

Giannotta G. [1] e Giannotta N. [2]

[1] Pediatra di Base, azienda sanitaria provinciale di Vibo Valentia, Italia

[2] Università Magna Grecia, scienze mediche e chirurgiche, Catanzaro, Italia

Background: Le reazioni avverse post-vaccinazione (AEs) sono un motivo di forte dibattito tra gli scienziati. Sfortunatamente, spesso commettiamo l'errore di discutere solo dell'epidemiologia, ma non della biologia molecolare. Il meccanismo di azione dei vaccini non è ancora completamente noto, nonostante il fatto che gli adiuvanti a base di alluminio siano stati usati per circa 100 anni.

Ipotesi: Abbiamo ipotizzato un legame tra vaccinazioni e neuro-infiammazione. Le citochine pro-infiammatorie periferiche (IL-1 β , IL-6 e TNF- α), espresse dopo l'iniezione dei vaccini, possono raggiungere il cervello e causare neuro-infiammazione dopo l'attivazione della microglia. Elevati livelli di citochine pro-infiammatorie, in particolare del TNF- α , sono stati descritti in studi riguardanti il profilo delle citochine nei bambini autistici. La IL-1 β è una citochina che controlla la cascata pro-infiammatoria locale e quindi influenza l'equilibrio tra immunità protettiva e infiammazione distruttiva. Un sottogruppo di bambini con ASD (Disturbo dello Spettro Autistico) ha sviluppato neuro-infiammazione. Diversi studi post mortem hanno confermato l'attivazione della microglia e la neuro-infiammazione. Un recente studio ha dimostrato la presenza di alluminio nel cervello di individui con autismo e questo alluminio è stato trovato anche nelle cellule della microglia. L'alluminio proveniente dai vaccini viene ridistribuito a numerosi organi, compreso il cervello, dove si accumula. Ogni vaccino aggiunge a questo tessuto un diverso livello di alluminio. L'alluminio, come il mercurio, attiva la microglia causando infiammazione cronica del cervello e neurotossicità.

Conclusioni: il meccanismo molecolare qui presentato dimostra come le citochine periferiche, espresse dopo le vaccinazioni, possano causare neuro-infiammazione in alcuni soggetti, dopo aver attivato la microglia, e ciò in dipendenza del proprio background immunogenetico e della memoria immunitaria innata.

Parole chiave: Neuroinfiammazione; Vaccini; Attivazione Microglia; ASD (Disturbo Spettro Autistico); HPV vaccino AEs; Memoria Immunitaria Innata; Vaccini e Alluminio; Citochine Periferiche.

Introduzione

I vaccini sono un importante strumento di politica sanitaria e hanno cambiato la storia delle malattie infettive. Negli ultimi anni, il numero di vaccini iniettati ai bambini è aumentato e molte dosi vengono somministrate durante il primo anno di vita, quando il sistema immunitario ed il sistema nervoso centrale non hanno ancora completato il loro sviluppo. Inoltre, l'efficacia del programma vaccinale è influenzato dalla possibile presenza di anticorpi materni nel bambino, e dal grado di inquinamento chimico ambientale. Alcuni vaccini contengono l'antigene specifico associato con alluminio, come *Infrarix-Hexa* (vaccino combinato difterite-tetano pertosse acellulare, epatite B, vaccino inattivato Poliovirus e *Haemophilus influenzae* tipo b), MenC (vaccino coniugato contro meningococco C) MenB (Vaccini contro meningococco sierogruppo B) e vaccino anti-pneumococcico coniugato (*Prevenar*). L'alluminio svolge il compito essenziale di attivare il sistema immunitario innato. Altri vaccini contengono virus vivi, come MMR (morbillo, parotite, rosolia) e MMRV (morbillo, parotite, rosolia e varicella) e non contengono alluminio. Ogni iniezione di vaccino, indipendentemente dal tipo di vaccino, è seguita dalla produzione di quantità variabili di citochine pro-infiammatorie, che esercitano sia effetti locali che a distanza dal sito di produzione.

Gli eventi avversi post-vaccinazione (AE) sono un motivo di forte dibattito tra gli scienziati. Sfortunatamente, spesso commettiamo l'errore di discutere solo dell'epidemiologia, ma non della biologia molecolare dei vaccini. Il meccanismo di azione dei vaccini non è ancora completamente noto, nonostante il fatto che gli adiuvanti a base di alluminio siano stati usati per circa 100 anni.

Poiché le citochine periferiche, prodotte dopo l'iniezione dei vaccini, sono in grado di raggiungere il sistema nervoso centrale, noi ipotizziamo che queste citochine possano avere effetti sulla microglia (macrofagi del sistema nervoso centrale) e che questi effetti possano essere facilitati da vaccinazioni ripetute ai bambini durante il primo anno di vita. In questo articolo, abbiamo studiato la biologia molecolare dei vaccini e presentato i meccanismi putativi che collegano l'iniezione di vaccini alla neuro-infiammazione, che può verificarsi come effetto dell'attivazione microgliale e il suo successivo orientamento in senso pro-infiammatorio (M1)

Alluminio

Poiché equiparare l'alluminio introdotto nel corpo con cibo e acqua (essenzialmente extracellulare) a quello iniettato con i vaccini (esclusivamente intracellulare) non è una questione di scienza (a causa della totale diversità di cinetica e biodinamica), le stime dello studio di Mitkus et al. [1] non sono coerenti con lo studio significativo di Priest [2] e con gli altri citati in questo documento. Infatti, Mitkus et al. [1] affermano che il quantitativo dell'alluminio accumulato nell'organismo derivante dai vaccini e dalla dieta, durante il primo anno di vita del bambino, è significativamente inferiore al corrispondente livello di sicurezza del carico di alluminio calcolato utilizzando l'LMR di regolamentazione. Gli autori concludono affermando che: "L'esposizione episodica ai vaccini contenenti adiuvante a base di alluminio continua a rappresentare un rischio estremamente basso per i bambini e i benefici dell'uso di vaccini contenenti adiuvante in alluminio superano qualsiasi preoccupazione teorica".

Sfortunatamente, molti studi pubblicati sull'ipotetica sicurezza dell'alluminio iniettato con vaccini non sono conclusivi e non ci sono studi randomizzati controllati (RCT) sulla sicurezza dell'alluminio iniettato con vaccini. Non sono stati osservati cambiamenti significativi nei livelli di alluminio urinario o sierico dopo la vaccinazione di neonati pretermine con vaccini contenenti un totale di 1200 µg di alluminio [3]. Anche questo studio conferma che l'alluminio iniettato con i vaccini non si trova nel siero dei soggetti vaccinati, ma non dimostra che l'alluminio del vaccino sia sicuro. Mateusz et al. [4] hanno dimostrato che il livello di alluminio nel sangue e nei capelli dei bambini variava considerevolmente, ma ciò non era correlato con la loro storia di immunizzazione. L'alluminio iniettato con i vaccini non può essere correlato con quello del sangue e/o dei capelli perché non è libero nel sangue, come ripetutamente affermato in questo articolo.

