

## **Disfunzioni mitocondriali, attività ossido-riduttiva pregiudicata, degenerazione, e morte nelle cellule neuronali e fetali umane indotta da esposizione a bassi livelli di Thimerosal ed altri composti metallici.**

D.A. Geier<sup>a</sup>, P.G. King<sup>b</sup> e M.R. Geier<sup>c</sup>

<sup>a</sup>*Istituto per le malattie croniche, Inc. Silver Spring, Maryland, U.S.A.*, <sup>b</sup>*CoMeD, Inc., Silver Spring, Maryland, U.S.A.*, <sup>c</sup>*I centri di genetica americani, Silver Spring, Maryland, U.S.A.*

*(Versione finale ricevuta il 4 giugno 2008)*

Il thimerosal (acido etilmercurio-tiosalicilico), un composto che rilascia etilmercurio (Et-Hg, contenente un tenore del 49,55% di mercurio), è stato usato in una vasta schiera di medicinali per più di 70 anni. Recentemente, particolare preoccupazione ha destato la somministrazione abituale di vaccini per bambini contenenti il Thimerosal che è divenuta una significativa fonte di inquinamento da mercurio per alcuni feti/infanti. Questo studio è stato intrapreso per investigare il danno cellulare in vitro nei sistemi modello umani neuronali (SH-SY-5Y neuroblastoma e 1321N1 astrocitoma) e fetali (non trasformati), usando prove di vitalità cellulare ed immagini digitali catturate al microscopio per evidenziare danni potenziali indotti dal Thimerosal ed altri composti metallici (alluminio solfato, piombo(II) acetato, metilmercurio idrossido e mercurio(II) cloruro) dove il catione era stato riportato esercitare effetti dannosi sulle cellule in fase di sviluppo. Il danno cellulare associato al Thimerosal è stato anche valutato per similarità con risultati patofisiologici osservati in pazienti a cui sono stati diagnosticati disordini di tipo autistico (ADs). Danni cellulari indotti da Thimerosal, come evidenziato da danni mitocondriali in funzione di concentrazione e tempo, attività ossido-riduttiva ridotta, degenerazione cellulare, e morte cellulare nei sistemi cellulari neuronali e fetali studiati. Il Thimerosal a concentrazioni nanomolari (miliardesimi di mole per litro, che corrisponde grosso modo a qualche decina di milionesimi di grammo per litro di etilmercurio) ha indotto una significativa tossicità cellulare in cellule neuronali e fetali. La citotossicità indotta dal Thimerosal è simile a quella osservata negli studi patofisiologici dei disturbi autistici (AD). Il Thimerosal è stato trovato essere significativamente più tossico degli altri composti metallici esaminati. Ulteriori studi devono essere condotti in futuro per valutare meccanismi addizionali sottostanti i danni cellulari indotti dal Thimerosal e accertare potenziali co-esposizioni ad altri composti tossici che possano aumentare o diminuire la tossicità mediata dal Thimerosal

**Parole chiave:** autismo, gliale, piombo, mercurio, mercurico, neurosviluppo

### **Introduzione**

Il Thimerosal (acido etilmercurio tiosalicilico) è un composto che rilascia etilmercurio(EtHg) che è stato utilizzato in una schiera di medicinali per più di 70 anni (Geier et al. 2007). Il Thimerosal contiene il 49,55% di mercurio (Hg) e, in soluzione acquosa, è noto decomporsi in idrossido di etil mercurio ed il sale di sodio dell'acido tiosalicilico (Tan e Parkin 2000). Recentemente, particolare preoccupazione ha destato la ricerca indicante che queste vaccinazioni contenenti Thimerosal ricevute durante i primi 6 mesi di vita corrispondevano in alcuni bambini a più del 50% dell'esposizione cumulativa a Mercurio (Bigham e Copes 2005). In aggiunta, gli stessi ricercatori hanno trovato che la dose cumulativa di Hg (combinando

fonti ambientali e medicinali) ricevuta da certi bambini superava la massima dose giornaliera di mercurio per chilogrammo di peso consentita dall'EPA (Agenzia di Protezione dell'Ambiente statunitense), da Health Canada, dal World Health Organization (WHO), dall'Agenzia per le sostanze tossiche e il registro delle malattie (ATSDR) e i limiti di sicurezza giornalieri per l'ingestione di mercurio previsti dalla US Food and Drug Administration (FDA), tramite numerose esposizioni a grosse dosi di mercurio risultanti dalla somministrazione di vaccini contenenti Thimerosal durante i primi 6 mesi di vita.

