

# Analisi critica degli studi di riferimento sulla tossicocinetica di adiuvanti a base di alluminio

Jean-Daniel Masson<sup>a,1</sup>, Guillemette Crépeaux<sup>a,b,1</sup>, François-Jérôme Authier<sup>a</sup>, Christopher Exley<sup>c</sup>, Romain K. Gherardi<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> INSERM U955 E10, Biologie du système neuromusculaire, Faculté de Médecine, Université Paris Est Créteil, Créteil 94010, France

<sup>b</sup> Génétique médicale comparée des affections neuromusculaires, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 Avenue du général de Gaulle, 9400 Maisons-Alfort, France

<sup>c</sup> The Birchall Centre, Lennard-Jones Laboratories, Keele University, Staffordshire ST5 5BG, UK

## INFO ARTICOLO

Parole chiave

Vaccino adiuvante

Alluminio

tossicocinetica

Sicurezza del vaccino

## ABSTRACT

Abbiamo esaminato i tre studi di riferimento tossicocinetico comunemente usati per suggerire che gli adiuvanti a base di alluminio (Al) sono innocui. Un singolo studio sperimentale è stato condotto utilizzando <sup>26</sup>Al isotopico (Flarend et al., *Vaccine*, 1997). Per questo studio sono stati utilizzati sali di alluminio simili a quelli usati nei vaccini ma è stato trascurato l'assorbimento di adiuvante da parte di cellule che non erano completamente documentate all'epoca. È stato condotto per un breve periodo di tempo (28 giorni) e sono stati utilizzati solamente due conigli per ciascun adiuvante. Al punto finale, l'eliminazione di Al nelle urine rappresentava il 6% per l'idrossido di Al e il 22% per il fosfato di Al, entrambi i risultati erano incompatibili con la rapida eliminazione di Al di derivazione da vaccino nelle urine. Due studi teorici hanno valutato il potenziale rischio di Al da vaccino nei neonati, facendo riferimento a un "livello minimo di rischio" orale (LMR) estrapolato da studi su animali. Keith et al. (*Vaccine*, 2002) ha utilizzato un LMR elevato (2 mg/kg/g), un modello errato di assorbimento immediato al 100% del vaccino Al, e non ha preso in considerazione l'immatrità renale e della barriera emato-encefalica. Mitkus et al. (*Vaccine*, 2011) hanno considerato solo l'Al solubilizzato, con calcoli erronei della durata dell'assorbimento. La diffusione sistemica delle particelle di Al e il potenziale neuroinfiammatorio sono stati omessi. Il LMR utilizzato era sia inadeguato (adiuvante orale vs coadiuvante iniettato) sia ancora troppo alto (1 mg / kg / die) rispetto ai recenti studi sugli animali. Sia la scarsità che le gravi debolezze degli studi di riferimento suggeriscono fortemente che nuovi studi sperimentali sugli adiuvanti di tossicocinetica dovrebbero essere eseguiti a lungo termine, comprese esposizioni neonatali e per adulti, per garantire la loro sicurezza e ripristinare la fiducia della popolazione nei vaccini contenenti Al.

## 1. Introduzione

La vaccinazione ha contribuito all'eradicazione del vaiolo, ad una diminuzione del 99% della poliomielite tra il 1988 e il 2003 e ad una diminuzione del 40% dei casi di morbillo tra il 1999 e il 2003 a livello mondiale, nonché ad una diminuzione dei casi di parotite da 859 a 9 ogni 100.000 abitanti tra il 1986 ed il 2013 in Francia [1]. Il mantenimento di una buona copertura vaccinale, per esempio un alto tasso di persone vaccinate nella popolazione, è necessario per evitare il risorgere di altre malattie infettive, come osservato per la pertosse o la rosolia, con un duplice beneficio, sia individuale che collettivo, attraverso la riduzione del numero di persone che possono trasmettere malattie infettive [1].

Sebbene il successo di molti vaccini sia stato ampiamente dimostrato, negli ultimi anni è emersa una crescente sfiducia pubblica nei confronti della vaccinazione. Questa riluttanza, in varia misura, appare in concomitanza con una politica globale in espansione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) per i fiorenti programmi di vaccinazione con > 120 nuovi vaccini attualmente in fase di sviluppo e si prevede una crescita annuale del 20% del business dei vaccini, realizzando un fatturato che è passato da 5 a 43 miliardi di dollari tra il 2000 e il 2016 e sarà > 100 miliardi di dollari nel 2025 [2].

A differenza dei medicinali convenzionali, i vaccini vengono somministrati a soggetti sani che devono essere convinti del loro valore e della loro sicurezza. In questo contesto, la questione del vaccino è diventata una questione di grande rilevanza sociale, che ha portato all'istituzione di una consultazione nazionale dei cittadini sulla vaccinazione presieduta da Alain Fischer in Francia [3]. Secondo i risultati della sua relazione finale del 30 novembre 2016, diversi fattori contribuiscono alla sfiducia nei confronti della vaccinazione, in particolare:

- Sospetti di collusione tra le autorità sanitarie e l'industria farmaceutica a seguito di scandali mediatici;
- La scomparsa di molte malattie infettive che mettono in discussione l'opportunità di continuare la vaccinazione;
- Il problema degli adiuvanti nei vaccini;

- La posizione dei medici che lamentano una mancanza di formazione per convincere i pazienti riluttanti;
- La complessità del ciclo di vaccinazione (prescrizione medica obbligatoria, acquisto del vaccino da parte della farmacia, vaccinazione medica, ecc.);
- Mancanza di informazioni da parte dei medici sullo stato di immunizzazione dei loro pazienti (libretto sanitario perso o non presentato);
- Crisi sanitarie (mediatore, sangue contaminato, ecc.) e l'insufficiente reattività della risposta e l'impegno delle autorità pubbliche che hanno lasciato il campo aperto alla propaganda anti-vaccinazione [3].

Una questione chiave nel dibattito sulla sicurezza del vaccino riguarda gli adiuvanti, composti essenziali per una immunizzazione forte e duratura [4]. La polemica si concentra sui sali di alluminio che furono introdotti empiricamente da Alexander Glenny come adiuvanti per i vaccini nel 1926 [5]. Questo ha portato a varie azioni promosse da associazioni di pazienti [6,7], pubblicazione di libri per il grande pubblico, sia critiche [8] che rassicuranti [9], blog scientifici [10], stesura di relazioni tecniche istituzionali [4,11] -13] e lo svolgimento di riunioni di discussione ad iniziativa parlamentare [14,15]. Sebbene il principio della vaccinazione non sia mai stato messo in discussione durante questi scambi, l'esatto grado di sicurezza dei vaccini contenenti alluminio è rimasto oggetto di persistente disaccordo.

L'insorgenza di mialgia e artralgia, stanchezza cronica e disturbi neurologici in seguito a iniezioni multiple di vaccini contenenti alluminio contro l'epatite B, il tetano e il papilloma virus umano (HPV) è stata segnalata in molti paesi: Australia [16], Canada [17,18], Danimarca [19,20], Francia [21-23], Regno Unito [24,25], Italia [26], Israele [27], Giappone [28-29], Messico [30], Portogallo [31], e USA [32]. Tuttavia, al di là dell'associazione temporale, l'esistenza di un nesso causale rimane dibattuta. Per la vaccinazione contro l'HPV, ad esempio, il rischio di insorgenza di eventi avversi, che possono far parte di una o più entità cliniche [19] -sindrome da stanchezza cronica (CFS), sindrome da dolore regionale (RPS), sindrome da tachicardia posturale ortostatica (POTS)- emerge da un punto di vista epidemiologico [33]. Uno studio trasversale sistematico di 12 studi pubblicati ha mostrato un leggero aumento degli eventi avversi nel gruppo vaccinato con HPV, ma queste informazioni devono tenere conto dell'uso quasi sistematico di gruppi di controllo che hanno ricevuto come placebo contenente adiuvante, adiuvanti di alluminio o, più raramente, il vaccino contro l'epatite A (11 delle 12 pubblicazioni analizzate, comprendenti 29.533 dei 29.600 pazienti studiati) [34]. Nonostante questa forte distorsione [35], l'European Medicines Agency (EMA) ha emesso un parere negativo sull'esistenza di un'associazione tra la vaccinazione HPV e l'aumento degli eventi avversi [36]. Alcuni studi farmaco-epidemiologici sono stati apparentemente a sostegno di questa opinione [37,38], ma dopo essersi concentrati sulle più specifiche malattie autoimmuni, hanno escluso CFS, RPS e POTS dalle loro indagini. La decisione dell'EMA ha causato una forte insoddisfazione nei confronti di Cochrane Nordic e una denuncia è stata presentata contro l'EMA [39]. La questione dell'esistenza di un nesso causale, e quindi di un'autentica sindrome adiuvante [40,41], non può mai essere risolta con approcci epidemiologici [42]. La performance dell'epidemiologia nello stabilire la causalità è notoriamente limitata, in quanto può essere concepita per effetti multisistemici a più o meno lungo termine di dosi cumulative basse somministrate in un contesto di esposizioni multiple. In caso contrario, il dibattito può essere illuminato solo stabilendo l'esistenza o meno di una inequivocabile plausibilità biologica di un nesso causale.

