali [181], nelle nostre mani riduce significativamente la vitalità delle RPTEC, in linea con un recente lavoro [182]. La varietà dei regimi immunosoppressivi attuali conferma l'assenza di un protocollo terapeutico dominante,

sebbene gli inibitori della calcineurina, nonostante la loro nefrotossicità, rimangano i capisaldi della terapia nel trapianto di rene [183]. Un'altra fondamentale sfida nella terapia post-trapianto è quella di evitare la nefrotossicità cronica [184]. TAC sembra meno nefrotossico di CsA, e questo potrebbe spiegare perché molti centri abbiano adottato regimi terapeutici basati su TAC [185]. Ulteriori studi sono necessari per verificare se gli agonisti del VDR possono prevenire il rigetto acuto di rene. I risultati precedenti sono incoraggianti, è stato infatti dimostrato che negli uomini la supplementazione di vitamina D favorisce la tolleranza immunitaria verso il trapianto di fegato [186], che elocalcitolo impedisce il rigetto cronico del trapianto d'aorta in modelli animali e che BXL-219 inibisce l'infiammazione Th1-mediata [96,173]. Altro dato molto importante, da un trial clinico sull'iperplasia prostatica benigna è emerso che elocalcitolo possiede un profilo di sicurezza e tollerabilità eccellente [94].

Infine, BXL-01-0029 e elocalcitolo [95] riducono la secrezione proteica di CXCL10 da parte delle cellule T CD4+ isolate in misura paragonabile a TAC e MPA. BXL-01-0029, a differenza di MPA, diminuisce significativamente il trascritto specifico di CXCL10, mentre MPA sembra agire a monte, sulla secrezione delle due citochine proinfiammatorie; elocalcitolo e TAC, invece, agiscono ad ogni livello, sia su CXCL10 che su IFN γ e TNF α .

Dal momento che CXCL10 sembra essere direttamente legato alla patogenesi del rigetto del trapianto e non correlato semplicemente a uno stato infiammatorio generico, l'inibizione della secrezione proteica di CXCL10 sia in cellule dei tessuti *target*, come cardiomiociti e cellule epiteliali tubulari renali, sia in linfociti T CD4+ da parte degli agonisti del VDR è un risultato estremamente importante.

Infatti, una terapia *multi-target*, data dalla combinazione di farmaci capaci di bersagliare la produzione di chemochine sia in cellule immunitarie che in cellule residenti d'organo, potrebbe essere un valido strumento per migliorare la gestione dei riceventi trapianto d'organo.

Ulteriori studi devono essere svolti per approfondire la conoscenza dei meccanismi d'azione e dei bersagli degli immunosoppressori, così da individuare possibili combinazioni di farmaci mirate a diminuire le dosi terapeutiche utilizzate e quindi a minimizzare gli effetti collaterali dannosi.

Comunque, gli effetti sinergici mostrati dagli agonisti del VDR in combinazione con immunosoppressori classici, insieme alla loro grande potenza farmacologica e al loro eccellente profilo di sicurezza e tollerabilità, suggeriscono che essi potrebbero essere una valida aggiunta ai regimi terapeutici per il rigetto del trapianto d'organo.

A tale proposito, ulteriore attenzione dovrebbe essere, in particolare, dedicata a BXL-01-0029, come nuovo potenziale agente dose-riducente per i farmaci immunosoppressori già in uso, e ai suoi effetti sulla secrezione di CXCL9, dato che anche questa chemochina è recentemente emersa come parametro utile a predire il rigetto e la perdita d'organo in riceventi trapianto di rene, analogamente a CXCL10 [1].

BIBLIOGRAFIA

1. Rotondi M, Netti GS, Lazzeri E, Stallone G, Bertoni E, Chiovato L, Grandaliano G, Gesualdo L, Salvadori M, Schena FP, Romagnani P, Serio M. High pretransplant serum levels of CXCL9 are associated with increased risk of acute rejection and graft failure in kidney graft recipients. *Transpl Int* 2010; 23:465-75.
2. Lindenfeld J, Miller GG, Shakar SF, Zolty R, Lowes BD, Wolfel EE, Mestroni L, Page RL II, Kobashigawa J. Drug therapy in the heart transplant recipient: part I: cardiac rejection and immunosuppressive drugs. *Circulation* 2004; 110:3734-40.
3. Woodley SL, Renlund DG, O'Connell JB, Bristow MR. Immunosuppression following cardiac transplantation. *Cardiol Clin* 1990; 8:83-96.
4. Olson LJ, Rodeheffer RJ. Management of patients after cardiac transplantation. *Mayo Clin Proc* 1992; 67:775-84.
5. Coffman RL. Origins of the Th1-Th2 model: a personal perspective. *Nat Immunol* 2006; 7:539-41.
6. Gutcher I, Becher B. APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *J Clin Invest* 2007; 117:1119-27.
7. Lechler RI, Sykes M, Thomson AW, Turka LA. Organ transplantation: how much of the promise has been realized? *Nat Med* 2005; 11:605-13.
8. Hammond EH, Yowell RL, Nunoda S, Menlove RL, Renlund DG, Bristow MR, Gay WA Jr, Jones KW, O'Connell JB. Vascular (humoral) rejection in heart transplantation: pathologic observations and clinical implications. *J Heart Transplant* 1989; 8:430-43.