Nel 2018, è già abbastanza chiaro che l'alluminio iniettato con i vaccini non può essere misurato nel siero perché si trova solo nelle cellule della linea monocito/macrofagica. Inoltre, l'iniezione intramuscolare di vaccini contenente allume nei topi è stata associata alla comparsa di depositi di alluminio in organi distanti, come milza e cervello, dove sono stati rilevati ancora un anno dopo l'iniezione [5]. I nano-materiali possono essere trasportati dalle cellule della linea monocitica ai linfonodi drenanti, sangue e milza e, analogamente all'HIV, possono usare meccanismi CCL2-dipendenti per penetrare nel cervello. In condizioni normali, questo si verifica a un ritmo molto basso, spiegando così una buona tolleranza generale dell'allume nonostante il suo forte potenziale neurotossico. Tuttavia, le dosi crescenti di questo adiuvante poco biodegradabile nella popolazione possono diventare insidiosamente pericolose, specialmente in caso di immunizzazione eccessiva o di barriera emato-encefalica immatura/alterata o di alta produzione costitutiva di CCL-2 [5]. L'ossidrossido di alluminio (Alhydrogel®) è un composto nano-cristallino che forma aggregati, è stato introdotto nel vaccino per il suo effetto adiuvante immunologico nel 1926. Sebbene sia generalmente ben tollerato a breve termine, è stato sospettato di causare occasionalmente problemi

neurologici ritardati in individui sensibili [6]. Preoccupazioni legate all'uso di particelle di allume sono emerse in seguito al riconoscimento del loro ruolo causativo nella miofascite macrofagica (MMF), lesione rilevata in pazienti con la sindrome detta encefalomielite mialgica/stanchezza cronica (ME/CFS). L'MMF ha rivelato una biopersistenza inattesa a lungo termine di allume all'interno delle cellule immunitarie in individui presumibilmente suscettibili, sottolineando così l'errata convinzione fondamentale della sua bio-degradazione [7].

Per quanto riguarda l'alluminio introdotto con alimenti e acqua, studi disponibili indicano che la biodisponibilità orale dell'alluminio nell'uomo e negli animali da esperimento che deriva dall'introduzione dell'acqua potabile è dell'ordine dello 0,3%, mentre la biodisponibilità dell'alluminio da alimenti e bevande è generalmente considerata inferiore, circa lo 0,1% [8]. Il comitato congiunto di esperti in materia di alimentazione e di agricoltura/Organizzazione mondiale della sanità per additivi alimentari (JECFA) aveva stabilito una dose settimanale tollerabile provvisoria (PTWI) per alluminio di 1 mg/kg di peso corporeo nel 2006 [8]. Cinque anni dopo, il comitato ha rivalutato la sicurezza dell'alluminio e ha proposto un PTWI di 2 mg/kg di peso corporeo nel giugno del 2011. Il PTWI si applica a tutti i composti di alluminio presenti negli alimenti, compresi gli additivi alimentari [9]. In base alla concentrazione massima riportata di alluminio nel latte materno, l'esposizione di neonati allattati esclusivamente al seno può arrivare fino al 6% del PTWI di 2 mg/kg di peso corporeo (2.000 µg/kg di peso corporeo), con la massima esposizione nei consumatori di più alto livello (età 0 -3 mesi). Nei bambini alimentati esclusivamente con formule pronte per il consumo, l'esposizione all'alluminio può essere pari al 4% del PTWI. In quelli alimentati esclusivamente con le formule in polvere, l'esposizione all'alluminio potrebbe arrivare fino all'8, 11 e 21% del PTWI, rispettivamente dal latte di mucca, latte di capra e prodotti a base di soia. Inoltre, l'acqua utilizzata per ricostituire il latte artificiale potrebbe fornire una ulteriore esposizione fino a circa 248 µg/kg di alluminio per settimana (12% del PTWI), con una conseguente esposizione totale che arriverebbe fino al 33% del PTWI.

Il 33% di 2.000 µg/kg di peso corporeo è 660 µg/kg di peso corporeo. Poiché l'assorbimento di alluminio dal cibo è basso, generalmente 0,5% o meno [10], lo 0,5% di 660 µg/kg di peso corporeo è pari a 3,30 µg/kg di peso corporeo a settimana. Dato che in un anno ci sono 52 settimane, la quantità totale di alluminio teoricamente assorbita nel primo anno di vita dovrebbe essere 171.6 µg/kg (52x3,30 µg/kg). Inoltre, supponendo che a un anno di vita il peso di un bambino sia in media di 10 kg, questo bambino dovrebbe aver assorbito in totale 1.716 µg di alluminio (Tabella 1).

Come dimostrano i dati presentati nella Tabella 1, la quantità di alluminio iniettata nel primo anno di vita, per i bambini italiani, è 2.52 volte maggiore, rispetto alla quantità massima assorbita ad un anno dalla dieta [11-13]. Tuttavia, la maggior parte dell'alluminio che entra nel sangue viene escreta nelle urine in pochi giorni o settimane e il tratto gastrointestinale fornisce un'efficace barriera alla captazione dell'alluminio [2], mentre l'alluminio somministrato con i vaccini viene internalizzato dalle cellule della linea monocito/macrofagica, e per questo motivo è intracellulare e non può essere eliminato dal rene.

Tutti gli adiuvanti attivano un gruppo comune di 168 geni e promuovono il reclutamento cellulare con la conseguente presentazione degli antigeni contenuti nel vaccino somministrato. L'allume è capace di regolare l'espressione di 312 geni [14]. Numerosi esperimenti *in vitro* [15] hanno dimostrato che l'allume attiva l'inflammasoma NLRP3 nei macrofagi che, a sua volta, attiva la caspasi-1 e la conseguente produzione di interleuchina- (IL) 1β (IL-1β). Dopo l'attivazione, i membri della famiglia dei Recettori di tipo NOD (NLR), come NLRP3, formano complessi con ASC e pro-caspase-1. Il complesso formato da queste molecole viene chiamato inflammasoma. L'inflammasoma NLRP3 è attivato da numerosi materiali, tra cui l'allume. Qualunque sia la causa dell'attivazione dell'inflammasoma, le conseguenze includono l'attivazione dell'enzima caspasi-1 che, converte delle pro-citochine nelle rispettive forme attive, alcune appartenenti alla famiglia delle

IL-1, tra cui IL-1 β , IL-18 e IL-33 [16].

In breve, i sali di alluminio iniettati con il vaccino sono captati dalle cellule immunitarie innate (specialmente dalle cellule dendritiche), interagiscono con un recettore chiamato NLR (NLRP3), che insieme ad altre proteine si organizzano in un complesso macromolecolare intracellulare che attiva l'enzima caspasi-1. Questo enzima converte la pro-IL-1 β e la pro-IL-18 nelle loro forme attive (IL-1 β e IL-18). Il ruolo della caspasi-1 non è limitato alla sola conversione della pro IL-1 β ad IL-1 β , ma influenza fortemente la secrezione di altre citochine proinfiammatorie: IL-1 β , IL-1 α , IL-6, TNF- α , IL-18 ed IFN- γ . IL-1 è un regolatore primario delle risposte infiammatorie e immunitarie. Come evento conclusivo, una cascata di chinasi porta a modulare un numero di fattori di trascrizione tra cui NF- κ B, AP1 e CREB, ciascuno dei quali regola una pletera di geni trascritti precocemente nel corso della risposta immunitaria che sono molto importanti e centrali nella produzione della risposta infiammatoria post-vaccinale [17]. Pertanto, ogni iniezione di vaccino produce una risposta pro-infiammatoria. Una risposta immunitaria agli antigeni del vaccino (alle quantità attualmente presenti nei vaccini), non è possibile senza una risposta pro-infiammatoria, che è prodotta dagli adiuvanti.

Vaccini	Alluminio	Dosi	Totale
Bexero [11]	500 μ g	3	1,500 μ g
Prevenar 13 [12]	125 μ g	3	375 μ g
Infrarix-Hexa [13]	820 μ g	3	2,460 μ g
Alluminio totale iniettato			4,335 μ g
quantità massima assorbita a un anno	per bambino con 10 kg di peso corporeo		1,716 μ g

Vaccini

Negli Stati Uniti i vaccini hanno drasticamente ridotto la morte infantile e l'invalidità causata da malattie prevenibili [18]. Tuttavia, alcuni vaccini potrebbero non raggiungere l'obiettivo desiderato o potrebbero causare gravi eventi avversi che alterano il bilancio rischio-beneficio spostando l'equilibrio nella direzione del rischio.

