

L'inghippo delle basse dosi

Perché si ammalavano, a distanza di anni, lavoratori esposti a livelli di berillio non in grado di produrre tossicità acuta? Si capì che anche «**le basse dosi avevano una valenza patogena**», in particolare **nel lungo termine** provocavano un'attivazione patologica delle glicoproteine HLA e perciò malattie autoimmuni, sia sull'uomo che nelle cavie di laboratorio. Per cui a quel punto il limite ammissibile in ambiente di lavoro fu abbassato a 2 mcg/m³. Mentre il limite per tossicità (acute) da berillio, superato il quale erano evidenti e prevedibili gli effetti immediati del metallo su ogni essere umano, era di 1000 mcg/m³.

Sentite bene: i valori soglia per le esposizioni a basse dosi in grado di scatenare malattie croniche degenerative sono dell'ordine di 500 volte inferiori ai valori soglia degli effetti tossicologici acuti.

Sul cromosoma ci sono dunque molti pezzi (locus) che hanno qualcosa da dire (esprimono un certo tipo di glicoproteine cellulari). Voglio parlare di uno di importanza particolare. Quello sul braccio corto del cromosoma 6 che esprime le glicoproteine cellulari denominate HLA (human leucocyte antigen).

L'attivazione patologica dell'HLA è **un meccanismo che si differenzia da tutto ciò che è noto nel campo della pura tossicologia e della pura allergologia**: entriamo nel campo della immunotossicologia, servono basse dosi e il tempo di latenza, cioè tra l'inizio dell'esposizione e lo sviluppo della patologia infiammatoria, è dell'ordine dei decenni [Kriss 1993a].

Le ricerche di Hultmann [1994 & 1998], replicate da Nielsen [2002], hanno mostrato che inserire otturazioni di amalgama in denti di topini nel lungo termine produce un'accelerazione dei tempi per l'attivazione patologica delle glicoproteine cellulari HLA e, dunque, la comparsa di condizioni infiammatorie e autoimmuni croniche.

Non è uno scherzo, questo ricercatore delle “consegne” dei topini esiste, vedi: Polak [1968], Druet [1977], Druet [1982], Hultman [1987], Hultman [1989], Hultman [1992], Rossert [1992], Kubicka-Muranyi [1993], Mathieson [1993], Monestier [1994], Kiely [1995], Mathieson [1995], Prigent [1995], Warfvinge [1995], Bigazzi [1996], Gillespie [1996], Nadarajah [1996], Qasim [1996], Pollard [1997], Bagenstose [1998], Bigazzi [1999], Pollard [1999], Institoris [2001]. Intossicando i topi con le basse dosi di mercurio si riesce ad ottenere l'innescò patologico di malattie infiammatorie e autoimmuni HLA-mediate, cioè si ottengono modelli sperimentali di malattie.

Il non poter dire niente di male sulle basse dosi, su cui tanto hanno puntato i difensori dell'amalgama dentale, semplicemente si poteva formulare «perché non ne sono stati fatti di studi». Non ne esistono.

Per tutto questo tempo i fautori dell'amalgama hanno tenuto il campo dicendo: «Non ci sono studi che dimostrino eventuali potenzialità negative delle basse dosi croniche di mercurio», cercando inoltre di portare la diatriba su questo piano: voi dimostrateci che l'amalgama può causare intossicazione acuta da mercurio (in termini di rilascio e di effetti).

L'unica flebile critica che si poteva fare allora era: «Ma voi accettereste basse dosi di arsenico, somministrate per anni, visto che (in mancanza di studi in merito) niente si può dire sugli effetti?». Oppure a tutti gli altri di buona volontà non restava che presentare i casi in cui l'amalgama provocava gli effetti del mercurio secondo gli standard della tossicologia acuta (ma rimaneva allora da spiegare la presenza di altri con amalgama apparentemente senza problemi mercuriali).

Dando questo rompicapo agli oppositori dell'amalgama (dimostrateci voi qualcosa, dimostrateci che l'esposizione a basse dosi è uguale a quella acuta), certo hanno tenuto bene il campo dietro questa trincea "dialettica".

Le basse dosi di mercurio nell'essere umano aumentano l'incidenza di malattie nella popolazione esposta. Riguardo agli effetti tossici delle basse dosi di mercurio rilasciate dall'amalgama dentale, Mark Richardson, intervistato nel 1996 dal programma "Decouverte" spiegava: "Tutte le persone esposte a livelli seppur molto sottili di mercurio dentale subiscono un certo indebolimento delle funzioni cognitive ed ereditano inoltre vari problemi durevoli. E' molto sottile, ma è là. Questi effetti sono scientificamente dimostrabili". E qui il ricercatore canadese si riferisce all'analisi dei rischi basata su dati e ricerche scientifiche disponibili (che una commissione di 18 esperti guidata da Philip D. Neufeld ha definito molto valida).

Le basse dosi di mercurio nell'essere umano aumentano l'incidenza di malattie nella popolazione esposta!

In uno studio epidemiologico su 35.000 (per una spesa del progetto di 120 milioni di dollari, National Health and Nutritional Exam Survey 3, noto con la sigla di NHANES III) furono raccolte 6000 diverse informazioni mediche mediante questionario e successivo accertamento medico. L'intenzione non era una ricerca sull'amalgama, ma la International Academy of Oral Medicine and Toxicology ha fatto notare: «Ma ci sono anche i dati sulle otturazioni di amalgama?» e se sì, allora mettiamoli in grafico contro l'incidenza di malattia cronica.

Risultato: al variare del numero di otturazioni di mercurio aumentava il tasso di malattia cronica [Zeimer 2002]! (<http://www.vimy-dentistry.com/nhanesstudy.htm>)

L'incidenza di malattia in portatori di 7 o più amalgami in media è del 25%, scende al 22% in chi ha da 4 a 6 amalgami, 18% con 2-3 amalgami, 15% con 1 amalgama. Essendo l'incidenza di malattia in media del 20%, questi dati epidemiologici su 35.000 individui sopra i 17 anni evidenziano che portatori di 4 o più amalgami sono sottoposti ad un crescente contributo dell'amalgama all'incidenza di malattie. Per alcune categorie il contributo è maggiore che non per altre (l'effetto più consistente dell'amalgama dentale appare per malattie a carico dell'apparato genito-urinario). Per intenderci, questo è lo studio epidemiologico più vasto e costoso in assoluto della storia e i suoi risultati contro l'amalgama sono "D E F I N I T I V I".

AMALGAMA e AUTOIMMUNITÀ

Abstract

Il mercurio rilasciato dalle otturazioni dentali di amalgama può portare a patologie autoimmuni sia in topi che presentano geni associati con una suscettibilità specifica al mercurio, sia in topi con un'incidenza multipla di geni correlati con autoimmunità sistemica.

La possibilità che il mercurio dentale possa avere un ruolo nello sviluppo dell'autoimmunità nell'uomo è stata suggerita in una serie di recenti studi e viene discussa in questo articolo.

Autoimmunità e mercurio: studi umani e sperimentali

E' noto che la somministrazione di mercurio può causare patologie autoimmuni in tutte le specie animali [Polak 1968, Druet 1977, Druet 1982, Hultman 1987, Hultman 1989, Hultman 1992, Rossert 1992, Kubicka-Muranyi 1993, Mathieson 1993, Monestier 1994, Kiely 1995, Mathieson 1995, Prigent 1995, Warfvinge 1995, Bigazzi 1996, Gillespie 1996, Nadarajah 1996, Qasim 1996,

Pollard 1997, Bagenstose 1998, Bigazzi 1999, Pollard 1999, Institoris 2001, Nielsen 2002]. Una valutazione del substrato immunogenetico delle cavie di laboratorio è però necessaria. Nei topi con geni suscettibili, il mercurio può indurre una notevole attivazione immunitaria con susseguente produzione alterata di citochine e comparsa di auto-anticorpi [Bagenstose 1999]. Nella seconda fase di questa patologia autoimmune prodotta in animali di laboratorio ci possono essere vasculiti diffuse necrotizzanti leucocitoclastiche con coinvolgimento di polmoni, pelle, membrane mucose, pancreas, fegato e intestino, con danni tissutali particolarmente marcati nel tratto dell'intestino cieco.