9. Michaels PJ, Espejo ML, Kobashigawa J, Alejos JC, Burch C, Takemoto S, Reed EF, Fishbein MC. Humoral rejection in cardiac transplantation: risk factors, hemodynamic consequences and relationship to transplant coronary artery disease. *J Heart Lung Transplant* 2003; 22:58-69.
10. Behrendt D, Ganz P, Fang JC. Cardiac allograft vasculopathy. *Curr Opin Cardiol* 2000; 15:422-9.
11. Young JB. Perspectives on cardiac allograft vasculopathy. *Curr Atheroscler Rep* 2000; 2:259-71
12. Hancock WW. Chemokine receptor-dependent alloresponses. *Immunol Rev* 2003;196:37-50.
13. Yopp AC, Krieger NR, Ochando JC, Bromberg JS. Therapeutic manipulation of T cell chemotaxis in transplantation. *Curr Opin Immunol*. 2004; 16:571-7.
14. Segerer S, Nelson PJ, Schlondorff D. Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11:152-76.
15. Hall BM. Cells mediating allograft rejection. *Transplantation* 1991; 51:1141-51.
16. Lazzeri E, Romagnani P. CXCR3-binding chemokines: novel multifunctional therapeutic targets. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2005; 5:109-18.
17. 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.
18. Tellides G. Th1 adaptive immune responses in cardiac graft arteriosclerosis: deleterious or beneficial? *Circulation* 2006; 114:1561-4.

19. Melter M, Exeni A, Reinders ME, Fang JC, McMahon G, Ganz P, Hancock WW, Briscoe DM. Expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand IP-10 during human cardiac allograft rejection. *Circulation* 2001; 104:2558-64.
20. Hancock WW, Gao W, Csizmadia V, Faia KL, Shemmeri N, Luster AD. Donor-derived IP-10 initiates development of acute allograft rejection. *J Exp Med* 2001; 193:975-80.
21. Hancock WW, Lu B, Gao W, Csizmadia V, Faia KL, King JA, Smiley ST, Ling M, Gerard NP, Gerard C. Requirement of the chemokine receptor CXCR3 for acute allograft rejection. *J Exp Med* 2000; 192:1515-20.
22. 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.
23. Zhang Z, Kaptanoglu L, Tang Y, Ivancic D, Rao SM, Luster A, Barrett TA, Fryer J. IP-10-induced recruitment of CXCR3 host T cells is required for small bowel allograft rejection. *Gastroenterology* 2004; 126:809-18.
24. Panzer U, Steinmetz OM, Reinking RR, Meyer TN, Fehr S, Schneider A, Zahner G, Wolf G, Helmchen U, Schaerli P, Stahl RA, Thaiss F Compartment-specific expression and function of the chemokine IP-10/CXCL10 in a model of renal endothelial microvascular injury. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17:454-64.
25. Becker GJ, Hewitson TD. The role of tubulointerstitial injury in chronic renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000; 9:133-8.
26. D'Amico G. Tubulo-interstitial damage in glomerular diseases: its role in the progression of the renal damage. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13:80-5.
27. Segerer S, Cui Y, Eitner F, Goodpaster T, Hudkins KL, Mack M, Cartron JP, Colin Y, Schlondorff D, Alpers CE. Expression of chemokines and chemokine receptors during human renal transplant rejection. *Am J Kidney Dis* 2001; 37:518-31.

28. Agostini C, Calabrese F, Rea F, Facco M, Tosoni A, Loy M, Binotto G, Valente M, Trentin L, Semenzato G. CXCR3 and its ligand CXCL10 are expressed by inflammatory cells infiltrating lung allografts and mediate chemotaxis of T cells at sites of rejection. *Am J Pathol* 2001; 158:1703-11.
29. Fahmy NM, Yamani MH, Starling RC, Ratliff NB, Young JB, McCarthy PM, Feng J, Novick AC, Fairchild RL. Chemokine and chemokine receptor gene expression indicates acute rejection of human cardiac transplants. *Transplantation* 2003;75:72-8.
30. Kao J, Kobashigawa J, Fishbein MC, MacLellan WR, Burdick MD, Belperio JA, Strieter RM. Elevated serum levels of the CXCR3 chemokine ITAC are associated with the development of transplant coronary artery disease. *Circulation* 2003; 107:1958-61.
31. Lazzeri E, Rotondi M, Mazzinghi B, Lasagni L, Buonamano A, Rosati A, Pradella F, Fossombroni V, La Villa G, Gacci M, Bertoni E, Serio M, Salvadori M, Romagnani P. 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.
32. Anders HJ, Vielhauer V, Schlondorff D. Chemokines and chemokine receptors are involved in the resolution or progression of renal disease. *Kidney Int* 2003; 63:401-15.
33. 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.
34. Kobashigawa JA, Patel JK. Immunosuppression for heart transplantation: where are we now? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006; 3:203-12.
35. Lindenfeld J, Miller GG, Shakar SF, Zolty R, Lowes BD, Wolfel EE, Mestroni L, Page RL II, Kobashigawa J. Drug therapy in the heart transplant recipient: part II: immunosuppressive drugs. *Circulation* 2004; 110:3858-65.