Vaccino 4CMenB (Bexero)

Questo vaccino ha due problemi principali: in primo luogo, è fortemente reattogeno; in secondo luogo, fornisce una piccola protezione individuale e collettiva a lungo termine. L'incidenza di eventi avversi gravi acuti potenzialmente correlati al vaccino in soggetti in trattamento con 4CMenB era bassa (5,4 su 1000), ma era significativamente più alta rispetto ai vaccini di routine (1,2 su 1000 individui). L'immunogenicità a lungo termine contro il ceppo NZ98/254 (Bexero) rimane sub-ottimale [19]. Soeters et al. [20] hanno studiato l'impatto di MenB-FHbp sulla trasmissione meningococcica. La prevalenza della trasmissione nel campus è rimasta stabile, suggerendo che MenB-FHbp non riduce rapidamente la trasmissione del meningococco o impedisce l'acquisizione del sierogruppo B. In un contesto universitario, la maggior parte della trasmissione meningococcica era dovuta a ceppi non raggruppabili, seguiti dal sierogruppo B [21]. MenB-FHbp e MenB-4C non hanno un impatto ampio e rapido sulla trasmissione del meningococco ed è improbabile che forniscano immunità di gregge nel contesto di una risposta al focolaio epidemico [22].

Vaccini contro papillomavirus umano (Vaccini HPV)

I vaccini HPV non sono né sicuri né efficaci come sostenuto da così tanta letteratura scientifica. Questi vaccini sono vaccini anti-virus, ma non sono vaccini antitumorali. Infatti, possono prevenire l'infezione (anche se non è sempre così), che prima di produrre lesioni precancerose (CIN2/3), diventa persistente. Esistono 3 vaccini HPV autorizzati all'uso (Gardasil 4, Gardasil 9 e Cervarix). Tutti i vaccini HPV sono composti, per la parte antigenica, da particelle simil-virali (VLP) basate sulla principale proteina capsulare HPV L1. Antigenicamente i vaccini sono molto simili ma sono prodotti in diversi sistemi e contengono diversi adiuvanti. Il vaccino Gardasil® è adjuvato con alluminio idrossifosfato-solfato. Il vaccino Cervarix® è formulato con AS04, che contiene idrossido di alluminio e l'MPL che è un agonista del recettore Toll-Like 4 (TLR4) (lipide A 3-O-desacil-4'-monofosforile). Sono stati osservati livelli elevati di citochine/chemochine plasmatiche dopo la prima vaccinazione con vaccino Gardasil®, mentre con l'uso del vaccino Cervarix le citochine pro-infiammatorie erano più elevate dopo la 1^a e la 3^a dose [23].

La nuova revisione della Cochrane [24], sui vaccini HPV, per la prevenzione del cancro cervicale nelle ragazze e nelle donne, comprendeva studi che non erano studi randomizzati, in doppio cieco, controllati con placebo (RCT) perché in diversi articoli etichettavano i sali di alluminio come placebo. Come riportato in precedenza, l'alluminio regola 312 geni [14] e per questo motivo non è un placebo. Questo può essere considerato un ossimoro scientifico.

Nel documento di riferimento VRBPAC [25] sono stati identificati due problemi importanti nel corso della revisione dell'efficacia di questo BLA. Uno era il potenziale per Gardasil™ di peggiorare la malattia in un sottogruppo di soggetti che avevano evidenza di infezione persistente con tipi di HPV contenuti nel vaccino. L'altra preoccupazione era l'osservazione di CIN2/3, o lesioni peggiori, determinati da tipi di HPV diversi e non contenuti nel vaccino. I risultati delle analisi del sottogruppo esplorativo per lo studio 013 hanno suggerito che i soggetti che erano sieropositivi e positivi alla PCR per i tipi di HPV contenuti nel vaccino presentavano un numero maggiore di CIN 2/3 o casi peggiori [25]. Fischer et al. [26] hanno ipotizzato che potrebbe esserci un cambiamento continuo nella prevalenza dei tipi di HPV dopo la vaccinazione. Le giovani donne vaccinate avevano una maggiore prevalenza di tipi non vaccinali ad alto rischio [27].

In definitiva, la vaccinazione può indurre risposte evolutive dei virus ai vaccini che possono comparire diversi anni dopo l'introduzione di tali misure di controllo.

Gli eventi avversi post vaccinali possono essere aggiunti a questo scenario complicato. In Giappone, il periodo di vaccinazione contro l'HPV si è sovrapposto a quello dello sviluppo dei sintomi correlati al vaccino HPV nelle pazienti vaccinate, inclusa la sindrome da dolore cronico regionale (CRPS) e le disfunzioni autonome e cognitive. Inoltre, sono trascorsi 28 mesi da quando è stata ritirata la raccomandazione per la vaccinazione HPV e non sono stati osservati nuovi sintomi correlati al vaccino HPV durante il periodo di follow-up di 14 mesi. La sequenza di questi eventi suggerisce che la vaccinazione contro l'HPV è temporalmente correlata allo sviluppo di questi sintomi nelle ragazze adolescenti giapponesi [28].

Sindrome infiammatoria post-vaccinazione: una nuova sindrome?

Giannotta [29] ha ipotizzato che diverse reazioni avverse post-vaccinazione potrebbero essere determinate dall'eccessiva produzione di citochine pro-infiammatorie, determinata dall'iniezione di questi vaccini. Egli aveva ipotizzato che queste reazioni post-vaccinazione potevano essere incluse nella sindrome ASIA, ma rappresentavano un sottogruppo di sindromi cliniche determinate dall'eccessiva espressione e dalla secrezione di citochine pro-infiammatorie. Per elaborare questa ipotesi, è partito da due considerazioni: 1- tutte le ragazze colpite da importanti reazioni avverse, in tutto il mondo, sperimentano una sintomatologia neurologica quasi identica dopo l'iniezione dei

vaccini; 2- se questi eventi avversi erano attribuibili ai vaccini era necessario capire in che modo i vaccini erano in grado di produrre sintomi, essenzialmente di natura neurologica.

Nel 2013, sono stati prodotti numerosi avvisi sulla sicurezza dei vaccini HPV: la CRPS in Giappone, la sindrome della tachicardia ortostatica posturale (POTS) in Danimarca e la sindrome della stanchezza cronica nei Paesi Bassi [30-32]. L'Agenzia europea del farmaco (EMA) ha prodotto, nel Novembre 2015, una revisione dei casi di POTS e CRPS. La conclusione alla quale è pervenuta è che le prove attuali non suggeriscono un'associazione causale tra i vaccini HPV e la POTS o la CRPS [33]. Ad ogni modo, alti livelli circolanti di citochine/chemochine plasmatiche sono stati osservati nel periodo post-vaccinazione utilizzando i vaccini anti-HPV [23].