L'inserimento di otturazioni in amalgama nei denti determina un significativo aumento, da 6 a 130 volte, delle concentrazioni di mercurio in vari organi delle cavie, che però nei topi Lewis (LE), resistenti all'autoimmunità indotta dal mercurio, non causa né alterazioni immunologiche né un aumento significativo di IgE nel plasma. Il contrario è vero per i topi Brown-Norway (BN), di cui è nota la suscettibilità all'autoimmunità indotta dal mercurio. [Hultmann 1998]. Dopo l'inserimento di amalgama nei denti, questi animali inizialmente mostrano un'attivazione immunogenetica (aumento dell'espressione delle molecole MHC di classe II), seguita da un picco di iper-immunoglobulinemia, poi sviluppano la seconda fase della sindrome autoimmune caratteristica dei topi BN trattati con mercurio. Entro il periodo da 10 settimane a 6 mesi gli animali mostrano auto-anticorpi antinucleolari e depositi sistemici di immunocomplessi (in particolare nei glomeruli renali e nelle pareti vascolari degli organi interni). Il carico di mercurio dalle otturazioni di amalgama usate negli studi su topi è equivalente al carico di mercurio cui in media l'uomo adulto è esposto dalle sue otturazioni di amalgama [Hultman 1994]: "Se ne conclude che in appropriate condizioni di suscettibilità genetica e adeguato carico corporeo l'esposizione a metalli pesanti dall'amalgama dentale possa causare una stimolazione cronica del sistema immunitario che porta ad aberrazioni immunologiche e ad autoimmunità manifesta."

Studi umani hanno confermato che il mercurio inizia un'attivazione non-specifica del sistema immunitario e ha l'abilità di modificare la produzione di citochine in vitro e in vivo. In individui con rischio di esposizione professionale ai vapori di mercurio metallico, il mercurio determina un impatto negativo sull'immunità umorale e porta ad una maggiore produzione di IgE totali, persino in individui con concentrazioni urinarie di mercurio entro i limiti considerati tollerabili in ambiente di lavoro [Bencko 1990, Cardenas 1993, Queiroz 1994, Dantas 1997].

Lo sviluppo dell'autoimmunità viene correlato con l'esposizione al mercurio in numerose pubblicazioni scientifiche tra cui studi epidemiologici e casi clinici di esposizione iatrogena (preparazione farmaceutiche a base di mercurio), accidentale o professionale al mercurio nei quali si dimostra chiaramente che il mercurio può produrre reazioni autoimmuni o depositi sistemici di immunocomplessi [Barr 1990, Roger 1992, Schrollhammer-Benlender 1992].

È stato osservato che immunocomplessi circolanti possono apparire, ed eventualmente in seguito scomparire, nel siero di lavoratori esposti a vapori di mercurio metallico, ma senza manifestazioni cliniche di una sindrome autoimmune [Stonard 1983]. Anticorpi antilaminina possono svilupparsi in lavoratori esposti al mercurio metallico [Lauwerys 1983], e i livelli di IgA, IgG e proteine della fase acuta possono diventare elevati nel sangue periferico [Bencko 1990].

Una maggiore incidenza di auto-anticorpi è stata osservata in lavoratori con rischio di esposizione a vapori di mercurio, e questi includono anticorpi contro la membrana basale dei glomeruli nel 54%, contro le pareti vasali nel 65% e contro la muscolatura liscia nel 50% [Kolenic 1993]. Questi risultati indicano un'alterazione del sistema immunitario in lavoratori cronicamente esposti.

Attivazione immunogenetica HLA mediata

Se valutiamo esposizioni croniche a basse dosi di tossicità nell'arco di tempo della vita di un organismo, tra le cose più gravi che possono avvenire l'esposizione antigenica cumulativa ci sono

prima una deplezione del sistema immunitario (immunosoppressione), poi il confronto che si sposta a livello delle cellule di presentazione degli antigeni di classe II, con comparsa di un'espressione aberrante dei marcatori HLA-DR in tessuti o organi vitali. A partire da tale manifestazione patologica, quelle che precedentemente erano vitali cellule del sistema immunogenetico acquistano le caratteristiche di elementi estranei, di qui l'aggressione ordinata contro di loro dal sistema immunitario, e il punto di partenza di una patologia autoimmune diversa a seconda dell'organo aggredito.

Da questa descrizione appare tutta l'importanza dell'insieme delle cellule immunocompetenti, il cui fine è quello di realizzare uno sbarramento e la cui ricchezza qualitativa e quantitativa di determinanti di membrana serve proprio ad attirare in modo preferenziale gli intrusi ed operare lo sbarramento. Lo scopo è di difendere i fenotipi della membrana nucleare, delle vescicole lisosomiali e della parete del reticolo endoplasmatico.

Nei casi più semplici, l'antigene verrà riconosciuto e, se non è particolarmente aggressivo e non è presente in quantità eccessiva, verrà arrestato a livello delle cellule di immunità naturale, cioè eliminato per endocitosi o fagocitosi non specifiche, ad esempio dei neutrofili circolanti. A questo livello, difesa e digestione si confondono nella stessa nozione-funzione di fagocitosi, come avviene negli esseri unicellulari.

In caso che dopo il riconoscimento dell'antigene venga richiesto un impegno più consistente, l'aggressore entrerà in contatto con cellule maggiormente specializzate, i macrofagi, i linfociti T e B, le cellule immuno-competenti prodotte da tali linfociti.

Se procediamo nella scala dell'evoluzione in ordine di dimensioni, osserviamo la comparsa di cellule con funzione citotossica che sono i precursori dei nostri linfociti T. In seguito nei vertebrati faranno la loro comparsa delle cellule in grado di combattere l'avversario a distanza. Questa 'artiglieria', che consente di risparmiare i difensori delegati al corpo a corpo, consiste di linfociti B, che innescano la produzione di anticorpi specifici, alleggerendo le fila degli assalitori in preparazione dell'ultimo corpo a corpo che sarà sostenuto dalla 'fanteria' dei linfociti T citotossici, dei macrofagi e dei neutrofili.

Differenziazione del substrato immunogenetico

Le ricerche di Hultmann [1994 & 1998], replicate di recente da Nielsen [2002], hanno mostrato che gli accumuli sistemici del mercurio derivante dall'amalgama possono causare in topi BN un'alterata espressione di molecole MHC, il che porta ad infiammazione cronica e alterazioni immunologiche, ma non in topi LE. La differenza principale tra le due razze di topi BN e LE è nel complesso maggiore di istocompatibilità (Major Histocompatibility Complex, MHC), in particolare negli aplotipi H-2 (cioè queste due famiglie di topi hanno ognuna una serie identica di alleli).

Le molecole MHC sono glicoproteine integrate nella membrana cellulare di praticamente tutte le cellule dell'organismo. Sono questi i recettori di membrana coinvolti nella maggior parte delle comunicazioni tra le componenti del sistema immunitario. La ricerca ha anche mostrato che gli MHC sono implicati nel controllo dell'autoimmunità nell'uomo e in tutte le specie di animali.

Per essi si usa il termine di 'locus genetici MHC' o anche 'geni MHC', anche se quest'ultima espressione è fuorviante, infatti sono locus di antigeni, non geni. I primi sono espressione diretta dei secondi.

La diversità dei geni MHC ha delle conseguenze in termini di suscettibilità alle diverse malattie. I topi LE sono sensibili all'induzione di condizioni sperimentali autoimmuni quali l'encefalite allergica, l'uveite autoimmune, la poliartrite cronica, mentre i topi BN sono resistenti. D'altro canto i topi BN sono sensibili all'induzione di linfadenopatie, morbo di Sjogren, produzione di

autoanticorpi diretti contro la mieloperossidasi, glomerulonefriti e altre vasculiti sistemiche, al contrario dei topi LE che sono resistenti allo sviluppo di queste patologie.