36. Marcén R. Immunosuppressive drugs in kidney transplantation: impact on patient survival, and incidence of cardiovascular disease, malignancy and infection. *Drugs* 2009; 69:2227-43.
37. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant* 2004; 4:378-83.
38. Patel J, Kobashigawa JA. Minimization of immunosuppression: transplant immunology. *Transpl Immunol* 2008; 20:48-54.
39. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289:F8-28.
40. Pinette KV, Yee YK, Amegadzie BY, Nagpal S. Vitamin D receptor as a drug discovery target. *Mini Rev Med Chem* 2003; 3:193-204.
41. Liu SM, Koszewski N, Lupez M, Malluche HH, Olivera A, Russell J. Characterization of a response element in the 5'-flanking region of the avian (chicken) PTH gene that mediates negative regulation of gene transcription by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and binds the vitamin D₃ receptor. *Mol Endocrinol* 1996; 10:206-15.
42. Takeuchi A, Reddy GS, Kobayashi T, Okano T, Park J, Sharma S 1998 Nuclear factor of activated T cells (NFAT) as a molecular target for 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃-mediated effects. *J Immunol* 160:209-18.
43. Harant H, Andrew PJ, Reddy GS, Foglar E, Lindley IJ 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and a variety of its natural metabolites transcriptionally repress nuclear-factor-kB-mediated interleukin-8 gene expression. *Eur J Biochem* 1997; 250:63-71.
44. Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev* 2005; 26:662-87.

45. van Etten E, Mathieu C. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃: basic concepts. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 97:93-101.
46. Erben RG, Soegiarto DW, Weber K, Zeitz U, Lieberherr M, Gniadecki R, Moller G, Adamski J, and Balling R. Deletion of deoxyribonucleic acid binding domain of the vitamin D receptor abrogates genomic and nongenomic functions of vitamin D. *Mol Endocrinol* 2002; 16:1524-37.
47. Zanello LP, Norman AW. Rapid modulation of osteoblast ion channel responses by 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃ requires the presence of a functional vitamin D nuclear receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 101:1589-94.
48. Penna G, Adorini L. 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol* 2000; 164:2405-11.
49. Adorini L, Penna G, Giarratana N, Roncari A, Amuchastegui S, Daniel KC, Uskokovic M. Dendritic cells as key targets for immunomodulation by Vitamin D receptor ligands. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 89-90:437-41.
50. Gregori S, Casorati M, Amuchastegui S, Smiroldo S, Davalli AM, Adorini L. Regulatory T cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *J Immunol* 2001; 167:1945-53.
51. Griffin MD, Lutz W, Phan VA, Bachman LA, McKean DJ, Kumar R. Dendritic cell modulation by 1alpha,25 dihydroxyvitamin D₃ and its analogs: a vitamin D receptor-dependent pathway that promotes a persistent state of immaturity in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:6800-5.

52. Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS, Yuan J, Colovai AI, Piazza F, Lederman S, Colonna M, Cortesini R, Dalla-Favera R, Suci-Foca N. Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol* 2002; 3:237.
53. Hackstein H, Thomson AW. Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:24-34.
54. Adorini L, Amuchastegui S, Corsiero E, Laverny G, Le Meur T, Penna G. Vitamin D receptor agonists as anti-inflammatory agents. *Expert Rev Clin Immunol* 2007; 3:477-89.
55. Mahon BD, Wittke A, Weaver V, Cantorna MT. The targets of vitamin D depend on the differentiation and activation status of CD4 positive T cells. *J Cell Biochem* 2003; 89:922.
56. Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HF, O'Garra A. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol* 2001; 167:4974-80.
57. Penna G, Amuchastegui S, Cossetti C, Aquilano F, Mariani R, Sanvito F, Doglioni C, Adorini L. Treatment of experimental autoimmune prostatitis in nonobese diabetic mice by the vitamin D receptor agonist elocalcitol. *J Immunol* 2006; 77:8504-11.
58. Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 2007;13:139-45.
59. Redaelli CA, Wagner M, Tien YH, Mazzucchelli L, Stahel PF, Schilling MK, Dufour JF, 1alpha,25-Dihydroxycholecalciferol reduces rejection and improves survival in rat liver allografts. *Hepatology* 2001; 34:926-34.
60. Tanghetti EA. The role of topical vitamin D modulators in psoriasis therapy. *J Drugs Dermatol* 2009; 8:s4-8.
61. Slatopolsky E, Brown AJ. Vitamin D analogs for the treatment of secondary hyperparathyroidism. *Blood Purif* 2002; 20:109-12.