Ad oggi, gli adiuvanti di alluminio di per sé, forse sorprendentemente, non sono stati oggetto di alcuna indagine sperimentale ufficiale, e questo nonostante la ben nota neurotossicità dell'alluminio. L'OMS rileva inoltre: "La sicurezza degli adiuvanti è un campo importante e trascurato. Dal momento che gli adiuvanti hanno le loro proprietà farmacologiche, che potrebbero influenzare sia l'immunogenicità che la sicurezza dei vaccini, la valutazione della sicurezza è essenziale" [43]. Da parte sua, l'Accademia nazionale di farmacia francese ha chiesto che gli studi sulla sicurezza degli adiuvanti a base di alluminio siano effettuati tenendo conto di una serie di parametri finora poco studiati, che possono contribuire alla comparsa del rischio [13]. Nella seguente recensione, abbiamo esaminato in dettaglio alla luce delle recenti scoperte i pochi articoli in letteratura di tossicocinetica classica che servono da riferimento per le autorità di controllo della salute e per gli industriali a confermare a quanto pare la sicurezza degli adiuvanti di alluminio.

## 2. Generalità su adiuvanti Al

I due principali sali di alluminio utilizzati come adiuvanti sono l'Al-ossi-idrossido (AlOOH, Alhydrogel®) e l'Al idrossi-fosfato (AlOHPO<sub>4</sub>, Adju-Phos®). Sono presenti in circa il 60% dei vaccini umani (Tabella 1) e dei vaccini veterinari [44]. L'ossi-idrossido è l'adiuvante più utilizzato nei vaccini distribuiti in Francia (più comunemente usati nei vaccini contro l'epatite B, l'epatite A o il tetano e molti altri vaccini, così come per i prodotti per l'immunoterapia per la desensibilizzazione sottocutanea). Per i vaccini HPV, gli adiuvanti sono l'Al-ossi-idrossido per il Cervarix® bivalente 16/18 (combinato con un secondo adiuvante, monofosforile lipide A, derivato detossificato di lipopolisaccaride [45]) ed il Solfato di Idrossifosfato di Al amorfo per il quadrivalente 6/11/16/18/Gardasil® (un adiuvante più immunostimolante rispetto agli adiuvanti a base di alluminio convenzionali) [46].

**Tabella 1**

Vaccini contenenti adiuvante-alluminio autorizzati per uso umano (2013).

| Nome del vaccino  | Laboratorio  | Alluminio   | Altri adiuvanti                               |
|---|--|---|---|
| <i>Sia batteri che virus</i>  |  |   |   |
| Difterite. Tetano. Pertosse acellulare Poliomielite. Haemophilus influenzae B ed epatite B<br>InfanrixHexa                                | GSK  | Al-phosphate: 0.3 mg/dose<br>Al-hydroxide: 0.5 mg/dose (0.5 ml)   |   |
| Difterite. Tetano. Pertosse acellulare Poliomielite e Haemophilus influenzae B<br>InfanrixQuinta<br>Pentavac                              | GSK<br>Sanofi Pasteur MSD                                | Al-hydroxide: 0.5 mg/dose (0.5 ml)<br>Al-hydroxide: 0.3 mg/dose (0.5 ml)  |   |
| Difterite. Tetano. Pertosse acellulare e poliomielite<br>DTCaPolio<br>InfanrixTetra<br>Tetravac acellulaire<br>dTcaPolio<br>Boostrixtetra | GSK<br>Sanofi Pasteur MSD<br>GSK                         | Al-hydroxide: 0.5 mg/dose (0.5 ml)<br>Al-hydroxide: 0.3 mg/dose (0.5 ml)<br>Al-hydroxide: 0.3 mg/dose<br>+Al-phosphate: 0.2 mg/dose (0.5 ml)        |   |
| Repevax<br>Difterite. Tetano e poliomielite<br>Revaxis  | Sanofi Pasteur MSD<br>Sanofi Pasteur MSD                 | Al-phosphate: 0.33 mg/dose (5 ml)<br>Al-hydroxide: 0.35 mg/dose (0.5 ml)  |   |
| <i>Batteri</i>  |  |   |   |
| <i>Meningococco</i>   |  |   |   |
| Meningococco C<br>Meningitec<br>Menjugatekit  | Pfizer Holding<br>Novartis Vaccines and<br>Diagnostics   | Al-phosphate: 0.125 mg/dose (5 ml)<br>Al-hydroxide: 0.3 to 0.4 mg/dose (0.5 ml)   |   |
| Neisvac<br>Meningococco B<br>Bexsero  | Baxter<br>Novartis Vaccines and<br>Diagnostics           | Al-hydroxide: 0.5 mg/dose (0.5 ml)<br>Al-hydroxide: 0.5 mg/dose (0.5 ml)  |   |
| <i>Pneumococco</i>  |  |   |   |
| Prevenar 13<br>Pasteur tetanic vaccin   | Pfizer Holding<br>Sanofi Pasteur MSD                     | Al-phosphate: 0.125 mg/dose (5 ml)<br>Al-hydroxide: 0.6 mg/dose (0.5 ml)  |   |
| <i>Virus</i>  |  |   |   |
| <i>Epatite B</i>  |  |   |   |
| Engerix 10 µg/0.5 ml<br>Engerix 20 µg/1 ml<br>HBVAXPRO 5 µg/0.5 ml  | GSK<br>GSK<br>Sanofi Pasteur MSD                         | Al-hydroxide: 0.25 mg/dose (0.5 ml)<br>Al-hydroxide: 0.5 mg/dose (1 ml)<br>Al-hydroxyphosphate sulfate 0.25 mg/dose (0.5 ml)                        |   |
| HBVAXPRO 10 µg/1 ml<br>HBVAXPRO 40 µg/1 ml  | Sanofi Pasteur MSD<br>Sanofi Pasteur MSD                 | Al-hydroxyphosphate sulfate 0.5 mg/dose (1 ml)<br>Al-hydroxyphosphate sulfate 0.5 mg/dose (1 ml)  |   |
| GenHevac B Pasteur<br>Epatite A<br>Avaxim adult<br>Havrix 1440 U/1 ml adult<br>Havrix 720 U/0.5 ml infant and pregnant women              | Sanofi Pasteur<br>Sanofi Pasteur<br>GSK<br>GSK           | Al-hydroxide ≤ 1.25 mg/dose (1 ml)<br>Al-hydroxide: 0.3 mg/dose (0.5 ml)<br>Al-hydroxide: 0.5 mg/dose (1 ml)<br>Al-hydroxide: 0.25 mg/dose (0.5 ml) |   |
| Encefalomielite da zecche<br>Ticovac 0.5 ml adult<br>Ticovac 0.25 ml infant<br>Encepur  | Baxter<br>Baxter<br>Novartis Vaccines and<br>Diagnostics | Al-hydroxide: 0.35 mg/dose (0.5 ml)<br>Al-hydroxide: 0.17 mg/dose (0.25 ml)<br>Al-hydroxide: 0.3 to 0.4 mg/dose (0.5 ml)                            |   |
| Encefalite giapponese<br>Ixiaro   |  | Al-hydroxide: 0.25 mg/dose (0.5 ml)   |   |
| Human papillomavirus<br>Cervarix  | GSK  | Al-hydroxide: 0.5 mg/dose (0.5 ml)  | 3-O-desacyl-4'-monophosphoryl lipid A (50 µg) |
| Gardasil  | Sanofi Pasteur MSD                                       | Al-hydroxyphosphate sulfate 225 µg/dose (0.5 ml)  |   |
| Sia epatite A e B<br>Twinrix adult<br>Twinrix infant  | GSK<br>GSK   | Al-hydroxide: 0.05 mg/dose<br>+Al-phosphate: 0.4 mg/dose (1 ml)<br>Al-hydroxide: 0.025 mg/dose<br>+Al-phosphate: 0.2 mg/dose (0.5 ml)               |   |