Nei topi BN il mercurio provoca una notevole induzione policlonale, mentre nei topi LE causa immunosoppressione. Infatti, a seguito dell'esposizione al mercurio i topi LE hanno una capacità di regolamentazione dell'espressione degli MHC di classe II molto buona, che parte già dal sesto giorno dopo l'esposizione, mentre nei topi BN la stessa cosa avviene solo dopo 60 giorni. Ciò potrebbe essere influenzato dal fatto che i topi BN hanno molecole MHC che esprimono preferenzialmente una risposta Th2, al contrario dei topi LE che mostravano una risposta preferenziale di tipo Th1.

Nelle reazioni autoimmuni alcune sequenze di molecole sono riconosciute (cioè presentate sulla membrana cellulare dai locus genetici MHC) e attaccate dalle cellule iperattive. Nella miastenia, per esempio, vengono prodotti autoanticorpi contro l'acetilcolina. Ebbene i topi BN e i topi LE, in virtù di diversi geni MHC, riconoscono 2 epitopi diversi dell'acetilcolina, mentre l'ibrido BN* LE invece riconosce entrambi gli epitopi.

Nell'organismo umano la mappatura del complesso MHC corrisponde ai geni del braccio corto del cromosoma 6 (della lunghezza di circa 4 Mb di DNA) e prende il nome di sistema HLA. I fenotipi HLA sono composti generalmente da due sub-unità dette alleli.

L'insieme degli HLA di classe I e di classe II di un organismo può essere considerato l'impronta digitale della sua identità immunogenetica. Infatti, essendoci un altissimo grado di polimorfismo, non se ne troveranno due identici in un miliardo di individui (di qui il cosiddetto 'test del DNA', a supporto di indagini di polizia o anche per la valutazione della paternità).

Gli HLA di classe I sono presenti su tutte le cellule nucleate tranne che le cellule embrionali e le cellule sessuali (le uniche cellule del nostro organismo che non sono nucleate sono i globuli rossi).

Gli HLA di classe II sono presenti sulle cellule destinate alla funzione di presentazione degli antigeni che includono i macrofagi, le cellule di Langerhans della pelle, le cellule di Kupffer del fegato, gli astrociti, etc.

È importante la caratterizzazione delle molecole HLA anche perché, quando si va ad indagare più da vicino, si scopre che alcuni alleli, in virtù delle proteine che contengono, hanno proprietà di presentazione relativamente a certi antigeni (ad es. mercurio) superiori a quelle di altri, dunque un certo substrato immunogenetico sarà suscettibile al mercurio, un altro solo al berillio, e così via.

Inoltre, l'analisi della popolazione allelica HLA può rivelare combinazioni di fenotipi associati a determinate condizioni autoimmuni e dunque rivelare eventuali suscettibilità del paziente. Oggi la tipizzazione tissutale è una pratica abbastanza di routine nei casi di sindromi autoimmuni in quanto l'esame HLA può evitare ritardi nella diagnosi o diagnosi errate.

La spondilite anchilosante, per fare un esempio, è correlata con il fenotipo HLA B27 così nettamente che la tipizzazione del B27 è usata di routine per la conferma diagnostica di questa patologia autoimmune. Il B27 aumenta il rischio relativo per la spondilite anchilosante di 150 volte nei portatori rispetto ai non portatori.

La correlazione degli HLA con la malattia può essere molto più complessa di questo, per esempio nel diabete di tipo I individui suscettibili sono coloro nei quali si combinano DR4 e DQ8 o in coloro nei quali si combinano DR3 e DQ2; oppure nella sclerosi multipla ci sono diversi HLA-DR fortemente predisponenti, e anche diversi HLA-DQ predisponenti, infine ci sono anche HLA protettivi.

Gli alleli infatti possono essere anche protettivi: per esempio è stato mostrato che individui con HLA B53 resistono alla malaria molto bene o soffrono solo sintomi lievi in confronto con individui senza l'HLA B53.

La dose: tossicità acuta vs esposizione cronica a basse concentrazioni

Nelle patologie autoimmuni (o meglio, nei meccanismi attivati a livello immunogenetico), oltre al ruolo del locus HLA è fondamentale sottolineare che l'attivazione avviene ad un *valore soglia associato con gli effetti immuno-tossici* che è di molto inferiore al *valore soglia associato con effetti tossici*.

Nel caso dell'autoimmunità da berillio gli effetti immuno-tossici di questo metallo insorgono ad un valore soglia che è 500 volte più basso di quello associato con effetti tossici.

Inizialmente, per il berillio, si vide che gli effetti della tossicità diretta (polmonite da intossicazione) insorgevano in quasi tutti i lavoratori esposti a più di 1000 mcg berillio /m³ e in nessuno di quelli esposti a meno di 100 mcg/m³ [Stern 1951].

Con gli anni le osservazioni sui lavoratori esposti al berillio riportarono da una parte un'elevata sensibilità di alcuni individui, dall'altra la mancanza di berilliosi in altri che erano esposti a livelli di diversi ordini di grandezza superiori [Stern e Eisenbud 1951]. In base a ciò fu ipotizzato che la berilliosi fosse una reazione immunitaria con una componente genetica. Studi su animali di laboratorio hanno confermato ciò. L'inalazione di berillio causa granulomi di natura autoimmune in topi A/J, ma non in topi BALB/c o topi C57B1, che hanno diversi geni MHC di classe II [Huang 1992]. Lo stesso si verificava con maialini di guinea [Barna 1984].

Negli anni Ottanta gli studi sul substrato immunogenetico vennero allargati all'uomo e divenne noto il meccanismo immunotossico per cui l'azione del berillio poteva anche venir mediata dalla presenza di certe molecole HLA. Pazienti con berilliosi rispondono all'esposizione al berillio con una proliferazione dose-dipendente ristretta da geni HLA, che porta ad una risposta dei linfociti T specifici del berillio, ma gli stessi pazienti non rispondono all'esposizione con antigeni di richiamo o altri metalli [Saltini 1989, Fontenot 1998]. In altre parole, le cellule T rispondono solo all'antigene (in questo caso il berillio o qualche complesso berillio- proteina) in associazione con alcune molecole HLA di classe II sulla superficie delle cellule che operano la presentazione dell'antigene. Questo requisito genetico è noto come 'restrizione di classe II', e vale solo per gli antigeni solubili (es. Be₂+), non per mitogeni nonspecifici.

A quel punto la soglia tollerabile di esposizione professionale al berillio fu posta a meno di 2 mcg/m³.

La stessa differenziazione ('tossicità' e 'immunotossicità') va fatta per il mercurio [Berlin 2003], gli studi disponibili mostrano che "le quantità di mercurio rilasciate dall'amalgama dentale rientrano nel range che comporta reazioni sistemiche autoimmuni in una percentuale della popolazione con suscettibilità genetica" [Berlin 2003, Istituto di Sanità Svedese].

A parte il caso del berillio, la tipizzazione tissutale (esame dell'HLA) ha permesso ai ricercatori di raccogliere una gran mole di informazioni sulle basi genetiche della risposta immunitaria nell'uomo. Una rassegna del contributo dell' HLA nelle patologie autoimmuni è disponibile nell'articolo di Rhodes [1999].

In condizioni patologiche, in special modo dopo un attacco virale o esposizione prolungata a un metallo come il mercurio o berillio, alcune cellule di uno dei nostri organi possono manifestare un'espressione aberrante dei marcatori HLA-DR. La manifestazione patologica dei marcatori di classe II conferisce a queste cellule le caratteristiche di cellule estranee, di qui la loro aggressione da parte del sistema immunitario e il punto di partenza di una patologia autoimmune diversa a seconda dell'organo aggredito.