62. Richy F, Ethgen O, Bruyere O, Reginster JY. Efficacy of alphacalcidol and calcitriol in primary and corticosteroid-induced osteoporosis: a meta-analysis of their effects on bone mineral density and fracture rate. *Osteoporos Int* 2004; 15:301-10.
63. Oades GM, Dredge K, Kirby RS, Colston KW. Vitamin D receptor-dependent antitumour effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and two synthetic analogues in three in vivo models of prostate cancer. *BJU Int* 2002; 90:607-16.
64. Adorini L, Penna G. Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008; 4:404-12.
65. Crescioli C, Ferruzzi P, Caporali A, Scaltriti M, Bettuzzi S, Mancina R, Gelmini S, Serio M, Villari D, Vannelli GB, Colli E, Adorini L, Maggi M. Inhibition of prostate cell growth by BXL-628, a calcitriol analogue selected for a phase II clinical trial in patients with benign prostate hyperplasia. *Eur J Endocrinol* 2004; 150:591-603.
66. Adorini L, Amuchastegui S, Daniel KC. Prevention of chronic allograft rejection by Vitamin D receptor agonists. *Immunology Letters* 2005; 100:34-41.
67. Bouillon R, Verlinden L, Eelen G, De Clercq P, Vandewalle M, Mathieu C, Verstuyf A. Mechanisms for the selective action of Vitamin D analogs. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 97:21-30.
68. Adorini L. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 analogs as potential therapies in transplantation. *Curr Opin Investig Drugs* 2002; 3:1458-63.
69. Becker BN, Hullett DA, O'Herrin JK, Malin G, Sollinger HW, DeLuca H. Vitamin D as immunomodulatory therapy for kidney transplantation. *Transplantation* 2002; 74:1204-6.
70. Lemire JM, Ince A, Takashima M. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 attenuates the expression of experimental murine lupus of MRL/l mice. *Autoimmunity* 1992; 12:143-8.

71. Hullett DA, Cantorna MT, Redaelli C, Humpal-Winter J, Hayes CE, Sollinger HW, Deluca HF. Prolongation of allograft survival by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Transplantation* 1998; 66:824-8.
72. van Etten E, Gysemans C, Verstuyf A, Bouillon R, Mathieu C. Immunomodulatory properties of a 1,25-dihydroxyvitamin D₃ analogue combined with IFN β in an animal model of syngeneic islet transplantation. *Transplant Proc* 2001; 33:2319.
73. Johnsson C, Tufveson G. MC 1288 - a vitamin D analogue with immunosuppressive effects on heart and small bowel grafts. *Transpl Int* 1994; 7:392-7.
74. Bertolini DL, Araujo PRB, Silva RNC, Duarte AJSD, Tzanno-Martins CB. Immunomodulatory effects of vitamin D analog KH1060 on an experimental skin transplantation model. *Transplant Proc* 1999; 31:2998-9.
75. Aschenbrenner, Hullett JD, Heisey D, Pirsch J, Sollinger H, Becker B. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) has salutary effects on renal allograft function. *Transplantation* 2000; 69:S448.
76. Teng M, Wolf M, Ofsthun MN, et al. Activated injectable vitamin D and hemodialysis survival: a historical cohort study. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:1115.
77. Agarwal R, Acharya M, Tian J, et al. Antiproteinuric effect of oral paricalcitol in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2005; 68:2823.
78. Teng M, Wolf M, Lowrie E, et al. Survival of patients undergoing hemodialysis with paricalcitol or calcitriol therapy. *N Engl J Med* 2003; 349:446.
79. Wolf M, Thadhani R. Vitamin D in patients with renal failure: a summary of observational mortality studies and steps moving forward. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 103:487.
80. Shoben AB, Rudser KD, de Boer IH, et al. Association of oral calcitriol with improved survival in nondialyzed CKD. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19:1613.

81. Coen G. Vitamin D: an old prohormone with an emergent role in chronic kidney disease. *J Nephrol* 2008; 21:313.
82. Tan X, Li Y, Liu Y. Paricalcitol attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17:3382.
83. Tan X, He W, Liu Y. Combination therapy with paricalcitol and trandolapril reduces renal fibrosis in obstructive nephropathy. *Kidney Int* 2009; 76:1248.
84. Zhang Z, Zhang Y, Ning G, et al. Combination therapy with AT1 blocker and vitamin D analog markedly ameliorates diabetic nephropathy: blockade of compensatory renin increase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:15896.
85. Tan X, Wen X, Liu Y. Paricalcitol inhibits renal inflammation by promoting vitamin D receptor-mediated sequestration of NF- κ B signaling. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19:1741.
86. Li YC, Kong J, Wei M, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest* 2002; 110:229.
87. Porsti IH. Expanding targets of vitamin D receptor activation: downregulation of several RAS components in the kidney. *Kidney Int* 2008; 74:1371.
88. Klaus G. Renoprotection with vitamin D: specific for diabetic nephropathy? *Kidney Int* 2008; 73:141.
89. van Etten E, Branisteanu DD, Verstuyf A, Waer M, Bouillon R, Mathieu C. Analogs of 1,25-dihydroxyvitamin D3 as dose-reducing agents for classical immunosuppressants. *Transplantation*. 2000; 69:1932-42.
90. Raisanen-Sokolowski AK, Pakkala IS, Samila SP, Binderup L, Hayry PJ, Pakkala ST. A vitamin D analog, MC1288, inhibits adventitial inflammation and suppresses intimal lesions in rat aortic allografts. *Transplantation* 1997; 63:936-41.