Questi due principali sali di alluminio potenziano fortemente la produzione di anticorpi (la risposta umorale attraverso l'attivazione dei linfociti CD4 + Th2 e l'innescamento delle cellule B). I meccanismi coinvolti sono ancora non completamente compresi [47,48]. La Food and Drug Administration (FDA) ha fissato e autorizzato empiricamente il livello di adiuvante a 0,85mg di alluminio per dose di vaccino, sulla base di risultati che mostrano un buon effetto adiuvante a questa concentrazione (in accordo con Joan May, FDA/CBER, citato in [49]).

I due adiuvanti Al hanno proprietà fisico-chimiche diverse nello stato nativo. L'ossidrossido (comunemente chiamato idrossido di Al) ha una morfologia cristallina, nota come Boehmite, mentre l'idrossifosfato (comunemente chiamato fosfato di Al) è amorfo. L'idrossido di Al è composto da nanoparticelle di circa 2,2 nm × 4,5 nm × 10 nm che formano spontaneamente aggregati di dimensioni dell'ordine del micron che al microscopio elettronico a trasmissione hanno aspetto nano-fibroso [50,51]. Questo adiuvante è altamente idratato, e forma un gel stabile le cui capacità di adsorbimento antigenico sono uniformemente elevate. Le interazioni idrostatiche e lo scambio di gruppi ossidrilici con fosfato sono le principali forze che spiegano l'adsorbimento sulla superficie dell'adiuvante. Il fosfato di Al ha meno gruppi idrossilici e quindi le sue capacità di adsorbimento antigenico sono inferiori a quelle dell'idrossido di Al. L'idrossido di Al ha una carica superficiale positiva, il fosfato di Al ha una carica negativa. Anche la cinetica di biodisponibilità dei due adiuvanti è significativamente diversa: l'idrossido di Al presenta una solubilizzazione più lenta, viene assorbito più avidamente e risulta meno tossico per le cellule fagocitarie [51] rispetto al fosfato di Al, comportando notevoli differenze nelle reazioni dei due adiuvanti durante le interazioni con fosfato, acidi organici, ambienti proteici e cellule immunitarie incontrate in vivo.

### 3. Analisi critica degli articoli di riferimento per la tossicocinetica degli adiuvanti di Al

#### 3.1 Studi dell'assorbimento ed eliminazione dell'alluminio dei vaccini [52]

Per molto tempo alle conferenze internazionali specialistiche si sosteneva che Al iniettato per via vaccino era essenzialmente rapidamente eliminato dal corpo nelle urine [53] e questo messaggio è stato trasmesso da siti di generale informazione pubblica ufficiale, fino al recente ritiro [54]. Questa affermazione ha le sue radici negli studi degli anni '90 che utilizzano una nuova tecnica per studiare la tossicocinetica dell'Al. In effetti, fino al 1990, era difficile conoscere il destino preciso di Al in vivo, dal momento che non era possibile differenziare Al somministrato da Al ottenuto da altre forme di esposizione o dalla contaminazione esterna dei campioni. L'utilizzo di <sup>26</sup>Al, un isotopo radioattivo di basso livello, che si distingue dal naturale <sup>27</sup>Al, ha permesso il rilevamento di piccolissime quantità di Al (10-17 g) usando la spettrometria di massa con acceleratore [55].

Priest et al. [56] furono i primi a iniettare per via endovenosa (IV) <sup>26</sup>Al citrato, una forma solubile di alluminio, in un volontario sano per studiare la tossicocinetica dell'alluminio in un essere umano. Osservarono che più della metà dell'alluminio iniettato aveva lasciato il flusso sanguigno dopo 15 minuti e l'<1% rimaneva nel sangue dopo due giorni. Il 13° giorno, l'83% della dose iniettata era stata escreta nelle urine e l'1,8% era stato escreto nelle feci [56]. Il restante 15% nell'organismo dopo tale data è poi diminuito molto lentamente, poiché la ritenzione di <sup>26</sup>Al era ancora del 4% dopo 3 anni. Risultati simili sono stati riportati in altri 6 volontari sani, con significative variazioni interindividuali nel grado di ritenzione dell'alluminio [57]. Questo lavoro mostrò così un'eliminazione multifase di Al circolante, comprendente una fase iniziale di eliminazione rapida, seguita da fasi di eliminazione che sono molto più lente. Molteplici esposizioni ambientali favoriranno quindi il progressivo accumulo di alluminio nel corpo durante la vita di un individuo [56]. È essenziale tenere conto del fatto che in questi studi tossicocinetici preliminari, né la forma dell'alluminio (solubile) né la via di somministrazione (IV) corrispondevano alla situazione del vaccino, dove l'alluminio è iniettato per via sottocutanea (SC) o intramuscolare (IM) in forma di nano/microparticellare. Il punto è cruciale: la dinamica degli adiuvanti Al ha scarsa attinenza con qualsiasi 'normale' esposizione ad Al nella vita di tutti i giorni, e l'iniezione di citrato di Al nel sangue in realtà non ti dice molto sulla normale esposizione cronica ad Al attraverso qualsiasi via compresa la vaccinazione. Usando lo stesso tracciante <sup>26</sup>Al, Flarend e Hem [52,55] effettuarono quindi l'unico studio di farmacocinetica sugli adiuvanti di Al e in un modello animale. Va notato che questo studio è stato inizialmente considerato come uno studio preliminare [53] ma non è stato seguito da alcuno studio definitivo. L'Accademia nazionale di medicina francese sottolinea che "questo lavoro sperimentale, unico fino ad oggi, viene utilizzato per la modellizzazione della farmacocinetica degli adiuvanti" [4]. Questo unico studio di riferimento soffre di molte debolezze nelle sue ipotesi di lavoro, il suo design e l'interpretazione dei suoi risultati.

### 3.1.1. Una scorretta ipotesi di partenza

Al momento dello studio, l'ipotesi di lavoro sul funzionamento degli adiuvanti a base di alluminio era quella di Glenny [5], secondo cui l'adiuvante di Al [inizialmente Al solfato di potassio KAl ([SO<sub>4</sub>]<sup>2-</sup>)] formava un deposito locale da cui aveva luogo un desorbimento graduale dell'antigene del vaccino, all'origine dell'effetto adiuvante osservato. La teoria del deposito, come viene chiamata, è stata recentemente messa in discussione [48], e ora in gran parte abbandonata [58]. Sulla base di questo iniziale dogma, Stanley Hem, un chimico, aveva studiato in vitro la cinetica di dissoluzione di una dose di adiuvante di Al (corrispondente a 0,85 mg di Al) in 25 ml di un mezzo regolato per il citrato per imitare la concentrazione di acido chelante Al trovato nel liquido interstiziale [59]. A pH 7,35 e temperatura ambiente, ha osservato che il 55% del fosfato di Al era disciolto dopo 12 ore, rispetto allo 0% per i due adiuvanti commerciali di idrossido di Al. Aumentando la concentrazione di citrato di un fattore × 100 e aumentando la temperatura a 37 ° C, è stata osservata la dissoluzione del 100% della forma di fosfato a 12 ore rispetto a <6% per le forme di idrossido. A 132 ore (tempo di studio finale), la dissoluzione delle forme di idrossido era solo del 7-10%. Mentre menziona l'esistenza di differenti cinetiche di dissoluzione del fosfato di Al e le forme di idrossido di Al in vitro, Flarend et al. hanno assunto come punto di partenza del loro studio in vivo che i due adiuvanti iniettati nel tessuto sarebbero solubilizzati a contatto con gli acidi chelanti organici aventi un gruppo acido alfa-idrossi-carbossilico (acido citrico, acido lattico e acido malico) presenti in il fluido interstiziale.