Come esempio citiamo il modello sperimentale di retinite sperimentale: se si inietta nella zampa di una cavia un estratto di retina insieme con bacillo della pertosse ucciso e un coadiuvante per l'autoimmunità (di solito quello di Freund che consiste in materiale batterico ricchissimo di siti

antigenici), all'8° giorno sulle cellule dell'epitelio pigmentario e sull'endotelio dei vasi sanguigni appare l'antigene Ia del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II, l'equivalente dei marcatori HLA-DR dell'uomo. Poco dopo si ha un fenomeno di degranolazione dei mastociti della coroide per la messa in azione degli IgE, da qui edema della retina, e infine una uveite diffusa.

Negli ultimi anni è stato possibile identificare il ruolo di diversi meccanismi nell'autoimmunità indotta da metalli:

1. presenza di HLA con una particolare suscettibilità verso un certo metallo;
2. cluster di HLA associati con una certa forma di autoimmunità;
3. immuno-compromissione da metalli e infezioni ricorrenti: ruolo nell'autoimmunità;
4. capacità del metallo di alterare l'immuno-omeostasi dell'organismo e dunque di facilitare e accelerare la progressione autoimmune;
5. modalità di distribuzione del metallo nell'organismo.

Gli studi finora pubblicati sono riusciti a identificare e chiarire i contributi di questi 5 meccanismi singolarmente, ma quando si vanno a valutare gli effetti combinati di 2 o più di questi fattori la complessità cresce esponenzialmente e con essa la mole di dati da raccogliere per poter arrivare a informazioni significative.

Con tutti questi meccanismi coinvolti, non stupisce che per la maggior parte delle condizioni autoimmuni non si riesca a determinare con certezza l'origine della malattia o, come nel caso della berilliosi, ci vogliono 50 anni prima di arrivare a ciò.

1. Presenza di HLA con una particolare suscettibilità verso un certo metallo

La letteratura medica prodotta relativamente a lavoratori esposti professionalmente al berillio chiarisce in modo importante la questione della presenza di HLA con una particolare suscettibilità verso un certo metallo.

Richeldi [1993] ha notato che a partire da studi di interazione struttura- funzione delle molecole MHC di classe II, è possibile dimostrare la correlazione tra suscettibilità a berilliosi e alcune caratteristiche degli aminoacidi che svolgono un ruolo critico nel legare lo ione berillio.

È stata dimostrata una forte correlazione tra lo sviluppo di berilliosi in lavoratori esposti al berillio e l'allele DP 1 (della regione MHC di classe II), che ha una molecola di glutammato alla posizione 69. Questo marker è stato trovato nel 97% dei lavoratori che sviluppavano berilliosi, ma solo nel 32% dei lavoratori similmente esposti ma senza berilliosi. Più di un allele HLA-DP 1 può essere ritrovato nell'esame dell'HLA di individui sensibilizzati al berillio [Stubbs 1996]. A conferma del ruolo chiave dei locus del complesso MHC, alcuni ricercatori hanno mostrato che anticorpi anti-HLA-DR bloccavano la proliferazione dei linfociti specifici del berillio.

Tutto ciò sarebbe consistente con l'ipotesi che nell'autoimmunità indotta da metalli il metallo possa attaccare direttamente il sito MHC, cosa che è stata indicata anche per il mercurio. Il mercurio ha una tossicità selettiva per alcune molecole MHC [Warbrick 1995]. Bigazzi mostra che in alcune circostanze il mercurio si lega direttamente a molecole MHC di classe II, senza precedente modulazione da parte delle cellule che presentano l'antigene, e causa espressione aberrante del complesso MHC di classe II. Relativamente al sistema MHC nell'uomo, è nota la reattività insolitamente elevata dell'HLA B27 a seguito dell'esposizione in vitro al mercurio, che dipenderebbe dalla presenza sul B27 di una cisteina spaiata che è particolarmente reattiva ai metalli pesanti [MacLean 1992].

La questione del controllo genetico vale per la sensibilizzazione a diversi metalli. È possibile sensibilizzare con cromo e berillio ma non con mercurio i maialini di guinea del tipo 'Strain-2'. D'altra parte i maialini di guinea del tipo 'Strain-13', che differiscono da quelli 'Strain-2' solo per il

locus Ia del MHC, mostrano una discreta incidenza di sensibilizzazione al mercurio ma non al cromo o al berillio [Polak 1968].

Indagini che confermino questi riscontri anche nell'uomo non sempre sono disponibili. Contrariamente agli studi su animali, gli immunogenetisti possono intervenire solo in casi di esposizioni professionali o accidentali, come per esempio lavoratori esposti a berillio o ad amianto, e dunque per motivi etici la ricerca per elucidare le correlazioni di molecole HLA con gli insulti ambientali procede molto più a rilento. E così esiste un'ampia letteratura sulla caratterizzazione dell'HLA, ma solo nel senso che evidenzia la correlazione nell'uomo tra i diversi alleli HLA e tutta una serie di malattie autoimmuni.

Oggi i casi di esposizioni di entità grave al mercurio sono infrequenti, non come un tempo, quando intossicazioni acute al mercurio erano la norma tra la popolazione generale che usava tutta una serie di unguenti mercuriali, o anche lassativi o altre preparazioni farmacologiche, e anche tra i lavoratori esposti al rischio del mercurio perché i controlli e le limitazioni in ambiente di lavoro erano meno stringenti. Ma nel passato non era possibile integrare lo studio di queste situazioni (per esempio vasculiti sistemiche indotte da esposizioni tossiche al mercurio) con le informazioni derivanti dall'indagine immunogenetica, e dunque a tutt'oggi i dati raccolti sono praticamente nulli.

Visto che oggi l'amalgama dentale è riconosciuta come la maggiore fonte di esposizione a vapori di mercurio nella popolazione generale e vista la generale diffusione di validi strumenti d'indagine immunogenetica, possiamo prevedere che lo studio della patologia da amalgama fornirà nei prossimi decenni le informazioni mancanti proprio come è successo per il berillio.

Il lavoro che ora attende gli immunogenetisti è di andare a condurre studi per identificare gli alleli HLA che implicano la suscettibilità al mercurio e i casi di autoimmunità indotti da amalgama forniscono probabilmente l'unica occasione per fare ciò.

Già Procházková [1998] ha recentemente documentato un'incidenza significativamente più elevata rispetto alla popolazione generale degli HLA B37, B47 e DR4 in 25 individui con storia clinica di reazioni all'amalgama e reazione positiva di ipersensibilità al mercurio rilevata mediante test MELISA.

"I risultati di questo studio preliminare sull'uomo supportano l'ipotesi del substrato genetico dell'intolleranza al mercurio. L'associazione tra suscettibilità al mercurio e gli antigeni del complesso maggiore di istocompatibilità è valida non solo nei modelli animali ma anche nell'essere umano. Per confermare questa ipotesi ulteriori indagini sono necessarie" [Procházková 2000].

2. cluster di geni HLA associati con una certa forma di autoimmunità

Il mercurio accumulato nei tessuti di un organismo ad un certo punto provocherà esacerbazioni di condizioni autoimmuni anche in assenza di geni suscettibili al mercurio. Questi sono i risultati delle ricerche di Pollard [1999 e 2001].

Il meccanismo coinvolto è diverso da quello evidenziato con l'esempio del berillio, che prevedeva la presenza di molecole MHC specificatamente suscettibili solo al metallo in questione.

I topi del tipo BXSB non hanno aplotipi H-2 suscettibili al mercurio ma hanno una combinazione di molecole MHC che porta ad una maggiore suscettibilità all'autoimmunità sistemica. Il mercurio ha un effetto importante sull'insorgenza dell'autoimmunità in questi topi [Pollard 2001]. Il livello delle manifestazioni immunopatologiche dipende dal grado di suscettibilità all'autoimmunità determinata dalla combinazione di MHC.