Precedenti studi hanno riportato che le esposizioni a Hg in qualsiasi forma possono generare disfunzioni immunitarie, sensoriali, neurologiche, motorie e comportamentali simili ai tratti che definiscono, o comunque associati ai disordini di tipo autistico (ADs), e che queste similarità si estendono a neuroanatomia, neurotrasmettitori, e biochimica (Gruppo di lavoro Ambientale; Kern and Jones 2006; Mutter et al. 2005; 2007; Zahir et al. 2005). In aggiunta, ricercatori dell'Istituto Nazionale per le scienze Ambientali statunitense (US National Institute of Environmental Health Sciences) (1999) e Nelson (1991) dall'Istituto Nazionale per la Sicurezza e Salute del Lavoro (NIOSH) dei Centri per il Controllo e la Prevenzione delle Malattie (Centers for Disease Control and Prevention) hanno descritto un ruolo dell'esposizione a Mercurio nella patogenesi dell'autismo. Il Collaborative on Health and the Environment's Learning and Developmental Disabilities (2008) ha pubblicato recentemente una dichiarazione di consenso che riporta come sia fuori discussione che l'esposizione a mercurio possa produrre disordini di tipo autistico. Presumibilmente, l'avvelenamento da mercurio è stato diagnosticato come autismo di eziologia ignota in certi casi, finché non è stato accertato l'avvelenamento da mercurio (Chrysochoou et al. 2003), e altri ricercatori hanno identificato incrementi significativi nei biomarcatori dell'intossicazione da mercurio in pazienti a cui era stato diagnosticato l'autismo (Geier e Geier 2006b, 2007b).

Una serie di recenti studi epidemiologici hanno rilevato una relazione significativa tra esposizione a mercurio da somministrazione di routine di farmaci contenenti Thimerosal (vaccini e preparati di immunoglobulina Rho(D)) ed un incrementato rischio di autismo e altri ritardi nel neurosviluppo (Geier e Geier 2006a, 2006c, 2007c; Geier et al. 2008; Marques et al., in stampa; Young et al., in stampa). E' stato anche riportato in studi clinici che quanto maggiore e precoce era l'esposizione cumulativa a mercurio da vaccini e sostanze contenenti Thimerosal tanto più clinicamente grave era l'autismo (Geier e Geier 2007a). In aggiunta, studi epidemiologici di esposizione a sostanze tossiche ambientali hanno rivelato che l'esposizione a Hg era un significativo fattore di rischio dose-dipendente per un bambino cui era stato diagnosticato l'autismo (Counter et al. 2002; Palmer et al. 2006, in stampa; Rury 2006; Windham et al. 2006).

Lo scopo del presente studio era di valutare il potenziale danno cellulare in vitro nei sistemi modello umani neuronali (SH-SY-5Y neuroblastoma e 1321N1 astrocitoma) e fetali (non trasformati), usando prove di vitalità cellulare ed immagini digitali catturate al microscopio e tecniche di valutazione. Inoltre lo scopo era anche di valutare potenziali danni cellulari indotti dal Thimerosal nel contesto di risultati patologici osservati in pazienti affetti da disordini di tipo autistico, così come di comparare danni cellulari indotti dal Thimerosal con altri composti metallici (alluminio solfato, piombo(II) acetato, metilmercurio idrossido e mercurio(II) cloruro) che erano documentati da altri ricercatori (Toimela e Tahti 2004; Waly et al. 2004) essere tossici per il neurosviluppo.

## **Conclusioni**

Il presente studio mostra il danno cellulare indotto dal Thimerosal nelle cellule neuronali e fetali in vitro in funzione della concentrazione e del tempo.

Il Thimerosal a concentrazioni nanomolari (miliardesimi di mole per litro, che corrisponde grosso modo a qualche decina di milionesimi di grammo per litro di etilmercurio) è stato in grado di indurre una significativa tossicità cellulare in cellule neuronali e fetali. La citotossicità cellulare indotta dal Thimerosal è simile a quella osservata in studi patofisiologici su pazienti affetti da autismo. Nella fattispecie, in entrambi i casi, c'è stata evidenza di disfunzioni mitocondriali, ridotta attività ossido-riduttiva cellulare, morte e degenerazione cellulare. Il presente studio ha anche rivelato che il Thimerosal è significativamente più tossico rispetto a diverse altre ben accertate tossine del neurosviluppo. Infine, futuri studi dovrebbero essere condotti per ulteriormente valutare meccanismi addizionali del danno cellulare indotto da Thimerosal e per accertare ulteriormente potenziali co-esposizioni che possano ridurre o amplificare la sua tossicità.