Questa ipotesi iniziale è ampiamente falsa in due aspetti: la solubilizzazione dell'idrossido di Al precedentemente osservata in vitro era nulla in presenza di una concentrazione fisiologica di citrato e rimaneva molto bassa (6%) quando la concentrazione di citrato era aumentata di 100 volte [59] e, soprattutto, gli autori erano probabilmente inconsapevoli delle particelle catturate dalle cellule immunitarie. Il fatto che una volta iniettati in un tessuto, gli agglomerati di adiuvante siano rapidamente catturati dalle cellule del sistema immunitario innato e quindi rapidamente portati via dall'effetto di dissoluzione degli agenti chelanti presenti nel liquido interstiziale è stato pienamente dimostrato diversi anni dopo [21, 50,60-62], ma solo occasionalmente documentati prima del loro studio [63-65]. Gli autori hanno riconosciuto implicitamente l'assorbimento cellulare delle particelle pochi anni dopo, mostrando l'importanza della fagocitosi nell'effetto immunologico adiuvante [66]. Un'ipotesi di partenza errata non nega i risultati dello studio, ovviamente, ma la fagocitosi rappresenta ovviamente un fattore critico che deve essere preso in considerazione per interpretare i risultati. Si potrebbe obiettare che le cellule contengono acido citrico e malico come parte del ciclo dell'acido citrico e dell'acido lattico dalla scissione anaerobica del glicogeno, ma l'esatto contributo, se esistente, di questi acidi chelanti intracellulari nella solubilizzazione adiuvante in vivo non è noto. Inoltre, è stato descritto un altro valor medio di corrosione di particelle minerali da parte della macchina autofagia-lisosoma [67], suggerendo che la solubilizzazione di adiuvante a base di alluminio può dipendere in gran parte dai meccanismi geneticamente determinati della cellula.

### 3.1.2. Un protocollo di studio con un design limitato e imperfetto

Flarend et al. [52] iniettarono per via intramuscolare 0,85 mg di <sup>26</sup>Al come idrossido o fosfato nei conigli.

- Sono stati iniettati solo due conigli per ogni sale di Al studiato, cosa che sembra essere un numero troppo piccolo di animali come condizione necessaria per una interpretazione attendibile dei dati provenienti da esperimenti biologici. Infatti, gli esperimenti mostreranno una forte variabilità interindividuale dell'eliminazione urinaria di Al dopo iniezione di Al-fosfato (vedi sotto e Fig. 1). Tali variazioni inter individuali sono state precedentemente osservate dopo iniezione endovenosa di Al nell'uomo [57];
- Lo studio è stato condotto per un periodo molto limitato di 28 giorni: i precedenti risultati in vitro della squadra (vedi sopra) hanno reso improbabile la rimozione dell'idrossido di alluminio dopo un periodo di tempo così breve [59];
- Al-idrossido utilizzato, prodotto da precipitazione, differisce da Al idrossido (Alhydrogel®) trovato nei vaccini commerciali [68]. [Lo stesso valeva per il fosfato di Al che differiva da Adju-Phos®].

Una possibile opzione sarebbe stata quella di incubare a lungo il <sup>26</sup>Al con Alhydrogel® [o Adju-Phos®] e attendere lo scambio tra <sup>27</sup>Al e <sup>26</sup>Al per marcare l'adiuvante ufficiale.

### 3.1.3. Tessuti di riferimento perduti o distrutti

La mancanza di pertinenza degli organi rimossi alla fine dello studio per valutare la biodistribuzione di <sup>26</sup>Al è sorprendente:

- I tessuti muscolari nel sito di iniezione non sono stati campionati rendendo impossibile determinare la quantità di adiuvante rimasto nel sito di iniezione anche se lo studio era basato sulla "teoria del deposito";
- I linfonodi campionati erano linfonodi intestinali e non i gangli di drenaggio dell'area iniettata, mentre il drenaggio dell'adiuvante ai linfonodi regionali è una via riconosciuta di disseminazione sistemica di adiuvante [50,69,70];

- Le ossa campionate (femore) sono state perse, il che è una sfortuna perché l'osso è un dissipatore noto dell'alluminio solubile circolante, forse più utile del rene o di altri organi [71,72];
- I cervelli sono stati campionati, sebbene uno di loro sia stato distrutto, ovvero quello prelevato dall'animale con il più alto contenuto di  $^{26}\text{Al}$  nel sangue (animale iniettato con fosfato di Al).

#### 3.1.4. Misurazioni iniziali del plasma contraddittorie rispetto ai risultati preliminari in vitro

Flarend et al. [52] misurarono  $^{26}\text{Al}$  nel sangue e nelle urine durante i 28 giorni di studio e poi nei campioni post-mortem.

- Il loro primo ritrovamento è stato il verificarsi di un iniziale picco sanguigno di  $^{26}\text{Al}$ . Inspiegabilmente è stato il sale di idrossido ad aver indotto il picco più acuto, essendo stato notato dal primo punto (1 h), con culmine a 10 ore e il termine a 48 ore (Figura 1A). Gli autori hanno interpretato questo picco iniziale come risultato di una dissoluzione precoce dell'idrossido di Al, cosa che sembra improbabile alla luce di precedenti ricerche che hanno mostrato una scarsa solubilizzazione in vitro dell'adiuvante a base di idrossido dopo 12 ore [59]. D'altra parte, il sale di fosfato, che dovrebbe solubilizzarsi più rapidamente dell'idrossido, aveva prodotto solo un modesto aumento nel plasma di  $^{26}\text{Al}$ , come evidenziato da un'area più alta sotto la curva di un fattore  $\times 1,4$ , per idrossido entro le prime 48 ore. Una possibile spiegazione del  $^{26}\text{Al}$  plasmatico maggiore nel coniglio che riceve l'adiuvante a base di idrossido, che non è stata considerata dagli autori, è che il nano o micro particolato di idrossido di Al fuoriesce dal sito di iniezione nel sangue a causa del danno dell'ago nel sito di iniezione.
- Dalla 48esima ora la concentrazione nel plasma di  $^{26}\text{Al}$  era più alta per il fosfato di Al e rimaneva più alta di quella per l'idrossido di Al anche successivamente (Figura 1A). Gli autori non commentano l'esistenza di ondulazioni nelle concentrazioni plasmatiche di  $^{26}\text{Al}$  con picchi a 100 ore e 400 ore. Questi cambiamenti sono stati osservati in entrambi i coadiuvanti, ma erano più acuti per il fosfato di Al, il che potrebbe suggerire fenomeni di assorbimento ciclico, forse legati a fenomeni di cattura/rilascio cellulare o tissutale. A 28 giorni dopo le iniezioni, l'assorbimento, cioè la solubilizzazione, dell' $^{26}\text{Al}$  proveniente dall'adiuvante Al fosfato è 3 volte più alto di quello osservato per l'idrossido di Al
- Alla fine dello studio, gli autori insistono sull'assenza di una fase terminale nella curva delle concentrazioni plasmatiche, vale a dire della fase terminale di assorbimento del sangue di  $^{26}\text{Al}$ . L'esame delle stesse curve da parte di Mitkus et al. [73] ha indicato che, in effetti, il passaggio di  $^{26}\text{Al}$  nel sangue aveva avviato la fase terminale per il fosfato di Al ed era già molto vicino allo zero per l'idrossido di Al il 28° giorno dello studio (Figura 1A). Per l'idrossido di Al, i livelli plasmatici di  $^{26}\text{Al}$  erano molto bassi dalla 100a ora e l'assorbimento nel sangue diminuiva ulteriormente dalla 400a alla 700a ora, indicando un passaggio estremamente basso di Al nel plasma dopo il picco iniziale osservato da 0 a 48 ore.