È noto che in caso di topi con molecole MHC suscettibili all'attacco del mercurio, l'esposizione a bassi livelli di mercurio porterà alla sequela immunopatologica che include linfoproliferazione, ipergammaglobulinemia, una risposta immune di tipo predominante Th2 che porta a depositi da

immunocomplessi per lo più nei glomeruli renali, ma anche nelle pareti arteriali a carico di organi multipli.

Nel caso dei topi del tipo BXSB, le sottoclassi di auto-anticorpi prodotti a seguito dell'esposizione al mercurio erano indicativi di una malattia idiopatica non del tipo Th2 (che caratterizza l'autoimmunità nei portatori di geni suscettibili al mercurio) ma di tipo Th1 predominante.

In pratica il problema della minore tolleranza a esposizioni prolungate di mercurio riguarderà non solo il sottogruppo della popolazione generale con geni specifici di suscettibilità al mercurio, ma anche i sottogruppi di individui con incidenza multipla di MHC che aumentano la suscettibilità verso determinate patologie autoimmuni.

Se il primo sottogruppo è difficilmente identificabile, vista la scarsità di informazioni nell'uomo delle molecole MHC suscettibili al mercurio, il secondo sottogruppo è facilmente identificabile vista la gran mole di dati che correlano i singoli geni MHC nell'uomo alle varie condizioni autoimmuni.

Rimane da chiarire il o i meccanismi coinvolti.

Una possibile spiegazione è la tossicità dose-dipendente del mercurio sul sistema citocromo P450 e altri sistemi enzimatici che sono responsabili per la disintossicazione xenobiotica (N-acetyl transferase-2, NAT-2). Osservazioni di von Schmiedeberg [1999] mostrano che alterazioni in questi due sistemi enzimatici sono altamente correlate con la sclerosi sistemica e il lupus eritematoso e che si può ipotizzare che il calo di difesa xenobiotica porti ad un aumento nella formazione di metaboliti reattivi che possono portare ad una presentazione alterata delle proteine del self **e dunque stimolare cellule T autoreattive che inducono autoimmunità.**

Le osservazioni importanti di Pollard essenzialmente sono due:

1. la comparsa e l'entità sia delle caratteristiche sia umorali che cellulari dell'autoimmunità sistemica si correlano con il livello di esposizione al mercurio;
2. il nichel, al contrario del mercurio, non esacerbava l'autoimmunità.

Entrambe queste osservazioni sarebbero compatibili con il meccanismo qui proposto, anche se non si può escludere il coinvolgimento parallelo di altri meccanismi.

3. immuno-compromissione da metalli e infezioni ricorrenti: ruolo nell'autoimmunità

Il mercurio accumulato nel corpo è capace di sostenere infezioni croniche. Il suo ruolo in tal senso è ben documentato, in particolare il mercurio ha l'abilità di deprimere il sistema immunitario.

In questo modo l'esposizione cronica a basse dosi di mercurio dentale potrebbe contribuire allo sviluppo di un ampio range di condizioni autoimmuni, infatti tra gli insulti ambientali che possono scatenare l'autoimmunità, il ruolo dell'esposizione a batteri e virus in alcuni casi è stato ampiamente dibattuto e documentato.

Vediamo un esempio. Il morbo di Lyme è una patologia autoimmune la cui eziologia infettiva è stata stabilita chiaramente. Zamm [1991] segue un caso clinico con un'ostinata serie di recidive del Lyme, nel quale il paziente migliorò solo dopo che le sue otturazioni di mercurio furono rimosse.

4. Alterazione dell'omeostasi immunitaria e autoimmunità

Uno dei meccanismi per cui i metalli possono interferire a livello immunologico è mediante l'alterazione dell'omeostasi immunitaria, in particolare l'esposizione cronica a bassi livelli di composti del mercurio porta ad intossicazione dei linfociti T.

Le cellule trattate con mercurio mostrano una grave deplezione delle riserve intracellulari di tioli, indicazione questa che le cellule sono in uno stato di stress ossidativo. Da un punto di vista clinico, ciò può portare ad effetti insidiosi associati con una funzione immunitaria depressa [Guo 1998].

Il tempo di latenza affinché i metalli riescano in tal modo a deteriorare le difese immunitarie coincide con l'osservazione di un tempo di latenza tra esposizione cronica a metalli e comparsa di sindromi autoimmuni.

Una teoria sull'eziologia della SM è che quando i livelli di linfociti T-8 suppressor diminuiscono, i livelli di IgG aumentano, gli immunocomplessi circolanti aumentano, questi sono presentati sempre in maggior numero nel sistema nervoso centrale, al che segue una iper-reazione del sistema immunitario contro il tessuto nervoso, e in pratica ciò significa lesioni sclerotiche [McDonald 1986]. Infatti uno degli indici diagnostici della SM sono gli elevati livelli IgG nel fluido cerebrospinale. I linfociti T8 suppressor contribuiscono a controllare il sistema immunitario; è stato provato che quando i linfociti T-8 suppressor sono ridotti, i livelli di IgG aumentano [Roitt 1980].

Siblerud [1990] evidenzia una notevole differenza, in termini dello stato del sistema immunitario, tra chi aveva fatto rimuovere le otturazioni di amalgama e chi non le aveva rimosse. In particolare i livelli totali di linfociti T e di linfociti T-8 suppressor erano significativamente più bassi nel gruppo di pazienti con sclerosi multipla che avevano l'amalgama, rispetto al gruppo di pazienti che aveva eliminato l'amalgama.

Eggleston all'Università del California del Sud ha mostrato che quando le otturazioni di amalgama erano rimosse da 4 volontari, il numero di cellule T-4 helper aumentava del 50%. Le cellule T-4 helper ricoprono un ruolo importante nel processo di protezione immunitaria che difende da organismi patogeni intrusi. Reinserendo di nuovo l'amalgama i livelli di cellule T-4 helper si riducevano di nuovo del 50%. Infine l'amalgama dentale veniva di nuovo rimossa e le cellule T-4 helper immediatamente recuperavano questa perdita del 50%.

Per quanto riguarda i linfociti Natural Killer (NK), una recente rassegna della letteratura mostra che essi regolano le infiammazioni e hanno un ruolo di supporto nel mantenimento della omeostasi immunitaria entro i limiti non patologici [Flodstrom 2002].

I livelli e la funzione dei NK sono ridotti in numerose patologie autoimmuni [Minato 1987]. L'uso di agenti immunoterapici per elevare i livelli di NK è stato suggerito per ridurre le ricadute di varie forme di autoimmunità [Sharif 2001]. Infatti una normalizzazione di questi linfociti potrebbe andare a vantaggio di un miglior controllo delle gravi anomalie autoimmuni in corso.

È noto che l'omeostasi immunitaria dipende da un delicato equilibrio del rapporto T4/ T8, normalmente tra valori di 1.8 e 2.1 [Aiuti 1982, Cagnoli 1982, Leung 1981, Faure 1982, Butler 1982]. **Se questo rapporto diventa minore di 1.8:1 o maggiore di 2:1, ciò può predisporre a patologie autoimmuni** quali lupus eritematoso sistemico, anemia emolitica, sclerosi multipla, grave eczema atopico, malattia infiammatoria dell'intestino e glomerulonefrite [Reinherz 1980, Morimoto 1980, Stingl 1981, Chatenoud 1981, Leung 1981, Frazer 1982, Cagnoli 1982, Butler 1982, Traugott 1983].

L'immunologo belga Marichal [1990] riporta tutta una serie di casi in cui erano stati osservati livelli del rapporto CD4/ CD8 più bassi della norma prima ancora della manifestazione clinica dell'autoimmunità. Egli scrive:

"Le fasi che ho notato nella progressione della patologia sono:

- 1. paziente sano con valore CD4/ CD8 nella norma,*
- 2. paziente con basso CD4/ CD8,*
- 3. paziente con progressione clinica dell'autoimmunità e valore CD4/ CD8 che ritorna normale o ai limiti inferiori del range".*

Si passa cioè da una *fase 2* di confronto con infezioni, che tipicamente ha ridotti CD4 ed elevati CD8, ad una *fase 3* di autoreattività che tipicamente ha CD4+ aumentati e CD8 in calo.