Una volta arrivati a questo punto, sorge la domanda: una stimolazione immunitaria periferica può produrre una risposta del sistema nervoso centrale? In realtà, c'è una condizione naturale che certifica la sua esistenza: il comportamento da malato. Livelli elevati di citochine pro-infiammatorie determinano la maggior parte, se non tutti, gli aspetti della risposta alla malattia, direttamente o indirettamente [34]. Le citochine pro-infiammatorie, tra cui IL-1, IL-6 ed il fattore di necrosi tumorale- α (TNF- α), attivano la produzione e/o il rilascio di mediatori infiammatori secondari [35], quali prostaglandine (PG) ed ossido nitrico (NO). Le citochine pro-infiammatorie stimolano direttamente numerosi sistemi neuro-ormonali. Le citochine pro-infiammatorie possono interagire direttamente con la microglia e gli astrociti nella glia limitans. Una volta attivata la microglia, vengono reclutati gli astrociti che portano ad un'ulteriore attivazione dei segnali neuro-infiammatori [36].

Dopo aver verificato che le citochine periferiche possono produrre l'attivazione microgliale, rimane solo il collegamento tra alcune reazioni avverse post-vaccinazione e le citochine rilasciate dopo l'iniezione di questi vaccini.

CRPS di tipo I in Giappone

Ogni sindrome dolorosa ha un profilo infiammatorio costituito dai mediatori dell'infiammazione che sono presenti nella stessa sindrome. I mediatori biochimici dell'infiammazione includono citochine, neuropeptidi, fattori di crescita e neurotrasmettitori. Indipendentemente dal tipo di dolore, che si tratti di dolore acuto o cronico, dolore periferico o centrale, dolore nocicettivo o neuropatico, l'origine sottostante è l'infiammazione e la risposta infiammatoria [37]. La Tabella 2 elenca un numero di sindromi neurologiche (dolorose e non dolorose) e il loro rapporto con le citochine pro-infiammatorie.

Il sistema immunitario, attraverso il rilascio periferico e centrale di citochine pro-infiammatorie contribuisce significativamente alla modulazione del dolore [38]. Ci sono prove abbondanti che alcune citochine pro-infiammatorie come IL-1 β , IL-6 ed il TNF- α sono coinvolte nel processo del dolore patologico [39]. La IL-1 β è stata una delle prime citochine ad essere implicata nei meccanismi del dolore neuropatico indotto da lesioni dei nervi periferici nei roditori ed il TNF- α è fondamentale per lo sviluppo del dolore neuropatico [40]. Per esempio, i nocicettori sono noti per essere i sensori della IL-1 β e la IL-1 β può attivare direttamente i nocicettori per generare potenziali d'azione e indurre iperalgesia [41]. La CRPS descrive una serie di condizioni dolorose (dolore nocicettivo in CRPS di tipo I) che sono caratterizzate da un dolore agli arti continuativo (spontaneo e / o evocato) apparentemente sproporzionato nel tempo o nel grado rispetto al normale corso di qualsiasi trauma conosciuto o di altra lesione. Il dolore è regionale (non segue il territorio di distribuzione gestito da un nervo sensoriale in uno specifico distretto nervoso od in un dermatomo) e di solito ha una predominanza distale [42]. I sintomi della CRPS-I includono il dolore spontaneo (dolore "bruciante" alla pelle, e dolore "sordo" riferito ai tessuti profondi) e una varietà di sensazioni anormali tra cui mecano-iperlgesia, mecano-allodinia, allodinia al freddo e talvolta iperalgesia da calore. I sintomi includono disturbi della regolazione vasomotoria e sudomotoria;

cambiamenti trofici della pelle, di capelli, unghie e ossa, con distonia e altre anomalie motorie [43]. Quindi, il meccanismo più prominente sembra essere il processo infiammatorio perché tutti i classici segni di infiammazione (edema, arrossamento, ipertermia e funzionalità compromessa) sono evidenti nelle prime fasi della CRPS [44].

Alti livelli di citochine pro-infiammatorie (TNF- α e IL-6) sono stati trovati nel fluido vescicale della pelle degli arti colpiti rispetto agli arti non affetti dei pazienti con CRPS [45]. Nei pazienti con CRPS, i livelli di IL-1 β e IL-6 erano significativamente aumentati nel liquido cerebrospinale (CSF), rispetto ad altri soggetti [46,47]. Nel sangue di soggetti con neuropatia dolorosa, i livelli di TNF- α erano raddoppiati, rispetto ai soggetti sani e quelli con neuropatia non dolorosa [48]. La IL- β può modulare la trasmissione dei neuroni sensoriali perché aumenta il rilascio della sostanza P [49,50].

Pertanto, la CRPS di tipo I è associata ad alti livelli di IL-1 β e IL-6 nel liquido cerebrospinale e alti livelli di TNF- α nel sangue. Inoltre, queste citochine pro-infiammatorie sono fortemente espresse dopo l'iniezione di vaccini HPV (Figura 1). È ora evidente che la risposta pro-infiammatoria susseguente all'iniezione del vaccino è identica, sotto un comune substrato citochinico, al profilo infiammatorio della CRPS di tipo I. Certamente, la predisposizione individuale e altri possibili fattori di interferenza hanno determinato chi avrebbe dovuto ammalarsi e chi no, mentre esprimevano (entrambe le categorie di soggetti) alti livelli di citochine pro-infiammatorie dopo l'iniezione dei vaccini anti-HPV.

Sindrome neurologica clinica	Citochine pro-infiammatorie				
	IL-1 β	TNF- α	IL-6	IFN- γ	IL-8
Dolore patologico [39]	Si	Si	Si	Si	-
Dolore neuropatico periferico [40]	Si	Si	-	-	-
Iperalgesia [41]	Si	-	-	-	-
CRPS [46-48]	Si	Si	Si	-	Si
Fatica cronica [55,56]	Si	Si	Si	-	-
CFS/ME [55,56]	Si	Si	-	-	-
POTS [54]	-	-	Si	-	-

POTS in Danimarca

Un certo numero di segnali di allarme, riguardanti casi di CRPS, POTS e sindrome della stanchezza cronica (CFS), sono emersi con l'uso dei vaccini anti-HPV, e tali situazioni spesso presentano un identico modello sintomatologico [51]. La POTS è un disordine eterogeneo del sistema nervoso autonomo [52] in cui un cambiamento dalla posizione supina alla posizione eretta provoca un aumento abnormemente elevato della frequenza cardiaca (30 bpm entro 10 minuti dall'assunzione della posizione eretta). Brinth et al. [53] riportano le caratteristiche di un numero di pazienti con una sindrome di intolleranza ortostatica, cefalea, affaticamento, disfunzione cognitiva e dolore neuropatico che iniziano in stretta relazione con la vaccinazione anti-HPV. Inoltre, la diagnosi

CFS/ME può essere correttamente posta in pazienti con sospetti effetti collaterali al vaccino quadrivalente anti-HPV [31]. L'attivazione simpatica e l'inibizione parasimpatica nei pazienti con POTS sono state associate ad aumentati livelli sierici della IL-6 [54].

Stanchezza cronica nei Paesi Bassi

Il sistema di rilevamento Lareb [32] ha ricevuto un numero considerevole di segnalazioni riguardanti eventi avversi di lunga durata dopo la vaccinazione con Cervarix®. L'evento avverso di lunga durata segnalato con maggiore frequenza è stata la fatica. La relazione tra elevati livelli di citochine pro-infiammatorie col la stanchezza e la faticabilità è ben documentata [55]. Nei pazienti con CFS/ME, le citochine pro-infiammatorie, comprese IL-1 β e TNF- α , sono elevate e sono significativamente associate con la gravità dell'affaticamento, con un malessere simil-influenzale, con la tristezza ed i sintomi autonomici [55]. Inoltre, altri autori hanno riscontrato alti livelli di citochine pro-infiammatorie, come IL-6 e TNF- α , nei pazienti con CFS/ME [56]. IL-1 β , IL-6 e TNF- α sono fortemente espresse dopo l'iniezione di vaccini anti-HPV, e nei pazienti con CFS/ME, le stesse citochine pro-infiammatorie sono elevate [55,56].