#### 3.1.5. Le dichiarazioni sull'eliminazione degli adiuvanti non sono suggerite dai risultati

C'è una forte differenza nell'escrezione urinaria di  $^{26}\text{Al}$  tra i due adiuvanti. A 28 giorni dopo le iniezioni, il 22% del  $^{26}\text{Al}$  proveniente dall'adiuvante fosfato risulta eliminato nelle urine, con differenze sostanziali tra i due conigli studiati (10-33%). Allo stesso tempo, solo il 5,6% (5,0-6,2%) del  $^{26}\text{Al}$  proveniente dall'adiuvante idrossido viene eliminato nelle urine. Il livello di ritenzione  $> 94\%$  a 28 giorni osservato per l'idrossido di Al è coerente con il suo basso tasso di solubilizzazione previsto. Tenendo conto del picco sanguigno iniziale, la cui interpretazione in termini di solubilizzazione è incerta (vedi sopra), gli autori calcolano che a 28 giorni di studio solo il 17% di  $^{26}\text{Al}$  viene assorbito dall'idrossido (rispetto al 51% del fosfato). Di conseguenza la distribuzione di  $^{26}\text{Al}$  nei diversi tessuti mostra concentrazioni sistematicamente più elevate per la forma fosfato (con un fattore di circa  $\times 2,9$ ).

La distribuzione è simile per entrambi gli adiuvanti (rene > milza > fegato > cuore > linfonodo > cervello), con alcune riserve a causa della mancanza di analisi del muscolo nel sito di iniezione, dei linfonodi drenanti e dell'osso. Questa distribuzione tissutale di  $^{26}\text{Al}$  è valida solo per il breve periodo di studio. Questo punto è particolarmente importante se si considera la possibilità di una traslocazione lenta dell'idrossido di Al dal sito di iniezione agli organi linfoidi [70] e al cervello [69].

Gli autori sottolineano correttamente che l'eliminazione urinaria di  $^{26}\text{Al}$  persiste in stato stazionario per entrambi gli adiuvanti a 28 giorni dopo le iniezioni. Tuttavia, lo studio della dose cumulativa escreta ha mostrato un chiaro aumento nel tempo, in uno dei conigli, per l'adiuvante a base di fosfato, mentre la pendenza era nettamente inferiore per il secondo coniglio e quasi piatta per l'adiuvante di idrossido di alluminio (Figura 1B). Questi risultati indicano che l'escrezione può essere lenta per il fosfato di Al ed è molto lenta per l'idrossido di Al. Gli autori affermano che "lo scioglimento, l'assorbimento, la distribuzione e l'eliminazione degli adiuvanti di Al è stato dimostrato" grazie al loro studio. Piuttosto che parlare della natura rassicurante di questi risultati [53], avrebbe dovuto essere formulata dagli autori una conclusione inversa dal punto di vista della sicurezza del vaccino, evidenziando la bassa dissoluzione e la bassa eliminazione degli

adiuvanti di Al, specialmente per l'adiuvante a base di idrossido e la necessità di ulteriori studi a lungo termine su un numero maggiore di animali. Le stesse agenzie di regolamentazione sarebbero state ben disposte a disporre di studi tossico-cinetici complementari al fine di evitare la propagazione di informazioni pericolose sulla rapida eliminazione degli adiuvanti di Al [54], specialmente dopo aver preso conoscenza degli studi successivi che mostravano la fagocitosi, la persistenza intracellulare, la migrazione a distanza e la neurotossicità degli adiuvanti di Al [21,50,69,70].

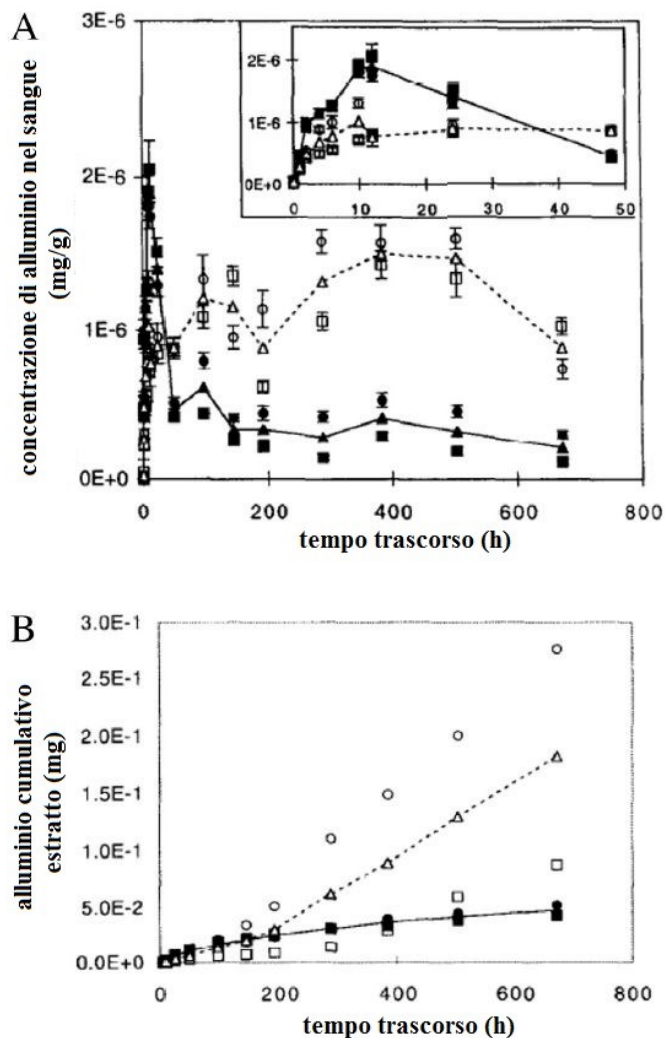


Fig. 1.

A: Questa figura corrisponde alla Fig. 1 originale in Flarend et al. [52], che mostra la cinetica della concentrazione plasmatica di  $^{26}\text{Al}$  dopo iniezione intramuscolare di idrossido di  $^{26}\text{Al}$  e fosfato di  $^{26}\text{Al}$  nei conigli.

B: Questa figura corrisponde alla figura 2 in originale Flarend et al.. [52], che mostra l'escrezione urinaria cumulativa di  $^{26}\text{Al}$  dopo iniezione intramuscolare di idrossido  $^{26}\text{Al}$  e fosfato  $^{26}\text{Al}$  nei conigli. Riproduzione di queste figure con permesso (licenza Elsevier n. 4101280853249).

### 3.2. Calcoli teorici che hanno suggerito la sicurezza di più dosi di vaccino a base di Al somministrate ai bambini [73,74]

Due studi hanno confrontato l'impatto teorico dell'Alluminio alimentare e quello vaccino-derivato nei neonati [73,74]. Il principio dei due studi è simile: si tratta di calcoli teorici basati sull'assunzione e l'escrezione dell'alluminio dalla nascita a 12 mesi. L'accumulo calcolato di alluminio viene confrontato con il livello di sicurezza determinato per la via orale dall'Agenzia per le sostanze tossiche e il registro delle malattie di Atlanta (ATSDR). L'ATSDR definisce un livello minimo di rischio (LMR) che tiene conto del rischio di neurotossicità dell'alluminio somministrato per via orale. Questo LMR orale è stato fissato in seguito ad esperimenti su animali ed estrapolato sull'uomo utilizzando dei fattori di correzione. I risultati "rassicuranti" di questi due studi teorici sono stati un forte argomento a favore della sicurezza degli adiuvanti di Al [4,54]. Inoltre, un singolo studio diretto è stato condotto su neonati umani, a breve termine (24 ore) nei neonati pretermine [75].