Marichal continua scrivendo:

"I soli pazienti con patologia autoimmune che presentano un rapporto CD4/ CD8 molto inferiore al range normale sono quelli in cui la comparsa dei sintomi è recente.

In seguito ad alcuni casi che hanno reagito con guarigione all'immunoterapia omeopatica, ho osservato che questi tre momenti sono percorsi all'indietro prima del miglioramento clinico del paziente.

Cioè prima della regressione della condizione autoimmune e della scomparsa dei sintomi si nota uno sbalzo del rapporto CD4/ CD8, con abbassamento.

Questo abbassamento è determinato dal ritorno ad un maggior controllo da parte dei CD8 citotossici e una riduzione delle popolazioni di linfociti precedentemente attivati in modo autoreattivo".

Marichal conclude: *"Grazie ad una terapia adeguata è possibile tornare indietro nel tempo: di fatto molti pazienti sono passati dalla fase autoimmune in cui si trovavano a quella di immunodeficienza. Il metodo di agopuntura di Voll, che misura i fenomeni energetici e le loro modificazioni, annuncia tale favorevole evoluzione; anche la clinica segue il medesimo percorso, ma più tardivamente.*

Ad un certo punto il paziente nella fase di immunodeficienza attingerà al proprio capitale energetico per ristabilire l'equilibrio attraverso il manifestarsi di febbre e sintomi di tipo infettivo.

Molto spesso la comparsa di una patologia di questo tipo prelude ad un'evoluzione verso la guarigione".

5. Distribuzione dell'antigene

In una patologia auto-immune come la berilliosi, la distribuzione del berillio nell'organismo di lavoratori esposti è limitata dal fatto che le particelle di berillio inalate rilasciano lo ione berillio nella regione dei polmoni, e ciò limita in tale sede la reazione autoimmune.

Poiché le condizioni autoimmuni indotte dai metalli sembrano coinvolgere la produzione locale di auto-anticorpi nella zona in cui si deposita l'antigene, è importante notare la capacità del mercurio rilasciato dall'amalgama dentale di diffondere a multipli organi, finanche al sistema nervoso centrale (SNC).

Nel caso dell'amalgama infatti, le seguenti osservazioni sono state evidenziate esponendo ratti alla polvere prodotta dalla lucidatura: il mercurio è quasi immediatamente assorbito nel flusso sanguigno dove esso ha una brevissima emivita a causa del rapido passaggio ai tessuti; cuore, fegato, cervello, tiroide, polmoni e reni concentrano mercurio proveniente dal sangue. Questa distribuzione del mercurio dall'amalgama, in tutti gli organi proporzionalmente al numero di otturazioni di amalgama portate, è stata confermata sia da studi di autopsia sull'uomo (Eggleston [1987], Weiner [1993], Drasch [1994], Barregard [1999]), sia da studi sperimentali su scimmie e pecore.

La possibilità che il mercurio in tal modo migrato attivi il substrato immunogenetico (in particolare gli HLA di classe II, che sono dislocati in più parti nell'organismo), è facilmente dimostrabile.

Il modello sperimentale della sclerosi multipla può essere prodotto in una data specie animale (ad esempio nei ratti) solo nelle razze con astrociti produttori di Antigeni-HLA di classe II [Masala 1989], mentre non si sviluppa nelle razze che hanno gli astrociti non-produttori di Antigeni-HLA di classe II.

Gli astrociti svolgono numerosi ruoli attivi nel mantenimento della fisiologia cerebrale, in particolare nel ciclo metabolico di tutte le cellule del sistema nervoso centrale (SNC), nella loro protezione, nella loro rigenerazione, nella comunicazione dei neurotrasmettitori cerebrali, sono determinanti nella regolazione della risposta immunitaria cerebrale. Vediamo le due possibilità:

a. gli astrociti sono produttori di antigeni HLA di classe II

gli immunocomplessi circolanti, formati per l'incontro dell'antigene con i relativi anticorpi specifici, precipitano nei piccoli vasi cerebrali del SNC solo se gli astrociti sono del tipo produttori di Antigeni-HLA di classe II. Come conseguenza si ha la sclerosi multipla (danni da precipitazione di immunocomplessi circolanti: placche).

Infatti la presenza degli antigeni HLA di classe II determinata dagli astrociti comporta a un certo punto l'espressione sulla membrana cellulare di "recettori di adesione", cui si legano in modo efficace e specifico i corrispondenti leganti presenti sui fagociti circolanti, dunque gli immunocomplessi circolanti vengono "trattenuti" dalle molecole di adesione nel sistema nervoso centrale e si ha la formazione di placche.

Una conferma al ruolo determinante degli HLA di classe II viene dalla dimostrazione che anticorpi anti HLA di classe II sono in grado di diminuire efficacemente i danni causati nel modello di sclerosi multipla in animali di laboratorio.

b. gli astrociti sono non-produttori di antigeni HLA di classe II

in questo caso l'endotelio vasale non esprime molecole di adesione; dunque non c'è attivazione immunotossica a carico delle pareti vasali del SNC, dunque non precipitano gli immunocomplessi e non si formano placche.

A questo punto però gli antigeni formati (non complessati) attaccano direttamente i neuroepiteli (neuroni, astrociti, oligodendrociti). Si parla allora di neuropatia con danno assonale. Le varie forme cliniche di queste neuropatie senza placche includono sclerosi laterale amiotrofica, sindrome pseudobulbare, malattia del motoneurone, distrofia muscolare neurogena, emiparkinson, tetraparesi spastica.

Le differenze patogenetiche non sono sempre così nette. Nella pratica clinica, neuropatie con placche a patogenesi pura sono solo le forme di sclerosi multipla iniziali e la sclerosi multipla intermittente. Più comunemente, nelle neuropatie con placche, se la stimolazione antigenica diventa consistente in volume e si protrae a lungo, una parte degli antigeni sfugge al meccanismo di trasformazione in immunocomplessi e l'eccesso di antigeni attacca i neuroepiteli causando il cosiddetto 'danno assonale'. Si hanno qui le neuropatie con placche a patogenesi mista, nelle quali abitualmente rientrano le forme croniche di sclerosi multipla.

Gli astrociti hanno un ruolo di protezione neuronale in caso di esposizione cronica al mercurio, in quanto sequestrano preferenzialmente questo metallo altamente reattivo dal fluido extracellulare. Le culture di astrociti, quando esposte ai metalli pesanti, iniziano la produzione di un gruppo di proteine ricche di gruppi sulfidrilici (SH), che sono state denominate metallotionine (MT), e che esercitano un effetto citoprotettivo su sé stessi e sui neuroni circostanti. È stato riportato che la suscettibilità alla tossicità da mercurio era notevolmente aumentata in topi carenti di metallotionina rispetto al gruppo di controllo.

Nel lungo termine però, dopo l'esposizione cronica a basse dosi di mercurio e l'esaurimento dei meccanismi protettivi, gli astrociti possono soccombere al mercurio e così colpire i vicini neuroni a causa dell'infiammazione e attivazione immunologica. Lo stress apportato dal mercurio può trasformare astrociti innocui in fonti potenzialmente letali di specie citotossiche di radicali liberi dell'ossigeno [Brawer 1998].

Non è solo l'attivazione immunologica degli astrociti ad essere associata con una certa soglia di deplezione dei gruppi sulfidrilici, ma anche altre situazioni autoimmuni indotte dal mercurio.

Topi del tipo SJL esposti al mercurio mostrano in vivo sintesi IgG1 e aumento di IgE che precedono vasculiti sistemiche, mentre in vivo si nota aggregazione cellulare e proliferazione linfocitaria.