91. Maggi M, Crescioli C, Morelli A, Colli E, Adorini L. Pre-clinical evidence and clinical translation of benign prostatic hyperplasia treatment by the vitamin D receptor agonist BXL-628 (Elocalcitol). *J Endocrinol Invest* 2006; 29:665-74.
92. Crescioli C, Ferruzzi P, Caporali A, Scaltriti M, Bettuzzi S, Mancina R, Gelmini S, Serio M, Villari D, Vannelli GB, Colli E, Adorini L, Maggi M. Inhibition of prostate cell growth by BXL-628, a calcitriol analogue selected for a phase II clinical trial in patients with benign prostate hyperplasia. *Eur J Endocrinol* 2004; 150:591-603.
93. Colli E, Rigatti P, Montorsi F, Artibani W, Petta S, Mondaini N, Scarpa R, Usai P, Olivieri L, Maggi M. BPH Italian study group. BXL628, a novel vitamin D3 analog arrests prostate growth in patients with benign prostatic hyperplasia: a randomized clinical trial. *Eur Urol* 2006; 49:82-6.
94. Adorini L, Penna G, Amuchastegui S, Cossetti C, Aquilano F, Mariani R, Fibbi B, Morelli A, Uskokovic M, Colli E, Maggi M. Inhibition of prostate growth and inflammation by the vitamin D receptor agonist BXL-628 (eocalcitol). *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 103: 689-93.
95. Borgogni E, Sarchielli E, Sottili M, et al. Elocalcitol inhibits inflammatory responses in human thyroid cells and T cells. *Endocrinology* 2008; 149:3626-34.
96. Amuchastegui S, Daniel KC, Adorini L. Inhibition of acute and chronic allograft rejection in mouse models by BXL-628, a nonhypercalcemic vitamin D receptor agonist. *Transplantation* 2005; 80:81-7.
97. Gregori G, Giarratana N, Smiroldo S, Uskokovic M, Adorini L. A $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3 analog enhances regulatory T cells and arrests autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* 2002; 51:1367.

98. Uskokovic MR, Norman AW, Manchand PS, et al. Highly active analogs of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3) that resist metabolism through C-24 oxidation and C-3 epimerization pathways. *Steroids* 2001; 66:463.
99. Fichera A, Little N, Dougherty U, et al. A vitamin D analogue inhibits colonic carcinogenesis in the AOM/DSS model. *J Surg Res* 2007; 142:239.
100. Mehra MR, Uber PA, Uber WE, et al. Anything but a biopsy: Noninvasive monitoring for cardiac allograft rejection. *Curr Opin Cardiol* 2002; 17:131.
101. Lee I, Wang L, Wells AD, et al. Recruitment of Foxp3⁺ T regulatory cells mediating allograft tolerance depends on the CCR4 chemokine receptor. *J Exp Med* 2005; 201:1037.
102. Bonecchi R, Sozzani S, Stine JT, et al. Divergent effects of interleukin-4 and interferon-gamma on macrophage-derived chemokine production: An amplification circuit of polarized T helper 2 responses. *Blood* 1998; 92:2668.
103. Galli G, Chantry D, Annunziato F, et al. Macrophage-derived chemokine production by activated human T cells in vitro and in vivo: Preferential association with the production of type 2 cytokines. *Eur J Immunol* 2000; 30:204.
104. Rotondi M, Lazzeri E, Romagnani P, et al. Role for interferon-gamma inducible chemokines in endocrine autoimmunity: An expanding field. *J Endocrinol Invest* 2003; 26:177.
105. El-Sawy T, Fahmy NM, Fairchild RL. Chemokines: directing leukocyte infiltration into allografts. *Curr Opin Immunol* 2002;14:562-8.
106. Klingenberg R, Autschbach F, Gleissner C, Giese T, Wambsganss N, Sommer N, Richter G, Katus HA, Dengler TJ. Endothelial inducible costimulator ligand expression is increased during human cardiac allograft rejection and regulates endothelial cell-dependent allo-activation of CD8⁺ T cells in vitro. *Eur J Immunol* 2005; 35:1712-21.
107. Balfour JA, Plosker GL. Rosiglitazone. *Drugs* 1999; 57:921-930.

108. Villanueva G, Baldwin D. Rosiglitazone therapy of posttransplant diabetes mellitus. *Transplantation* 2005; 80:1402-5.
109. Marx N, Mach F, Sauty A, Leung JH, Sarafi MN, Ransohoff RM, Libby P, Plutzky J, Luster AD. Peroxisome proliferator-activated receptor- activators inhibit IFN γ -induced expression of the T cell-active CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC in human endothelial cells. *J Immunol* 2000; 164:6503-8.
110. Stewart S, Winters GL, Fishbein MC, et al. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. *J Heart Lung Transplant* 2005; 24:1710.
111. Maggi L, Santarlaschi V, Liotta F, Frosali F, Angeli R, Cosmi L, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Demonstration of circulating allergen-specific CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ Tregulatory cells in both nonatopic and atopic individuals. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:429-36.
112. Benvenuti S, Saccardi R, Luciani P, Urbani S, Deledda C, Cellai I, Francini F, Squecco R, Rosati F, Danza G, Gelmini S, Greeve I, Rossi M, Maggi R, Serio M, Peri A. Neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells: changes in the expression of the Alzheimer's disease-related gene seladin-1. *Exp Cell Res* 2006; 312:2592-604.
113. Formigli L, Francini F, Tani A, Squecco R, Nosi D, Polidori L, Nistri S, Chiappini L, Cesati V, Pacini A, Perna AM, Orlandini GE, Zecchi-Orlandini S, Bani D. Morphofunctional integration between skeletal myoblasts and adult cardiomyocytes in coculture is favored by direct cell-cell contacts and relaxin treatment. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288:795-804.
114. Crescioli C, Cosmi L, Borgogni E, Santarlaschi V, Gelmini S, Sottili M, Sarchielli E, Mazzinghi B, Francalanci M, Pezzatini A, Perigli G, Vannelli GB, Annunziato F, Serio M.