### 3.2.1. Studio di Keith et al. [74]: la soglia di "sicurezza" troppo alta, il modello di assorbimento errato e l'imaturità dell'organo chiave non sono stati considerati

#### 3.2.1.1. Descrizione dello studio.

Keith et al. [74] hanno stimato l'accumulo di alluminio nel corpo in base all'età e al peso dei bambini da 0 a 12 mesi. L'accumulo alimentare (allattamento al seno e/o alimentazione artificiale) è stato calcolato prendendo in considerazione un fattore di assorbimento intestinale dello 0,78%. Il contributo dei vaccini, cioè 7 iniezioni a 0, 2, 4, 6 e 12 mesi (3 antiepatite B e 4 DTaP (difterite-tetano-pertosse acellulare)) è stato calcolato assumendo che Al iniettato venga immediatamente assorbito al 100% e che il profilo tossico-cinetico è quello descritto e modellato da Priest per l'<sup>26</sup>Al-solubile iniettato per via endovenosa nell'uomo [56].

Queste assunzioni sono state confrontate con un profilo di "sicurezza" prendendo in considerazione l'aumento di peso da 0 a 12 mesi e un LMR di 2 mg Al/kg/g [76]. Questo LMR è stato definito da uno studio precedente di Golub et al. [77] che aveva studiato l'attività motoria dei topi sottoposti a un mangime contenente lattato di Al. In questi topi il livello di Effetti Avversi Non-Osservabili (NOAEL) era di 62 mg Al/kg/g, corretto da un fattore  $\times 30$  [fattore di estrapolazione  $\times 3$  da topo a uomo e fattore  $\times 10$  per variabilità interindividuale], che produceva un LMR di 2 mg Al/kg/g [75]. Lo studio di Keith et al. [74] ha mostrato che l'accumulo di Al da vaccini era circa il doppio rispetto all'assunzione di cibo, ma rimaneva ampiamente al di sotto della curva di LMR. Tuttavia, gli autori hanno sottolineato che nel loro modello, i vaccini, nel programma vaccinale, hanno prodotto picchi ad ogni iniezione, e quello del secondo mese ha brevemente superato la curva LMR e quelli del 4° e 6° mese erano precisamente al limite di questa curva (Fig. 2).

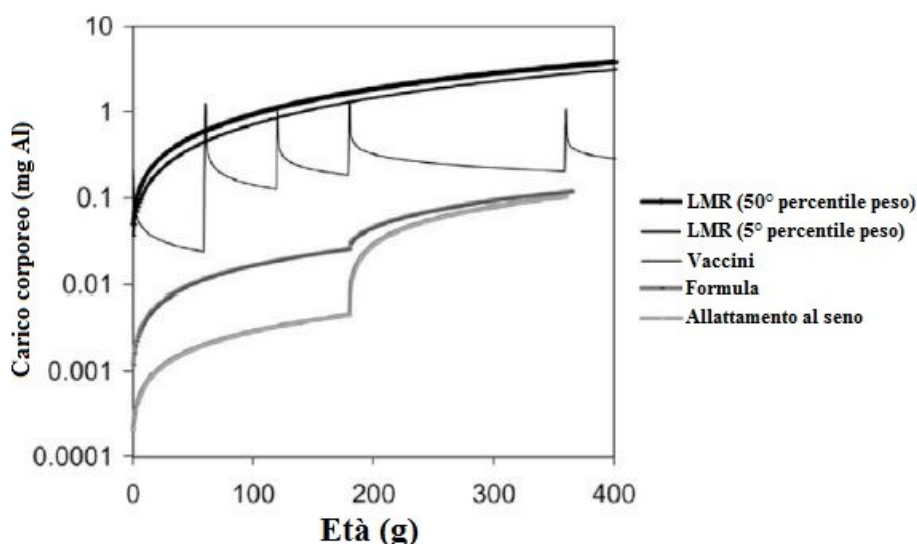


Fig. 2. Figura di Keith et al. [74] valutazione dei contributi del carico corporeo di Al dalla dieta e dai vaccini nei neonati. La curva limite di sicurezza integra il livello minimo di rischio orale (LMR) basato su un valore sperimentale di livello avverso non osservabile (NOAEL) di 62 mg Al/kg/d, e il peso corporeo dei bambini statunitensi. In caso di un assorbimento immediato del 100% di Al da vaccino, esiste un transitorio passaggio del limite di sicurezza Al a 2 mesi e picchi che raggiungono il limite a 4 e 6 mesi. Riproduzione di questa figura con permesso (licenza Elsevier n. 4101280948254).

#### 3.2.1.2. Critica dello studio.

I limiti e le imperfezioni metodologiche del modello di Keith et al. [74] hanno giustificato il successivo studio di Mitkus et al. [73]. Mitkus et al. hanno ritenuto che alcune limitazioni nel lavoro di Keith, di seguito dettagliate, meritassero un nuovo studio:

- Il successivo ampliamento del programma vaccinale pediatrico raccomandato negli Stati Uniti per l'età compresa tra 0 e 12 mesi; 3 Vaccini con adiuvanti di Al (7 iniezioni) sono stati aggiunti ai vaccini per epatite B e DTaP, compresi i vaccini contro Haemophilus influenzae, Pneumococco ed Epatite A. Nel 2016, 17 iniezioni con adiuvanti di Al sono state raccomandate dal CDC per i bambini di età compresa tra 0 e 18 mesi (Tabella 2) [78]. Questo numero è il massimo a causa del possibile uso di vari vaccini multivalenti;
- Successiva riduzione del livello di sicurezza per Al, con LMR orale che diminuisce da 2 a 1 mg Al/kg/d nel 2008 [78];



- Mancata considerazione dell'immaturità della funzione di filtrazione glomerulare nel neonato che può influire sulla rimozione dell'alluminio [73]; va notato che la questione della barriera emato-encefalica non è stata presa in considerazione anche se lo sviluppo del sistema nervoso è notoriamente sensibile alle esposizioni tossiche [80]. La questione dell'immaturità della barriera ematoencefalica è un problema importante nella potenziale tossicità degli adiuvanti di Al. Nel suo rapporto, l'Accademia nazionale di farmacia francese [13] ritiene che "la barriera emato-encefalica, che è formata in modo incompleto nelle fasi prenatale e post-natale, è più permeabile alle sostanze tossiche. Inoltre, il cervello è più vascolarizzato tra i 6 e i 13 anni a causa delle sue maggiori esigenze di maturazione. [...] Gli studi tossicologici sperimentali condotti su animali giovani [...] sono obbligatori poiché gli studi epidemiologici sui bambini [...] sono difficilmente attuabili "[13].
- Necessario aggiornamento della curva di peso dei bambini americani [72];
- Miglioramento nel 2004 della modelli matematici della ritenzione di <sup>26</sup>Al con iniezione endovenosa nell'uomo, che ora comprende 3 fasi di assorbimento con emivite dell'Al rispettivamente di 1.4, 40 e 1727 giorni [81];
- E soprattutto, tenendo conto dei risultati di Flarend et al. [52] che mostrano che l'assorbimento di Al (solubilizzazione) dagli adiuvanti, non può in nessun caso essere considerato pari al 100% immediatamente dopo l'iniezione.

**Tabella 2**

Programma di vaccinazione raccomandato per i bambini di età compresa tra 0 e 18 mesi [CDC 2016].

| Età [mesi] |   | Alla nascita | 2 | 4 | 6 | 12 | 15 | 18 |
|------------|---|--------------|---|---|---|----|----|----|
| Vaccino    | Epatite B                                     | X            | X |   | X |    |    |    |
|            | Rotavirus                                     |              | X | X | X |    |    |    |
|            | DTaP (difterite, tetano, pertosse acellulare) |              | X | X | X |    | X  |    |
|            | Hib (Haemophilus influenzae)                  |              | X | X | X |    | X  |    |
|            | Pneumococcusa                                 |              | X | X | X |    | X  |    |
|            | PVI (poliovirus inattivato)                   |              | X | X | X |    |    |    |
|            | Influenza                                     |              |   |   |   |    | X  | X  |
|            | Parotite morbillo Rosolia                     |              |   |   |   |    | X  |    |
|            | Piccolo vaiolo                                |              |   |   |   |    | X  |    |
|            | Epatite A                                     |              |   |   |   |    | X  | X  |

<sup>a</sup> Vaccino contenente Al (idrossido di Al e / o fosfato di Al).