Microglia

E' oggi accettato che la microglia deriva dai tessuti mesodermo/mesenchimali, principalmente dalle cellule mieloidi provenienti dal midollo osseo. Queste cellule, negli esseri umani, migrano nel Sistema Nervoso Centrale (CNS) durante il primo trimestre di gravidanza e per tutta la prima parte del secondo trimestre [57]. Un recente studio di Paolicelli et al. [58] ha dimostrato il ruolo centrale delle microglia nel pruning sinaptico e nello sviluppo dei circuiti del cervello embrionale in via di sviluppo. Le cellule microgliali hanno una distribuzione eterogenea [59]. Le cellule microgliali lungo i vasi cerebrali si trovano spesso in uno stato attivato e, insieme alla barriera emato-encefalica (BBB), formano una particolare barriera immunologica per il cervello. La microglia si trova anche concentrata in siti in cui la funzione della BBB è incompleta, come negli organi circumventricolari (CVOs), o l'organo vascolare della lamina terminale, l'organo sotto-commissurale, l'organo sottofornicale, l'area postrema, l'ipofisi posteriore, l'eminenza mediana, la ghiandola pineale, e il plesso coroideo, dato che questi sono i siti di ingresso di agenti invasori trasportati dal sangue e perfino di molecole ancora più grandi [60]. La microglia esprime recettori per un certo numero di citochine sia pro-infiammatorie che anti-infiammatorie. Un tipo di recettore per le citochine è particolarmente importante per l'attivazione della microglia, si tratta del recettore per la IL-1 β , che include i sottotipi IL1-RI, IL-1RII, e IL-1RIII [61]. La IL-1 β è in grado di attivare la microglia cerebrale. La BBB esprime un sistema di trasporto per le citochine che è carrier-mediato, energia dipendente e saturabile, principalmente per IL-1, IL-6 e TNF- α [62,63]. Quando le cellule endoteliali che costituiscono la BBB entrano in contatto con queste citochine periferiche, esse secernono varie molecole nel parenchima cerebrale, inclusi NO, la prostaglandina E2, IL-1 e IL-6, tutte citochine pro-infiammatorie note per influenzare la funzionalità neurologica [64]. E' oggi accettato che l'attivazione infiammatoria ed immunitaria periferica influiscono secondariamente sulle funzioni cerebrali durante il processo infettivo [65]. L'attivazione della microglia è piuttosto rapida in seguito all'attivazione immunitaria sistemica, solitamente avviene entro pochi minuti e provoca una immuno-eccitotossicità. Questo processo immunitario secondario è stato nominato "Sickness Behaviour" ed è caratterizzato da anoressia, ipersonnia, letargia, ridotta interazione sociale, funzione cognitiva ridotta e debolezza.

Microglia primed

Le cellule della microglia sono molto longeve [66,67]. Esse possono passare da un fenotipo a riposo ad uno stato innescato per azione di uno stimolo immunitario iniziale che non sia eccessivamente intenso. Per esempio, un lieve trauma cranico o un episodio di ipossia, possono far passare la microglia dal suo stato di riposo ad una condizione funzionale in cui l'attivazione enzimatica e genetica risulta sovra-regolata, ma le molecole immunitarie attive, principalmente le citochine pro-infiammatorie e le chemochine, non vengono rilasciate [57]. La NADH ossidasi è essenziale per il priming microgliale. La NADH ossidasi produce principalmente specie reattive derivate dall'ossigeno e la sintesi inducibile dell'ossido nitrico (iNOS) produce radicali azotati, che quando combinati insieme, formano il potentissimo radicale perossi-nitrito, appartenente alle specie reattive dell'azoto (RNS) [68].

Con un secondo stimolo immunitario, questa microglia attivata (primed) inizia a rilasciare citochine e chemochine pro-infiammatorie in concentrazioni molto più alte rispetto alle microglia non primed. La stimolazione immunitaria sistemica può innescare la microglia del cervello, il che significa che successivi disturbi cerebrali o un'attivazione immunitaria sistemica potrebbero far partire una risposta immunitaria amplificata all'interno del cervello. Gli eventi immunitari che si verificano durante la vita, l'esposizione e metalli neurotossici, l'esposizione ad erbicidi/pesticidi e fungicidi, traumi cranici, e altri fattori possono causare episodi associati con il priming delle microglia e la loro attivazione, portando a una progressiva perdita di neuroni nelle parti più vulnerabili del SNC, come ipotalamo, lobi temporali (ippocampo, area striata, amigdala, corteccia entorinale) e corteccia prefrontale [57].

Nei lattanti e nei bambini piccoli, l'evento di innesco potrebbe arrivare da un certo numero di sorgenti, come la vaccinazione della madre durante la gravidanza o con un'infezione intrauterina o precocemente nella fase post-natale [69, 70]. In altri casi, l'evento di priming può verificarsi con l'inoculazione del primo vaccino, solitamente alla nascita (anti-epatite B). Una volta innescata, le successive vaccinazioni, in particolare quelle praticate entro i primi mesi successivi alla prima inoculazione, innescheranno l'attivazione completa della microglia che potrebbe causare uno sviluppo anormale delle normali traiettorie di sviluppo del cervello che anche dopo la nascita sono operative [71-74]. Mentre le infezioni naturali possono anche esse produrre questa risposta neuro-distruttiva, le vaccinazioni producono livelli più elevati di attivazione immunitaria e la risposta immune può persistere più a lungo rispetto alle infezioni naturali, persistendo a volte anche per anni [57].

E' ben stabilito che un'inflammatione nella periferia può stimolare una risposta immunitaria nel cervello [75]. Contrariamente all'ipotesi accettata da lungo tempo che la memoria immunologica esiste solo nelle cellule del sistema immunitario adattativo, recenti studi hanno dimostrato che anche le cellule mieloidi mostrano effetti di memoria [76,77]. Per esempio, alcuni stimoli immunitari istruiscono i monociti del sangue a generare risposte immunitarie potenziate nei confronti di successivi insulti immunitari [78,79]. Di contro, altri stimoli inducono una tolleranza/soppressione immunitaria delle risposte infiammatorie agli stimoli successivi [78,80]. La memoria immunitaria innata dura, *in vitro*, per diversi giorni e fino a tre mesi *in vivo* nei monociti circolanti ed è mediata da una riprogrammazione epigenetica delle cellule in cultura, con cambiamenti della cromatina evidenziabili anche *in vivo* [78,81,82]. Tuttavia, mentre l'attivazione/addestramento può portare benefici in periferia, grazie ad una maggiore eliminazione del patogeno [82-84], e la tolleranza può essere dannosa a causa di più alti tassi di infezione derivanti dalla soppressione immunitaria [80], l'attivazione/addestramento promuove la neuropatologia, mentre la tolleranza la allevia [85].

In sintesi, la memoria immunitaria innata è un meccanismo vitale della plasticità delle cellule mieloidi che si manifesta in risposta a stimoli ambientali ed altera le successive risposte immunitarie. Si possono distinguere due tipi di imprinting immunologico, l'attivazione/addestramento e la tolleranza. Queste sono mediate epigeneticamente ed aumentano o sopprimono rispettivamente le successive infiammazioni. Gli stimoli infiammatori applicati perifericamente possono indurre attivazione/addestramento immunitario acuto o la tolleranza nel cervello e portano ad una riprogrammazione epigenetica differenziale delle microglia che persiste per almeno sei mesi. Singole citochine applicate perifericamente possono anche suscitare effetti di memoria immunitaria nel cervello [85].