La somministrazione di diversi tipi di tioli (cioè sostanze con gruppi sulfidrilici) ritarda e anche fa regredire tali fenomeni immunologici nei topi SJL esposti al mercurio [Hu 1997].

bibliografia

Aiuti F, Montella F., [Concepts of stimulating immunotherapy], Minerva Med. 1982 Apr 7;73(15):895-8

- Barna BP, Deodhar SD, Chiang T, et al., "Experimental beryllium-induced lung disease. I. Differences in immunologic responses to beryllium compounds in strains 2 and 13 guinea pigs", *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1984; 73(1): 42-48
- Barregard L., Sallsten G., Conradi N., "Tissue levels of mercury determined in a deceased worker after occupational exposure", *International Archives of Occupational and Environmental Health*; 72 (3) p169-173 MAY 1999 (CF73)
- Berlin M., "Mercury in dental-filling materials— an updated risk analysis in environmental medical terms. An overview of scientific literature published in 1997–2002 and current knowledge", Istituto di Sanità Svedese, The Dental Material Commission — Care and Consideration, Kv. Spektern, SE–103 33 Stockholm
- Brawer JR, McCarthy GF, Gornitsky M, Frankel D, Mehindate K, Schipper HM., "Mercuric chloride induces a stress response in cultured astrocytes characterized by mitochondrial uptake of iron", *Neurotoxicology*. 1998 Dec;19(6):767-76.
- Butler M, Atherton D, Levinsky RJ., "Quantitative and functional deficit of suppressor T cells in children with atopic eczema", *Clin Exp Immunol*. 1982 Oct;50(1):92-8
- Cagnoli L, Tabacchi P, Pasquali S, Cenci M, Sasdelli M, Zucchelli P., "T cell subset alterations in idiopathic glomerulonephritis", *Clin Exp Immunol*. 1982 Oct;50(1):70-6
- Chatenoud L, Bach MA., "Abnormalities of T-cell subsets in glomerulonephritis and systemic lupus erythematosus", *Kidney Int*. 1981 Aug;20(2):267-74.
- Drasch G., Schupp I., Hofl H., Reinke R., Roeder G., "Mercury burden of human fetal and infant tissues", *European Journal of Pediatrics*; 153 (8) p607-610 AUG 1994
- Eggleston DW., "Effect of dental amalgam and nickel alloys on T-lymphocytes: preliminary report", *The Journal of Prosthetic Dentistry*, May 1984; vol.51, n.5 p617-623
- Eggleston DW, Nylander M, "Correlation of dental amalgam with mercury in brain tissue", *J Prosthet Dent*, Dec 1987, 58(6): 704-707
- Faure MR, Gaucherand MA, Thivolet J, Czernielewski JM, Nicolas JF., "Decreased levels of T-cells and cells with suppressor T-cell phenotype as defined by specific monoclonal antibodies in patients with atopic dermatitis", *Clin Exp Dermatol*. 1982 Sep;7(5):513-8.
- Faure G, Bach MA, Bene MC, Kahn MF, Bach JF, Gaucher A., [T-lymphocyte subpopulations in chronic inflammatory rheumatism], *Rev Rhum Mal Osteoartic*. 1982 May;49(6):439-45.
- Flodstrom M, Shi FD, Sarvetnick N, Ljunggren HG., "The natural killer cell -- friend or foe in autoimmune disease?", *Scand J Immunol*. 2002 May;55(5):432-41.
- Fontenot AP, Kotzin BL, Comment CE, Newman LS. Expansions of T-cell subsets expressing particular T-cell receptor variable regions in chronic beryllium disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 18:581-9.
- Frazer IH, Mackay IR., "T lymphocyte subpopulations defined by two sets of monoclonal antibodies in chronic active hepatitis and systemic lupus erythematosus", *Clin Exp Immunol*. 1982 Oct;50(1):107-14.
- Guo TL., Miller MA., Shapiro IM., Shenker BJ., "Mercuric chloride induces apoptosis in human T lymphocytes: evidence of mitochondrial dysfunction", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1998; 153: 250-257
- Hu H, Moller G, Abedi-Valugerdi M., "Thiol compounds inhibit mercury-induced immunological and immunopathological alterations in susceptible mice", *Clin Exp Immunol*. 1997 Jan;107(1):68-75.
- Huang H., Meyer KC, Kubai L, "An immune model of beryllium-induced pulmonary granulomata in mice. Histopathology, immune reactivity, and flow-cytometric analysis of bronchoalveolar lavage-derived cells", *Lab Invest* (1992); 67(1):138-146
- Hultman P, Johansson U, Turley SJ., "Adverse immunological effects and autoimmunity induced by dental amalgam and alloy in mice", *FASEB J*. 1994; 8(14): 1183–90.

- Hultman P; Lindh U; Horstedbindslev P., "Activation of the immune system and systemic immune-complex deposits in brown Norway rats with dental amalgam restorations", *Journal of Dental Research*; 77 (6) p1415-1425 JUN 1998
- Leung DY, Rhodes AR, Geha RS., "Enumeration of T cell subsets in atopic dermatitis using monoclonal antibodies", *J Allergy Clin Immunol.* 1981 Jun;67(6):450-5.
- Maclean L; Macey M; Lowdell M; Badakere S; Whelan M; Perrett D; Archer J., "Sulphydryl Reactivity of the HLA-B27 Epitope - Accessibility of the Free Cysteine Studied by Flow Cytometry", *Annals of the Rheumatic Diseases*; 51 (4) p456-460 APR 1992
- Marichal B., "Immunologie homéopathique", éd. Didier Hatier [1990], Bruxelles
- Masala C., "Biondi M.: Encefalite Allergica Sperimentale. In Dammacco F.: *Immunologia in Medicina*", Edi-ermes, Milano. 741-744. 1989
- McDonald WI., Silberberg OH., "Multiple sclerosis", Butterworth, London 1986, pp-66, 67, 78, 101, 109, 141
- Minato N, Takeda A, Kano S, Takaku F., "Studies of the function of natural killer-interferon system in patients with Sjogren syndrome", *J Clin Invest.* 1982 Mar; 69(3): 581-8
- Morimoto C, et al., "Alterations in immunoregulatory T cell subsets in active systemic lupus erythematosus", *J Clin Invest.* 1980 Nov;66(5):1171-4.
- Nielsen JB, Hultman P., "Mercury-induced autoimmunity in mice", *Environ Health Perspect* 2002 Oct;110 Suppl 5:877-81
- Polak L, Barnes JM., Turk JL., "The genetic control of contact sensitization to inorganic metal compounds in guinea-pigs", *Immunology* 1968; 14:707-711
- Pollard KM, Lee DK, Casiano CA. The autoimmunity-inducing xenobiotic mercury interacts with the autoantigen fibrillarin and modifies its molecular structure and antigenic properties. *J Immunol* 1997; 158:3521-8.
- Pollard KM, "Lupus-Prone Mice as Models to Study Xenobiotic-Induced Acceleration of Systemic Autoimmunity", *Environ Health Perspect.* 1999 Oct; 107(Suppl 5):729-735.
- Pollard KM, Pearson DL, Hultman P, Deane TN, Lindh U, Kono DH., "Xenobiotic acceleration of idiopathic systemic autoimmunity in lupus-prone bxsb mice", *Environ Health Perspect.* 2001 Jan; 109(1):27-33.
- Prochazková J, Ivasková E, Bártová J, Sterzl I, Stejskal VDM. "Immunogenetic findings in patients with altered tolerance to heavy metals", *Eur J Human Genet* 1998; 6:175.
- Reinherz EL, Weiner HL, Hauser SL, Cohen JA, Distaso JA, Schlossman SF., "Loss of suppressor T cells in active multiple sclerosis. Analysis with monoclonal antibodies", *N Engl J Med.* 1980 Jul 17;303(3):125-9.
- Rhodes DA, Trowsdale J, "Genetics and Molecular Genetics of the MHC", *Rev Immunogenet*, 1999; 1:21-31
- Richeldi L, Sorrentino R, Saltini C., "HLA-DPB 1 glutamate 69: a genetic marker of beryllium disease", *Science* 1993; 262:242-244.
- Roitt I., "Essential immunology", Blackwell Scientific Publication, Oxford 1980, pp.109
- Saltini C, Winestock K, Kirby M, Pinkston P, Crystal RG., "Maintenance of alveolitis in patients with chronic beryllium disease by beryllium-specific helper T cells", *N Engl J Med* 1989; 320:1103-9.
- Sharif S, Delovitch TL., "Regulation of immune responses by natural killer T cells", *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2001;49 Suppl 1:S23-31.
- Siblerud RL., "Health effects after dental amalgam removal", *J. Orthomolec. Med.*, 1990; 5: 95-106
- Sterner JH., Eisenbud M., "Epidemiology of beryllium intoxication", *Arch Ind Hyg Occup Med* 1951: 4:123-151

Stingl G, Gazze LA, Czarnecki N, Wolff K., "T cell abnormalities in atopic dermatitis patients: imbalances in T cell subpopulations and impaired generation of Con A-induced suppressor cells", *J Invest Dermatol.* 1981 Jun;76(6):468-73.