3.2.2. Lo studio di Mitkus et al. [73]: soglia "sicurezza" ancora troppo alta, nano/microparticolato di Al non considerato potenzialmente nocivo

### 3.2.2.1. Descrizione dello studio

In questo studio, Mitkus et al. hanno ripercorso la metodologia di Keith, tenendo conto di tutte le limitazioni sopra elencate. Inizialmente, non hanno preso in considerazione i risultati farmacocinetici di Flarend, confermando l'ipotesi di Keith che, se l'assorbimento plasmatico di Al da vaccini rappresentasse immediatamente il 100% della dose - un'ipotesi che massimizza il carico corporeo -, si verificherebbe un passaggio transitorio della soglia di sicurezza calcolata a 2 mesi e un picco al limite della soglia a 4 mesi. Quindi Mitkus et al. hanno preso in considerazione il lento assorbimento (solubilizzazione) dell'Al degli adiuvanti mostrati da Flarend e, nel fare ciò, hanno trovato un margine di sicurezza a quanto pare alto. Per costruire il loro modello, Mitkus et al. ragionarono come segue: dato che nello studio Flarend a 28 giorni dopo le iniezioni l'assorbimento dell'alluminio nel sangue era del 51% per l'adiuvante fosfato, ci sarebbero voluti altri 28 giorni per assorbire l'intera dose di adiuvante iniettata (totale 56 giorni). Analogamente, poiché a 28 giorni l'assorbimento nel sangue di Al era del 17% per l'idrossido di Al, il completo assorbimento avrebbe richiesto 137 giorni aggiuntivi (165 giorni totali). La quantità cumulativa calcolata di alluminio assorbito dai vaccini risulta significativamente più alta di quella dell'assorbimento alimentare di Al (fattore ×2), ma rimaneva al di sotto del livello di sicurezza per il fosfato di Al, e molto in basso per l'idrossido di Al (Figura 3). La conclusione dell'autore è che l'Al dei vaccini è improbabile che abbia un'influenza significativa sul carico corporeo di Al dell'organismo del bambino, implicando una buona sicurezza di adiuvanti di Al da 0 a 12 mesi.

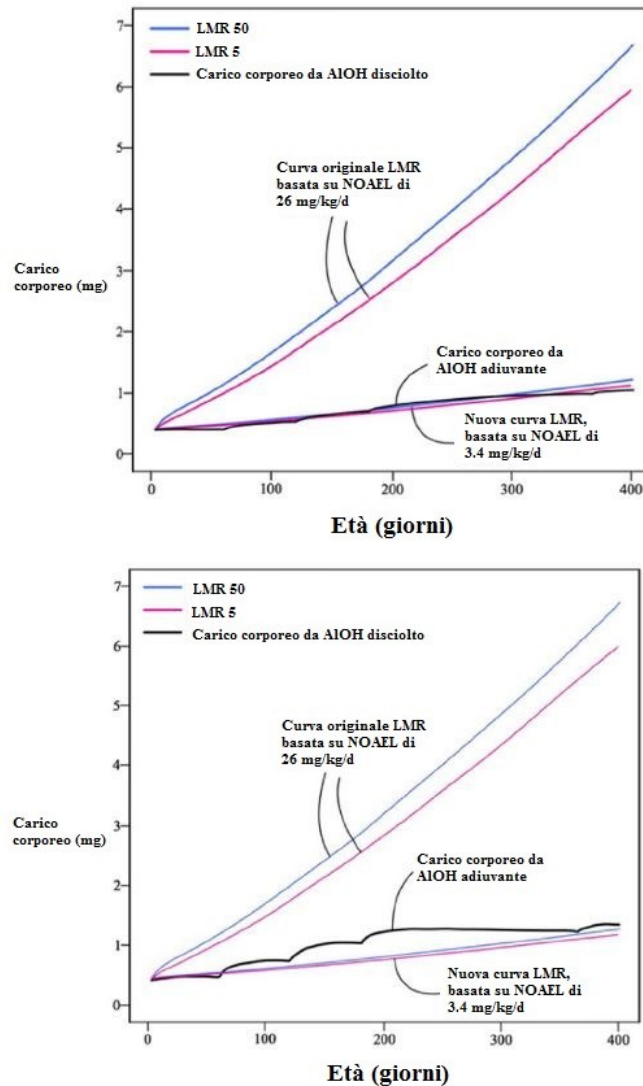


Fig. 3. Queste curve derivano da quelle di Mitkus et al. [73], nei neonati. In entrambi i grafici le curve minime del Livello di Rischio Minimo (LMR) (le due curve superiori) dell'articolo originale erano basate su un livello sperimentale di effetti avversi non osservabili (NOAEL) di 26 mg/kg/d e curve di peso corporeo americano attualizzate integrate; le curve MRL rivedute (le due curve inferiori) si basano su un NOAEL attualizzato di 3,4 mg Al / kg / d [88,91]. Al assorbito sia da idrossido di Al che da fosfato di alluminio secondo Flarend et al. [52] tassi di assorbimento, mostra il superamento del limite di sicurezza.

### 3.2.2.2. Lo studio di Mitkus soffre di una serie di pregiudizi importanti.

- Un LMR orale inappropriato è stato utilizzato per definire la curva di sicurezza

Si diceva che l'Al ingerito attraversasse la barriera intestinale nella sua forma ionica [74]. D'altra parte, gli adiuvanti sono nanoparticelle aggregate in microparticelle somministrate direttamente oltre la barriera cutanea. Tuttavia, la tossicità particellare coinvolge molti altri parametri rispetto alla dose. In particolare, la superficie delle particelle aumenta esponenzialmente quando la dimensione delle particelle diminuisce [e il numero di particelle aumenta] per una data massa di materiale [82]. Nella sua forma particellare, Al viene rapidamente catturato e quindi trasportato a distanza dalle cellule immunitarie [21,50,69,70]. Il confronto tra la tossicità chimica degli ioni Al, come quelli assorbiti a livello intestinale, e la tossicità del particolato dei sali di Al iniettati IM è quindi una sciocchezza [83]. Ciò è evidenziato dalla curva atipica dose-risposta degli effetti neurotossici dell'idrossido di Al, con trasferimento cerebrale dell'alluminio e un effetto clinico selettivamente osservato per basse dosi, che si avvicina a quelle descritte nella tossicologia del particolato [84]. Strettamente parlando, LMR utilizzato per la modellazione rischio vaccino dovrebbe essere definito sulla base di esperimenti su animali condotti con adiuvanti di alluminio, monitorati per i loro parametri delle particelle per essere in accordo con quelle dei vaccini, e iniettata IM, piuttosto che studi con forme solubili di Al [cloruro o lattato] aggiunti al cibo o all'acqua potabile.

- *Sulla base di dati sperimentali, l'MRL orale imposta la curva di sicurezza troppo alta.*

LMR di 1 mg/kg/g [79] è stato determinato su un NOAEL di 26 mg/kg/g osservato nei topi nel 2001 [85]. Tuttavia, vi sono numerose segnalazioni di effetti neurotossici nei topi e nei ratti, confermate da alterazioni neurobiologiche coerenti, per dosi orali di Al molto <26 mg/kg/d: 6 mg/kg/g riportati nel 1993 [86], 5.6 mg/kg/d riportati nel 2008 e nel 2009 [87,88], 10 mg/kg/d nel 2016 [89], 3.4 mg/kg/d nel 2016 e 2017 [90,91] e anche 1.5 mg/kg/d segnalato nel 2017 [92]. Basandosi sul valore di LMR orale "ufficiale", Mitkus di conseguenza impostò la curva di sicurezza ad un livello molto più alto. Questo livello è stato sovrastimato di un fattore fino a 17.3 (ossia 26/1.5) quando si prende in considerazione lo studio più recente. Va notato che il rapporto di 1.5 mg/kg/g non è nemmeno un NOAEL poiché gli effetti sono stati documentati con questa dose [92]. La figura 3 mostra che anche se si utilizzano NOAEL sperimentali più elevati per il calcolo, ad es. 3.4 mg/kg/d, il limite di sicurezza è raggiunto (idrossido) o superato (fosfato) dall'Al provenienti dagli adiuvanti dei vaccini. In queste condizioni, la sicurezza degli adiuvanti di Al nei neonati non può essere garantita senza dubbi sulla base dello studio Mitkus. La potenziale tossicità del particolato di Al non è stata considerata.