Disturbi dello Spettro Autistico (ADS) e Neuro-infiammazione

I Disturbi dello Spettro Autistico (ADS) includono una serie di manifestazioni che riguardano prevalentemente la vita relazionale del soggetto affetto. In altre parole, si tratta di una condizione pervasiva dello sviluppo neurologico caratterizzata da menomazioni variabili nella comunicazione e nelle interazioni sociali, nonché segnata da interessi ristretti e comportamenti ripetitivi. L'ultima stima della prevalenza di autismo negli Stati Uniti si riferisce ai nati nel 2006 [86], per i quali la prevalenza complessiva di ASD era di 16,8 per 1.000 (uno su 59 nuovi nati). Negli anni recenti, molti studi indicano che i bambini con una diagnosi di ASD hanno una patologia cerebrale suggestiva di una neuro-infiammazione continua o di una sottostante encefalite in differenti regioni del loro cervello. Le evidenze di neuro-infiammazione od encefalite nei soggetti con ASD includono: attivazione microgliale ed astrocitaria, uno specifico ed elevato profilo pro-infiammatorio delle citochine e una espressione aberrante del fattore di trascrizione NF-κB nelle cellule B

attivate. Una stima prudente, basata sulla ricerca attualmente disponibile, suggerisce che almeno il 69% delle persone con una diagnosi di ASD ha un'attivazione microgliale od una neuro-infiammazione [87]. Riguardo ad un sottogruppo di bambini, i loro genitori riferiscono che avevano acquisito uno sviluppo normale o quasi normale per i primi 14-24 mesi e successivamente avevano subito una regressione nelle abilità comunicative e/o sociali precedentemente acquisite. La stima della prevalenza di questo pattern "regressivo" va dal 20% al 47% tra i bambini con autismo [88-94].

Negli ultimi tempi sono aumentate le indagini sui problemi del sistema immunitario nelle ASD, comprese le aberrazioni nei profili delle citochine e nelle loro vie di segnalazione, e sono oggetto di interesse continuo [95]. Il sistema immunitario ed il sistema nervoso sono intrinsecamente interconnessi, lo stato funzionale del sistema immunitario influisce su una moltitudine di processi biologici, inclusa la funzione e lo sviluppo cerebrale, che possono subire delle conseguenze quando le risposte immuni adattive ed innate sono sbilanciate [96]. In più, una review sistematica che valutava i markers pro-infiammatori in quasi 4000 bambini e adolescenti con disturbi neuropsichiatrici e del neuro-sviluppo, incluse le ADS, ha identificato prove preliminari del ruolo dell'infiammazione in queste condizioni e un'associazione con uno stato pro-infiammatorio [97]. Un profilo alterato delle citochine è stato consistentemente collegato alle ASD nei bambini nel periodo postnatale [98]. Le citochine possono influenzare il comportamento attraverso effetti sulla funzione dei neurotrasmettitori, l'attività neuroendocrina, la neurogenesi, e le alterazioni dei circuiti cerebrali [99]. Per esempio, è stato dimostrato che le citochine aumentano il rilascio e diminuiscono il re-uptake del neurotrasmettitore eccitatorio glutamato, la qual cosa può provocare un processo patologico di eccitotossicità [100]. Tali evidenze di un profilo anomalo delle citochine nelle ASD suggerisce che possono essere attivi dei disturbi del sistema immunitario e che questi possano contribuire in modo continuo alla manifestazione delle ADS. Questo insieme di prove ha agito da catalizzatore per incentivare gli sforzi per caratterizzare possibili sottogruppi di pazienti con ASD che presentano anomalie o disfunzioni del sistema immunitario e pattern alterati della presentazione dei sintomi [101,102].

Si pensa che i segnali periferici delle citochine accedano al cervello attraverso tre vie: umorale (con il coinvolgimento degli anticorpi), neurale e cellulare [95,99]. Queste vie di comunicazione coinvolgono almeno cinque meccanismi: (1) il passaggio di citochine attraverso le regioni semi-permeabili della barriera emato-encefalica; (2) un trasporto attivo *via* molecole di trasporto citochino-specifiche nell'endotelio cerebrale; (3) l'attivazione delle cellule endoteliali, le quali rilasciano un messaggero secondario all'interno del parenchima cerebrale; (4) la trasmissione di segnali delle citochine via fibre nervose afferenti, incluso il nervo vago; (5) l'entrata nel parenchima cerebrale di monociti attivati perifericamente i quali rilasciano le citochine di loro produzione. E' stata recentemente proposta una via alternativa. Si basa sul lavoro rivoluzionario di Louveau e colleghi [103] che hanno identificato dei vasi linfatici funzionali, all'interno del SNC, che trasportano fluidi e cellule immunitarie dal liquido cerebrospinale e, così facendo, hanno scoperto un percorso delle cellule immunitarie per uscire dal SNC.

L'ingresso delle citochine periferiche all'interno del cervello determina differenti effetti. Il cervello riconosce le citochine, tipo le citochine pro-infiammatorie IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , e IL-6 come segnali molecolari di malattia [104]. In più, TNF- α , IL-6, and IL-1 β possono attraversare la barriera emato-encefalica ed agire sull'ipotalamo dove favoriscono l'insorgenza della febbre e dei comportamenti da malato [105]. Elevati IL-1 β e IL-6 sono stati associati ad un aumento di comportamenti stereotipati [106]. Una disregolazione della IL-1 β , una citochina pro-infiammatoria che si esprime nella fase della risposta immunitaria precoce, è implicata nella compromissione della memoria e dell'apprendimento [107]. IL-1 β induce o inibisce la proliferazione delle cellule neuronali progenitrici nel SNC, il che può contribuire alla crescita cerebrale deviata di alcune regioni specifiche nel ASD [108]. I bambini e gli adulti con autismo presentano un aumento plasmatico dei livelli di IL-1 β [109-110]. Rispetto ai monociti dei soggetti di controllo, i monociti dei soggetti con ASD producono quantità eccessive di IL-1 β dopo l'esposizione ai lipopolisaccaridi [112,113]. La IL-1 β induce la proliferazione dei progenitori neurali in alcune aree cerebrali, mentre la inibisce in altre [114]. Questa capacità potrebbe contribuire all'origine delle aree di crescita eccessiva e di quelle a crescita ridotta osservate nel cervello di individui con ASD [107]. La IL-1 è coinvolta nei processi cerebrali più sofisticati, la sua induzione avviene nell'ippocampo durante i processi di apprendimento ed è essenziale per mantenere il potenziamento a lungo termine (LTP), ma a dosi più elevate, come riscontrato in condizioni patologiche, IL-1 inibisce LTP [115]. Sia l'ipersecrezione che la ridotta secrezione di IL-1 β sono associate ad una compromissione della memoria e del linguaggio [116-118].

In sintesi, la IL-1 β partecipa ai processi neurologici e gioca un ruolo chiave nella patologia e nella guarigione del sistema nervoso centrale. Sono necessari normali livelli di IL-1 β e del suo recettore antagonista IL-1ra per raggiungere uno sviluppo cerebrale nella norma ed una sua normale funzione.

Il TNF- α è un regolatore centrale dell'inflammatione e risulta aumentato nel fluido cerebrospinale dei bambini con ASD [119].