- Methimazole inhibits CXC chemokine ligand 10 secretion in human thyrocytes. *J Endocrinol* 2007; 195:145-55.
115. Livak K, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 2001; 25:402-8.
 116. Vannelli GB, Ensoli F, Zonefrati R, Kubota Y, Arcangeli A, Becchetti A, Camici G, Barni T, Thiele CJ, Balboni GC. Neuroblast long-term cell cultures from human fetal olfactory epithelium respond to odors. *J Neurosci* 1995; 15:4382-94.
 117. Cosmi L, Annunziato F, Iwasaki M, Galli G, Manetti R, Maggi E, Nagata K, Romagnani S. CRTH2 is the most reliable marker for detection of human circulating Th2 and Tc2 cells in health and disease. *Eur J Immunol* 2000; 30:2972-9.
 118. Romagnani P, Annunziato F, Liotta F, Lazzeri E, Mazzinghi B, Frosali F, Cosmi L, Maggi L, Lasagni L, Scheffold A, Kruger M, Dimmeler S, Marra F, Gensini G, Maggi E, Romagnani S. CD14⁺CD34^{low} cells with stem cell phenotypic and functional features are the major source of circulating endothelial progenitors. *Circ Res* 2005; 97:314-22.
 119. De Lean A, Munson PJ, Rodbard D. Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves. *Am J Physiol* 1978; 235:E97-102.
 120. Sartiani L, Bettiol E, Stillitano F, Mugelli A, Cerbai E, Jaconi ME. Developmental changes in cardiomyocytes differentiated from human embryonic stem cells: a molecular and electrophysiological approach. *Stem Cells* 2007; 25:1136-44.
 121. Apkon M, Nerbonne JM. Characterization of two distinct depolarization-activated K⁺ currents in isolated adult rat ventricular myocytes. *J Gen Physiol* 1991; 97:973-1011.

122. Heubach JF, Graf EM, Leutheuser J, Bock M, Balana B, Zahanich I, Christ T, Boxberger S, Wettwer E, Ravens U. Electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells. *J Physiol* 2004; 554:659-72.
123. Guo W, Kamiya K, Toyama J. Modulated expression of transient outward current in cultured neonatal rat ventricular myocytes: comparison with development in situ. *Cardiovasc Res* 1996; 32:524-33.
124. Antonelli A, Rotondi M, Ferrari SM, Fallahi P, Romagnani P, Franceschini SS, Serio M, Ferrannini E. Interferon-gamma-inducible alpha-chemokine CXCL10 involvement in Graves' ophthalmopathy: modulation by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:614-20.
125. Rotondi M, Falorni A, De Bellis A, Laureti S, Ferruzzi P, Romagnani P, Buonamano A, Lazzeri E, Crescioli C, Mannelli M, Santeusano F, Bellastella A, Serio M. Elevated serum interferon-gamma-inducible chemokine-10/CXC chemokine ligand-10 in autoimmune primary adrenal insufficiency and in vitro expression in human adrenal cells primary cultures after stimulation with proinflammatory cytokines. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:2357.
126. Stoica SC, Atkinson C, Satchithananda DK, et al. Endothelial activation in the transplanted human heart from organ retrieval to 3 months after transplantation: An observational study. *J Heart Lung Transplant* 2005; 24:593.
127. Hamour IM, Burke MM, Bell AD, et al. Limited utility of endomyocardial biopsy in the first year after heart transplantation. *Transplantation* 2008; 85:969.
128. Arora S, Gullestad L, Wergeland R, et al. Probrain natriuretic peptide and C-reactive protein as markers of acute rejection, allograft vasculopathy, and mortality in heart transplantation. *Transplantation* 2007; 83:1308.

129. Stepkowski SM. Immunobiology of allograft rejection. In: Kahan BD, Ponticelli C, eds. Principles and practice in renal transplantation. London: Martin Dunitz Ltd 2000, pp. 41.
130. Haskova Z, Izawa A, Contreras AG, et al. Organ-specific differences in the function of MCP-1 and CXCR3 during cardiac and skin allograft rejection. *Transplantation* 2007; 83:1595.
131. Nath KA. Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage. *Am J Kidney Dis* 1992; 20:1.
132. Lee SK, Goyal M, de Miguel M, et al. Renal biopsy collagen I mRNA predicts scarring in rabbit anti-GBM disease: comparison with conventional measures. *Kidney Int* 1997; 52:1000.
133. Campbell JD, Gangur V, Simons FE, et al. Allergic humans are hyporesponsive to a CXCR3 ligand-mediated Th1 immunity-promoting loop. *FASEB J* 2004; 18:329.
134. Wang X, Yue TL, Ohlstein EH, et al. Interferon γ -inducible protein-10 involves vascular smooth muscle cell migration, proliferation, and inflammatory response. *J Biol Chem* 1996; 271:24286.
135. Romagnani P, Beltrame C, Annunziato F, et al. Role for interactions between IP-10/Mig and their receptor (CXCR3) in proliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:2518.
136. 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.
137. Bonacchi A, Romagnani P, Romanelli RG, et al. Signal transduction by the chemokine receptor CXCR3: Activation of Ras/ERK, Src, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt

- controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes. *J Biol Chem* 2001; 276:9945.
138. 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.
 139. Romagnani P, Lasagni L, Annunziato F, et al. CXC chemokines the regulatory link between inflammation and angiogenesis. *Trends Immunol* 2004; 25:201.
 140. Karason K, Jernas M, Hagg DA, et al. Evaluation of CXCL9 and CXCL10 as circulating biomarkers of human cardiac allograft rejection. *BMC Cardiovasc Disord* 2006; 6:29.
 141. Varagunam M, Finney H, Trevitt R, et al. Pretransplantation levels of C-reactive protein predict all-cause and cardiovascular mortality, but not graft outcome, in kidney transplant recipients. *Am J Kidney Dis* 2004; 43:502.
 142. Fishman JA, Rubin RH. Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 1998; 338:1741.
 143. Fishman JA, Emery V, Freeman R, et al. Cytomegalovirus in transplantation-Challenging the status quo. *Clin Transplant* 2007; 21:149.
 144. Kalil AC, Levitsky J, Lyden E, et al. Meta-analysis: The efficacy of strategies to prevent organ disease by cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. *Ann Intern Med* 2005; 143:870.
 145. Pescovitz MD. Benefits of cytomegalovirus prophylaxis in solid organ transplantation. *Transplantation* 2006; 82:S4.
 146. Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev* 2005; 85:1373-416.

147. Vogel G. Cell biology. Stem cells: new excitement, persistent questions. *Science* 2000; 290:1672-4.
148. Davidson MM, Nesti C, Palenzuela L, Walker WF, Hernandez E, Protas L, Hirano M, Isaac ND. Novel cell lines derived from adult human ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 39:133-47.
149. Wang YC, Neckelmann N, Mayne A, Herskowitz A, Srinivasan A, Sell KW, Ahmed-Ansari A. Establishment of a human fetal cardiac myocyte cell line. *In Vitro Cell Dev Biol* 1991; 27:63-74.
150. Li R, Mickle D, Weisel R, Carson S, Omar S, Tumiati LC, Wilson GJ, Williams WG. Human pediatric and adult ventricular cardiomyocytes in culture: assessment of phenotypic changes with passaging. *Cardiovasc Res* 1996; 32:362-73.
151. Ball AJ, Levine F. Telomere-independent cellular senescence in human fetal cardiomyocytes. *Aging Cell* 2005; 4:21-30.
152. Patterson MJ, Kloner RA. Flow cytometric analysis of S-phase DNA content in human fetal myocardium. *Card Vasc Regeneration* 2000; 1:92-6.
153. Reffelmann T, Leor J, Muller-Ehmsen J, Kedes L, Kloner RA. Cardiomyocyte transplantation into the failing heart: new therapeutic approach for heart failure? *Heart Fail Rev* 2003; 8:201-11.
154. Dowell JD, Rubart M, Pasumarthi KB, Soonpaa MH, Field LJ. Myocyte and myogenic stem cell transplantation in the heart. *Cardiovasc Res* 2003; 58:336-50.
155. Rubart M, Pasumarthi KB, Nakajima H, Soonpaa MH, Nakajima HO, Field LJ. Physiological coupling of donor and host cardiomyocytes after cellular transplantation. *Circ Res* 2003; 92:1217-24.
156. Harvey RP. Patterning the vertebrate heart. *Nat Rev Genet* 2002; 3:544-56.

157. Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, Lin LZ, Cai CL, Lu MM, Reth M, Platoshyn O, Yuan JX, Evans S, Chien KR. Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 2005; 433:647-53.
158. Anversa P, Kajstura J, Leri A, Bolli R. Life and death of cardiac stem cells: a paradigm shift in cardiac biology. *Circulation* 2006; 113:1451-63.
159. Hirschy A, Schatzmann F, Ehler E, Perriard JC. Establishment of cardiac cytoarchitecture in the developing mouse heart. *Dev Biol* 2006; 289:430-41.
160. Krakauer T, Oppenheim JJ. IL-1 and tumor necrosis factor- α each up-regulate both the expression of IFN- γ receptors and enhance IFN- γ -induced HLA-DR expression on human monocytes and a human monocytic cell line (THP-1). *J Immunol* 1993; 150:1205-11.
161. Schmidt-Lucke C, Aicher A, Romagnani P, Gareis B, Romagnani S, Zeiher AM, Dimmeler S. Specific recruitment of CD4⁺CD25⁺⁺ regulatory T cells into the allograft in heart transplant recipients. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292:H2425-31.
162. Dekel B, Reisner Y. Embryonic committed stem cells as a solution to kidney donor shortage. *Expert Opin Biol Ther* 2004; 4:443-54.
163. Foglia RP, DiPreta J, Statter MB, Donahoe PK. Fetal allograft survival in immunocompetent recipients is age dependent and organ specific. *Ann Surg* 1986; 204:402-10.
164. Kobashigawa JA, Tobis JM, Mentzer RM, Valentine HA, Bourge RC, Mehra MR, Smart FW, Miller LW, Tanaka K, Li H, Gjertson DW, Gordon RD. Mycophenolate mofetil reduces intimal thickness by intravascular ultrasound after heart transplant: reanalysis of the multicenter trial. *Am J Transplant* 2006; 6:993-7.
165. Adorini L, Penna G. Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008; 4:404-12.