Stubbs J, Argyris E, Lee CW, Monos D, Rossman MD., "Genetic markers in beryllium hypersensitivity", *Chest.* 1996 Mar;109(3 Suppl):45S.

Traugott U., "Acute experimental autoimmune encephalomyelitis. Differences between T cell subsets in the blood and meningeal infiltrates in susceptible and resistant strains of guinea pigs", *J Neurol Sci.* 1983 Sep;61(1):81-91.

von Schmiedeberg S, et al., "Polymorphisms of the xenobiotic-metabolizing enzymes CYP1A1 and NAT-2 in systemic sclerosis and lupus erythematosus", *Adv Exp Med Biol.* 1999; 455:147-52

Zamm AV., "Dental mercury: a factor that aggravates and induces xenobiotic intolerance", *J Orthomol Med* 1991; 6, 67-77

Weiner J, Nylander, "Correlazione tra concentrazioni di mercurio negli organi umani e alcune variabili predittive", *The Science of the Total Environment*, 138(1-3) pp101-115, sett. 1993

autoimmunità indotta da mercurio in studi su animali

Bagenstose, L.M., Salgame, P., Monestier, M., "IL-12 down-regulates autoantibody production in mercury-induced autoimmunity", *J. Immunol.* 160:1612-1617, 1998.

Bagenstose, L.M., Salgame, P., Monestier, M., "Mercury-induced autoimmunity in the absence of interleukin-4", *Clin. Exp. Immunol.* 114:9-12, 1998b.

Bigazzi P. Autoimmunity induced by Metals. In: Chang L, editor, "Toxicology of metals", USA: Lewis Publishers, CRC Press Inc.; 1996. p. 835-52.

Bigazzi PE., "Metals and Kidney Autoimmunity", *Environ Health Perspect.* 1999 Oct; 107 (Suppl.5): 753-765.

Druet E, Sapin C, Gunther E, Feingold N, Druet P., "Mercuric chloride-induced anti-glomerular basement membrane antibodies in the rat: genetic control", *Eur J Immunol* 1977; 7:348-51.

Druet P., Hirsch F., Sapin C., Druet E., Bellon B., "Immune dysregulation and autoimmunity induced by toxic agents", *Transpl. Procee.* (1982a); 14: 482-484

Gillespie KM, Saoudi A, Kuhn J, Whittle CJ, Druet P, Bellon B, Mathieson PW., "Th1/Th2 cytokine gene expression after mercuric chloride in susceptible and resistant rat strains", *Eur. J. Immunol.* 1996,10:2388-2392

Hultman P & Eneström S The induction of immune complex deposits in mice by peroral and parenteral administration of mercuric chloride: strain dependent susceptibility *Clin Exp Immunol* 67 1987 283

Hultman P, Skogh T & Eneström S Circulating and tissue immune complexes in mercury-treated mice *J Clin Lab Immunol* 29 1989 175- 83

Hultman P, "Dose-response studies in murine mercury-induced autoimmunity and immune-complex disease", *Toxicol Appl Pharmacol.* 1992 Apr; 113(2):199-208.

Institoris L, Siroki O, Undeger U, Basaran N, Desi I., "Immunotoxicological investigation of subacute combined exposure by permethrin and the heavy metals arsenic(III) and mercury(II) in rats", *Int Immunopharmacol* 2001 May;1(5):925-33

Kiely PDW; Thiru S; Oliveira DBG, "Inflammatory polyarthritis induced by mercuric chloride in the Brown Norway rat", *Laboratory Investigation*; 73 (2) p284-293 AUG 1995

Nielsen JB, Hultman P., "Mercury-induced autoimmunity in mice", *Environ Health Perspect* 2002 Oct;110 Suppl 5:877-81

Kubicka-Muranyi M, "Murine systemic autoimmune disease induced by mercuric chloride (HgCl₂): Hg-specific helper T-cells react to antigen stored in macrophages", *Int J Immunopharmacol*. 1993 Feb; 15(2):151-61.

Mathieson PW., Thiru S., Oliveira DBG., "Regulatory role of OX22+ T cells mercury-induced autoimmunity in the Brown Norway rat", *J. Exp. Med.* (1993); 177: 1309-1316

Mathieson PW., "Mercury: god of Th2 cells?", *Clinical and Experimental Immunology* (1995); 102: 229-230

Mathieson PW; Qasim FJ; Esnault VLM; Oliveira DBG, "Animal Models of Systemic Vasculitis", *Journal of Autoimmunity*; 6 (2) p251-264 1993

Monestier, M., Losman, M. J., Novick, K. E., and Aris, J. P. Molecular analysis of mercury-induced anti-nucleolar antibodies in H-2S mice. *J. Immunol.* 152: 667-675, 1994.

Monestier, M., Novick, K. E., and Losman, M. J. D-penicillamine- and quinidine-induced antinuclear antibodies in A.SW (H-2S) mice. Similarities with autoantibodies in spontaneous and heavy metal-induced autoimmunity. *Eur. J. Immunol.* 24: 723-730, 1994.

Nadarajah V, Neiders ME, Aguirre A, Cohen RE, "Risposte infiammatorie cellulari locali verso mercurio dentale impiantato subcutaneamente", *J Toxicol & Environ Health* 49(2):113-125 (1996)

Polak L, Barnes JM., Turk JL., "The genetic control of contact sensitization to inorganic metal compounds in guinea-pigs", *Immunology* 1968; 14:707-711

Pollard KM, Lee DK, Casiano CA. The autoimmunity-inducing xenobiotic mercury interacts with the autoantigen fibrillar and modifies its molecular structure and antigenic properties. *J Immunol* 1997; 158:3521-8.

Pollard KM, "Lupus-Prone Mice as Models to Study Xenobiotic-Induced Acceleration of Systemic Autoimmunity", *Environ Health Perspect.* 1999 Oct; 107(Suppl 5):729-735.

Prigent P, Saoudi A, Pannetier C, Graber P, Bonnefoy Y, Druet P, Hirsch F., "Mercuric chloride, a chemical responsible for Th2-mediated autoimmunity in Brown-Norway rats, directly triggers T cells to produce IL-4", *J. Clin. Invest.*, 1995, 96:1484-1489

Qasim FJ; Mathieson PW; Sendo F; Thiru S; Oliveira DBG, "*Role of neutrophils in the pathogenesis of experimental vasculitis", *American Journal of Pathology*; 149 (1) p81-89 JUL 1996

Rossert J., "Mécanismes cellulaires impliqués dans l'immunosuppression et l'autoimmunité induite par HgCl₂ chez le rat", 1992 (Doctorat d'Immunologie, Paris VI, INSERM U28, Pavillon Lefèbvre - Hôpital Purpan, Email : Lucette.Pelletier@purpan.inserm.fr)

Warfvinge K; Hansson H; Hultman P , "Systemic autoimmunity due to mercury vapor exposure in genetically susceptible mice: Dose-response studies", *Toxicology and Applied Pharmacology*; 132 (2) p299-309 Jun 1995