Sono stati frequentemente riportati elevati livelli di IL-6 negli ASD, sia a livello centrale che periferico [106, 120, 121]. La IL-6 è generalmente considerata come una citochina pro-inflammatoria ed è stata identificata come una citochina che il cervello riconosce come segnale molecolare di malattia [104]. In un modello murino con elevati livelli di IL-6 cerebrale, Wei e colleghi [123] hanno dimostrato che la IL-6 può modulare i comportamenti simil-autistici attraverso la compromissione della formazioni sinaptica, dello sviluppo delle spine dendritiche e dell'equilibrio dei circuiti sinaptici. Studi immuno-citochimici hanno identificato una marcata attivazione della microglia e degli astrociti in associazione con l'aumento della produzione di due citochine da parte delle neuroglia, la protina chemoattrattiva dei macrofagi MCP-1 e il TGF- β 1 [124]. Inoltre, è stato identificato uno specifico profilo delle citochine pro-inflammatorie nel liquor cerebrospinale [124]. Un altro studio post-mortem ha dimostrato anche aumenti significativi nelle citochine pro-inflammatorie e delle citochine prodotte dai Th1 in relazione ai controlli abbinati [120].

Nel complesso, nelle ASD è riconosciuto il fatto che esiste una componente infiammatoria. Esiste un'associazione tra ASD e neuro-inflammatione nelle regioni anteriori della neocorteccia [124-126] risultante dall'attivazione della microglia e degli astrociti [127]. Le reti geniche coinvolte nei processi immunitari sono sovra-esprese nel cervello di individui con ASD [128,129]. I campioni cerebrali post-mortem di pazienti con ASD dimostrano un'attivazione neurogena e la presenza dei marcatori infiammatori nel liquido cerebrospinale.

Il fattore di trascrizione NF- κ B media la regolazione della risposta immunitaria inducendo l'espressione di citochine e chemochine infiammatorie, stabilendo un meccanismo di feedback che può produrre un'inflammatione cronica od eccessiva. Il fattore NF- κ B è espresso in modo aberrante nella corteccia orbitofrontale dei pazienti con ASD, come parte di una cascata molecolare putativa che porta all'inflammatione, in particolare delle cellule immunitarie che risiedono nelle regioni del cervello associate ai sintomi comportamentali e clinici delle ASD [130]. L'implicazione della via di segnalazione del fattore NF- κ B nelle ASD supporta ulteriormente un potenziale ruolo a favore della neuro-inflammatione [131]. Le vie immunitarie sono attivate dalle citochine pro-inflammatorie come TNF- α e IL-6 che stimolano la traslocazione nucleare di vari fattori di trascrizione, tra cui NF- κ B che successivamente porta al potenziamento della risposta immunitaria [132]. Citochine, chemochine e le specie reattive dell'ossigeno figurano tra un certo numero di mediatori chiave che inducono l'espressione del fattore NF- κ B attivando le chinasi I κ B [133]. Questi fosforilano I κ B α , portandola alla sua poli-ubiquitilazione e degradazione [134], e consentono al fattore NF- κ B di migrare nel nucleo, dove attiva la trascrizione di vari geni pro-inflammatori.

Livelli anomali di citochine pro-inflammatorie (IL-6, TNF- α , e MCP-1), non solo nei campioni cerebrali e nel fluido cerebrospinale [135], ma anche nel fluido amniotico [136], indicano un processo infiammatorio attivo sia nei bambini che negli adulti affetti da ASD. Le citochine e le chemochine sono proteine pleiotropiche che coordinano la risposta dell'ospite ad una infezione nonché mediano la normale e costante comunicazione tra le cellule dei tessuti non immunitari, incluso il sistema nervoso [137]. Come conseguenza di questo duplice ruolo, le citochine indotte in risposta a stimoli avversi (per es. un'infezione materna o un'ipossia prenatale) possono profondamente influire sul neuro-sviluppo fetale. La microglia gioca un ruolo critico nel pruning delle sinapsi, fornendo così un potenziale ponte tra il pruning sinaptico atipico e le ipotesi immuno-disregolatorie delle ASD [138].

In definitiva, le citochine pro-inflammatorie prodotte dall'attivazione del sistema immunitario periferico, determinano anche effetti nel sistema nervoso centrale e in molti casi di ASD c'è l'evidenza di neuro-inflammatione. Le citochine pro-inflammatorie, incluse IL-1 β , IL-6 e TNF- α , sembrano essere collocate in prima linea nella comunicazione tra il sistema immunitario ed il sistema nervoso, giocando ruoli duali nella mediazione di funzioni fisiologiche e neuro-protettive e nel normale funzionamento cerebrale; oppure possono essere dannose ed associate a malattie cerebrali specialmente quando presenti in

concentrazioni elevate [139].

Dal momento che nel primo anno di vita, nei paesi industrializzati, il sistema immunitario è attivato più dal numero di vaccinazioni ricevute che dal numero di infezioni contratte, dobbiamo cominciare a pensare che le citochine pro-infiammatorie rilasciate dopo le iniezioni dei vaccini possano produrre un'attivazione delle microglia che può causare una susseguente neuro-infiammazione.

Discussione

Le citochine, insieme agli ormoni ed ai neurotrasmettitori, sono delle molecole di segnale che possiedono funzioni immuno-modulatorie esclusive. Virtualmente, esse possono influenzare qualsiasi sistema fisiologico incluse le interazioni neuroendocrine, il metabolismo dei neurotrasmettitori e la neuroplasticità, con conseguente effetto sul funzionamento comportamentale e cognitivo [140]. Le citochine sono al centro della scena nell'orchestrare le risposte immunitarie [141]. L'iniezione dei vaccini porta ad una forte espressione di citochine pro-infiammatorie. I macrofagi, quando attivati, secernono citochine pro-infiammatorie come IL-1 β , TNF- α ed IL-6. Sembra che le variazioni nelle risposte alle citochine, indotte dai vaccini, siano modulate da un polimorfismo genetico in molti dei geni per le citochine e per i loro recettori [142]. Le citochine sono messaggeri che determina effetti inter-cellulari ed agiscono come gli ormoni con la più forte attività esercitata nel microambiente delle cellule che le secernono [143]. Esse agiscono nella maggioranza dei casi a distanze più brevi (con alcune eccezioni come IL-1 e IL-6 e TNF). Tuttavia, le citochine penetrano nella maggior parte dei tessuti, essendo trasportate dalla migrazione dei globuli bianchi del tessuto ematopoietico, che virtualmente permea tutti gli altri tessuti nei vertebrati. Inoltre, le cellule immunitarie competenti sono una delle più grandi fonti di citochine e sono in grado di migrare in quasi tutti i tessuti del corpo, rappresentando, così, i regolatori in movimento del microambiente locale [143].

Abbiamo ipotizzato un collegamento tra vaccinazioni e neuro-infiammazione. Le citochine periferiche pro-infiammatorie (IL-1 β , TNF- α , e IL-6), che vengono espresse dopo l'iniezione di tutti i vaccini, possono raggiungere il cervello e possono causare una neuro-infiammazione dopo l'attivazione delle microglia. A seconda dell'età e del tipo di vaccino, la neuro-infiammazione potrebbe produrre AEs, come quelli che si presentano dopo la somministrazione dei vaccini anti-HPV. Negli studi sul profilo delle citochine nei bambini autistici, sono state dimostrate quantità elevate di citochine pro-infiammatorie, in particolare di TNF- α . La IL-1 β è una citochina che controlla la cascata pro-infiammatoria locale e quindi influisce sull'equilibrio tra l'infiammazione protettiva e quella distruttiva. Un sottogruppo di bambini affetti da ASD ha sviluppato una neuro-infiammazione. Diversi studi post-mortem hanno confermato l'attivazione della microglia e la neuro-infiammazione. Uno studio recente dimostra la presenza di alluminio nel tessuto cerebrale nelle ASD. Inoltre l'alluminio era stato trovato anche nelle cellule della microglia [144]. L'alluminio proveniente dai vaccini si ridistribuisce in numerosi organi, compreso il cervello, dove si accumula. Ogni vaccino aggiunge a questo tessuto, differenti livelli di alluminio. L'alluminio, come il mercurio, attiva la microglia portando ad una infiammazione cerebrale cronica ed a neurotossicità.