166. Johnsson C, Binderup L, Tufveson G. The effects of combined treatment with the novel vitamin D analogue MC 1288 and cyclosporine A on cardiac allograft survival. *Transpl Immunol* 1995; 3:245-50.
167. Smith EA, Frankenburg EP, Goldstein SA, Koshizuka K, Elstner E, Said J, Kubota T, Uskokovic M, Koeffler HP. Effects of long-term administration of vitamin D3 analogs to mice. *J Endocrinol* 2000; 165:163-72.
168. Kuhlmann A, Haas CS, Gross ML, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 decreases podocyte loss and podocyte hypertrophy in the subtotaly nephrectomized rat. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286:F526.
169. Freundlich M, Quiroz Y, Zhang Z, et al. Suppression of renin-angiotensin gene expression in the kidney by paricalcitol. *Kidney Int* 2008; 74:1394.
170. Mizobuchi M, Morrissey J, Finch JL, et al. Combination therapy with an angiotensin-converting enzyme inhibitor and a vitamin D analog suppresses the progression of renal insufficiency in uremic rats. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18:1796.
171. Mathieu C, Adorini L. The coming of age of 1,25-dihydroxyvitamin D3 analogs as immunomodulatory agents. *Trends Mol Med* 2002; 4:174.
172. Adorini L, Giarratana N, Penna G. Pharmacological induction of tolerogenic dendritic cells and regulatory cells. *Semin Immunol* 2004; 16:127.
173. Giarratana N, Penna G, Amuchastegui S, Mariani R, Daniel KC, Adorini L. A vitamin D analog down-regulates proinflammatory chemokine production by pancreatic islets inhibiting T cell recruitment and type 1 diabetes development. *J Immunol* 2004; 173:2280.
174. Griffin MD, Xing N, Kumar R. Vitamin D and its analogs as regulators of immune activation and antigen presentation. *Annu Rev Nutr* 2003; 23:117.

175. Tamada S, Asai T, Kuwabara N, et al. Molecular mechanisms and therapeutic strategies of chronic renal injury: the role of Nuclear Factor kB activation in the development of renal fibrosis. *J Pharmacol Sci* 2006; 100:17.
176. Tashiro K, Tamada S, Kuwabara N, et al. Attenuation of renal fibrosis by proteasome inhibition in rat obstructive nephropathy: possible role of nuclear factor kappaB. *Int J Mol Med* 2003; 12:587.
177. Marchiani S, Bonaccorsi L, Ferruzzi P, et al. The vitamin D analogue BXL-628 inhibits growth factor-stimulated proliferation and invasion of DU145 prostate cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006; 132:408.
178. Du S, Hiramatsu N, Hayakawa K, et al. Suppression of NF-kB by cyclosporin A and tacrolimus (FK506) via induction of the C/EBP family: implication for unfolded protein response. *J Immunol* 2009; 182:7201.
179. Lillevang ST, Rosenkvist J, Andersen CB, Larsen S, Kemp E, Kristensen T. Single and combined effects of the vitamin D analogue KH1060 and cyclosporin A on mercuric chloride-induced autoimmune disease in the BN rat. *Clin Exp Immunol* 1992; 88:301.
180. Moutabarrak A, Ishibashi M, Kameoka H, et al. In vitro FK506 kidney tubular cell toxicity. *Transpl Int* 1992; 5:S87.
181. Ysebaert DK, De Greef KE, Vercauteren SR, et al. Effect of immunosuppression on damage, leukocyte infiltration, and regeneration after severe warm ischemia/reperfusion renal injury. *Kidney Int* 2003; 64:864.
182. Khanna AK, Xu J, Baquet C, Mehra MR. Adverse effects of nicotine and immunosuppression on proximal tubular epithelial cell viability. Tissue repair and oxidative stress gene expression. *J Heart Lung Transplant* 2009; 28:612.

183. Kumar MSA, Saeed MI, Ranganna K, et al. Comparison of four different immunosuppression protocols without long-term steroid therapy in kidney recipients monitored by surveillance biopsy: five-year outcomes. *Transpl Immunol* 2008; 20:32.
184. Chapman J. Addressing the challenges for improving longterm outcomes in renal transplantation. *Transplant Proc* 2008; 40:S2.
185. Gallon L, Perico N, Dimitrov BD, et al. Long-term renal allograft function on a tacrolimus-based, pred-free maintenance immunosuppression comparing sirolimus vs. MMF. *Am J Transplant* 2006; 6:1617.
186. Bitetto D, Fabris C, Falletti E, et al. Vitamin D and the risk of acute allograft rejection following human liver transplantation. *Liver Int* 2010; 30:417.