I vaccini Gardasil e Cevax (Figura 1) contengono alluminio, che attiva l'enzima caspasi-1, *via* inflammasoma NLRP3. L'enzima caspasi-1 converte le pro-interleuchine IL-1 β ed IL-18 nelle loro forme attive. La IL-18 determina la produzione di IFN- γ . La IL-1 β rappresenta una citochina che controlla la cascata pro-infiammatoria locale e contribuisce all'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B. L'adiuvante del vaccino Cevax si chiama AS04 e contiene Idrossido di Alluminio ed MPL con il secondo che stimola i TLR4. Il vaccino Gardasil 4 è contaminato da DNA estraneo in una conformazione non-B [145] il quale attiva i TLR9. I TLRs agiscono attraverso la proteina adattatrice MyD88 che incrementa l'attività del fattore di trascrizione NF- κ B, il quale, poi, aumenta l'espressione e la secrezione delle citochine IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Quindi, c'è una forte stimolazione immunitaria ed una forte produzione di citochine pro-infiammatorie, incluse IL-1 β , IL-6 e TNF- α che sono capaci di esercitare effetti a distanza dal sito di produzione.

Nella figura 2, è sempre rappresentato il meccanismo di azione dell'alluminio, ma un nuovo vaccino anti-meningococco B produce l'attivazione dei TLR-2 e 4. Le vescicole OMV contengono lipoproteine che attivano i TLR-2, e dei LPS che attivano i TLR-4. La potente produzione di citochine periferiche pro-infiammatorie è in grado di indurre l'attivazione microgliale e la successiva neuro-infiammazione.

Attivazione Microgliale e neuro-infiammazione

Figura 2: è sempre rappresentato il meccanismo di azione dell'alluminio ma un nuovo vaccino anti-meningococco B produce l'attivazione dei TLR-2 e 4. Le vescicole OMV contengono lipoproteine che attivano i TLR-2, ed il LPS che attiva i TLR-4. La potente produzione di citochine periferiche pro-infiammatorie è in grado di indurre l'attivazione della microglia e la successiva neuro-infiammazione.

Effetti centrali delle citochine pro-infiammatorie periferiche

Figura 3: sulla destra, puoi vedere che le citochine periferiche pro-infiammatorie, espresse dopo l'iniezione dei vaccini, possono raggiungere il cervello e, a parte la neuro-infiammazione, possono causare una sindrome infiammatoria post-vaccinale [29], come nel caso dei vaccini anti-HPV. Se è presente una neuro-infiammazione, questa potrebbe essere seguita da reazioni autoimmuni e da neuro-degenerazione. Le citochine periferiche possono determinare la microglia primed ed il fenotipo infiammatorio M1 partecipa alla neuro-infiammazione. La neuro-infiammazione aumenta la produzione di citochine pro-infiammatorie, attiva gli astrociti, provoca uno stress ossidativo e aumenta la produzione di prostaglandine nel cervello. Lo stress ossidativo e l'attivazione degli astrociti causa una rottura della barriera emato-encefalica (BBB) che facilita il passaggio dei linfociti T e B nel cervello. Lo stress ossidativo produce anche un danno agli antigeni del self e potrebbe concorrere alla produzione di malattie autoimmuni e neurodegenerative.

Sulla parte destra della Figura 3, puoi vedere che le citochine periferiche pro-infiammatorie, espresse dopo l'iniezione dei vaccini, possono raggiungere il cervello e, a parte la neuro-infiammazione, possono causare una sindrome infiammatoria post-vaccinale [29], come nel caso dei vaccini anti-HPV. Se è presente una neuro-infiammazione, questa potrebbe essere seguita da reazioni autoimmuni e da neuro-degenerazione. Le citochine periferiche possono produrre microglia primed ed il fenotipo infiammatorio M1 partecipa alla neuro-infiammazione. La neuro-infiammazione aumenta la produzione di citochine pro-infiammatorie, attiva gli astrociti, provoca uno stress ossidativo ed aumenta la produzione di prostaglandine nel cervello. Lo stress ossidativo e l'attivazione degli astrociti causa una rottura della barriera emato-encefalica (BBB) che facilita il passaggio dei linfociti T e B nel cervello. Lo stress ossidativo produce anche un danno agli antigeni del self e potrebbe aiutare a produrre le malattie autoimmuni e neurodegenerative.

Conclusioni

L'esistenza di ampie linee di comunicazione tra il sistema nervoso ed il sistema immunitario rappresenta un principio fondamentale che sottende la neuro-infiammazione. La memoria immunitaria del cervello è un importante modificatore della neuropatologia. Un'infiammazione sistemica genera dei segnali che comunicano con il cervello e portano a cambiamenti nel metabolismo e nel comportamento, con la microglia che può essere indotta ad assumere un fenotipo pro-infiammatorio. Possono essere distinti due tipi di imprinting immunologico: l'addestramento e la tolleranza. Questi sono modulazioni mediate epigeneticamente e possono incrementare o sopprimere, rispettivamente, la conseguente infiammazione.

Uno stimolo infiammatorio prodotto nel sistema immune periferico induce un'addestramento immunitario acuto od una tolleranza nel cervello che porta a una differente riprogrammazione epigenetica dei macrofagi che risiedono a livello cerebrale (microglia) che persiste per almeno sei mesi.

Gli effetti prodotti dall'attivazione della microglia, e la conseguente neuro-infiammazione, sono diversificati in base all'età: possono, nei primi due anni di vita, contribuire alla produzione di ASD (in alcuni soggetti con ASD c'è una neuro-infiammazione ed un accumulo di alluminio nel cervello); mentre una differente sintomatologia neurologica può sorgere in ragazze vaccinate con vaccini anti-HPV. Una sindrome infiammatoria post-vaccinale può spiegare le reazioni avverse ai vaccini anti-HPV (Sottogruppo ASIA). Infatti, la IL-1 β causa dolore patologico e fatica e si riscontra in quantità elevata nel dolore neuropatico periferico e nella CRPS di tipo I. Aumentati livelli di IL-1 β , IL-6 e TNF- α nel cervello causano deterioramento cognitivo, disturbi del sonno e ridotta attività motoria.

Riguardo alla possibile correlazione tra i vaccini anti-HPV e la CRPS di tipo I, a livello molecolare, il quadro citochinico tipicamente presente nei casi di CRPS di tipo I, con elevati livelli di IL-1 β , IL-6 e TNF- α , è riprodotto fedelmente dall'iniezione dei vaccini anti-HPV. Mentre nei pazienti con POTS, l'attivazione simpatica e la soppressione parasimpatica sono stati associati ad aumentati livelli sierici di IL-6 [54]. IL-1 β , IL-6 e TNF- α sono fortemente espresse dopo l'iniezione dei vaccini anti-HPV, e nei pazienti con CFS/ME, queste stesse citochine pro-infiammatorie risultano elevate [55,56].

Suzuki e Hosono [146] non hanno trovato un'associazione tra il vaccino anti-HPV ed i sintomi post-vaccinazione riportati nelle giovani donne giapponesi. Lo strumento d'indagine era un questionario postale anonimo. Come è evidente, l'epidemiologia utilizza diversi strumenti investigativi rispetto alla biologia molecolare. Nel caso degli eventi avversi prodotti dai vaccini anti-HPV, la biologia molecolare dimostra tutto quello l'epidemiologia non rileva.