Come Flarend prima di lui [52], Mitkus et al. a quanto pare considerarono che solo l'Al solubile ha un potenziale tossico. La sua stima riguardo la durata della completa traslocazione dell'Al dal sito iniettato al sangue (<2 mesi per il fosfato, 5,5 mesi per l'idrossido) si basa su un calcolo semplicistico (vedi sopra) in quanto non tiene in considerazione che le curve di Flarend suggeriscono che il completamento della traslocazione di Al nel plasma è in corso (fosfato) o quasi raggiunta (idrossido) già il 28° giorno (vedi sopra). Il corollario di questo calcolo semplicistico è una sottostima del tempo di bio-persistenza di Al in forma particellare. Gli studi istologici condotti dopo iniezione intramuscolare (IM) di idrossido di Al hanno mostrato che il particolato di Al e i granulomi che induce sono ancora rilevabili nel muscolo iniettato dopo mesi negli studi su animali [60,61] e diversi anni (fino a 12 anni) in pazienti adulti con sindrome da stanchezza cronica post-vaccino [93]. Sebbene i fattori genetici possano spiegare la bassa solubilizzazione intracellulare di idrossido di alluminio in individui sensibili [93], la sottostima della resistenza verso la dissoluzione degli adiuvanti di alluminio da parte di Mitkus è certa e significativa.

Un altro limite dello studio Mitkus è che non tiene conto del fatto che l'adiuvante, nella sua forma particellare, può migrare lontano dal muscolo. Studi sperimentali hanno dimostrato che la lunga bio-persistenza intracellulare dell'idrossido di Al si riferisce a particelle osservate nel sito di iniezione così come a quelle trasportate in organi distanti [70]. Nei topi le particelle di idrossido di Al sono infatti trasportate dalle cellule del lignaggio monocitico, prima ai linfonodi drenanti e poi, probabilmente attraverso il dotto toracico, al flusso sanguigno, raggiungendo quindi organi distanti come la milza o anche il cervello, dove un accumulo lento e ritardato può essere osservato nelle cellule microgliali e nei neuroni [50,69]. Dopo una singola iniezione IM, la penetrazione cerebrale delle particelle è bassa ma aumenta considerevolmente sotto l'influenza del Monocyte Chemoattractant Protein-1/Chemokine Ligand (MCP-1/CCL2) indicando, ed è accompagnata dall'espressione cellulare di Interleukin IL1beta, un effetto atteso dell'adiuvante Al che induce l'attivazione dell'inflammasome [69]. Infine, va notato che effetti neurotossici sono stati osservati nei topi iniettati con dosi di idrossido di Al che riproducono un equivalente del programma di vaccinazione americano da 0 a 18 mesi [94]. Considerando solo l'Al solubile, Mitkus pensava che "il deposito di stoccaggio a lungo termine (di Al solubilizzato dal sito iniettato), è probabilmente scheletrico e non un sistema di organi molli più sensibili, è rassicurante". Questa rassicurante ipotesi non ha tenuto conto del destino del particolato di Al. Allo stesso modo, uno studio recente condotto su neonati prematuri vaccinati all'età di 2 mesi [75], si è concentrato solo sull'Al solubile rilevabile nei fluidi corporei: gli autori curiosamente hanno trovato "rassicurante" il fatto che non hanno notato un aumento di Al nel siero e nelle urine 24 ore dopo la somministrazione di vaccini contenenti una dose totale di 1200 µg Al (circa 200 µg/kg) [75]. L'assenza sia di un assorbimento rilevabile, che di una rapida eliminazione di Al degli adiuvanti rappresenta piuttosto una ragione legittima di preoccupazione, poiché, come da corollario, indica probabilmente la persistenza sistemica di particelle di Al immunostimolatorie e neurotossiche trasferite in organi linfoidi e che potrebbero potenzialmente raggiungere il cervello [70, 84].

## 4. Conclusion

La gloriosa storia dei vaccini fu ampiamente costruita su base empirica durante il secolo scorso. Questo è stato il caso degli adiuvanti di alluminio di prima generazione che, tuttavia, si sono dimostrati molto utili sin dalla loro introduzione nel 1926. Questi adiuvanti sono ancora destinati a essere somministrati a miliardi di individui nei prossimi anni, a causa di una massiccia espansione delle strategie di prevenzione dei vaccini annunciate in tutto il mondo [2]. In questo contesto, date le loro gravi debolezze concettuali e metodologiche, i 3 studi tossicocinetici disponibili costituiscono oggettivamente basi insufficienti per garantire l'assoluta sicurezza degli adiuvanti di alluminio somministrati su larga scala, in particolare a lungo termine. La vaccinologia nel 21° secolo è una scienza moderna e forte. Come tale, non può semplicemente fare

affidamento sui suoi successi passati e non fare alcuno sforzo per comprendere con precisione il destino in vivo degli adiuvanti di alluminio, con il rischio di perdere la necessaria fiducia nelle popolazioni che sono diventate estremamente sensibili a ogni dimensione della salute globale.

Ci sembra assolutamente obbligatorio condurre nuovi esperimenti tossicocinetici, compresi studi a lungo termine, sotto lo stretto controllo delle autorità sanitarie, al fine di garantire il massimo livello di sicurezza degli adiuvanti in alluminio sia classici che di nuova generazione utilizzati nei vaccini.

## Disclosure

Gli autori riportano no conflitti di interesse.

## Acknowledgments

Si ringrazia ANSM (BNAA-vacc project, # HAAP grant 2013), Ile-de-France Region (NEUROTOXALU project, # PICRI grant 36) e CMSRI (VACCINophagy project, #20617) per il finanziamento.

## References

- [1] O. Launay, Dossier vaccins et vaccination, <http://www.inserm.fr/thematiques/immunologie-inflammation-infectiologie-et-microbiologie/dossiers-d'information/vaccins-et-vaccination/>, (2015).
- [2] M. Kaddar, Global Vaccine Market Features and Trends, [http://www.who.int/immunization/programmes\\_systems/procurement/market/world\\_vaccine\\_market\\_trends.pdf](http://www.who.int/immunization/programmes_systems/procurement/market/world_vaccine_market_trends.pdf), (2012), Accessed date: 16 December 2010.
- [3] DILA (Direction de l'information légale et administrative), Vaccins: comment rétablir la confiance et augmenter la couverture de la population, <http://www.viepublique.fr/actualite/alaune/vaccins-comment-retablir-confiance-augmentercouverture-population-20161206.html/>, (2016).
- [4] P. Bégué, M. Girard, H. Bazin, J.-F. Bach, Les adjuvants vaccinaux: quelle actualité en 2012? Bull. Acad. Natl Med. 196 (2012) 1177–1181.
- [5] A.T. Glennly, C.G. Pope, H. Waddington, U. Wallace, Immunological notes. XVII–XXIV, J. Pathol. Bacteriol. 29 (1926) 31–40.
- [6] E3M, Association d'Entraide aux Malades de Myofasciite à Macrophages, <http://www.asso-e3m.fr/>, (2015).
- [7] REVAHB, Association des victimes du vaccin hépatite B, <http://www.revahb.fr/>, (2016).
- [8] R.K. Gherardi, Toxic story: deux ou trois vérités embarrassantes sur les adjuvants des vaccins, Actes sud, Paris, 2016.
- [9] P. Sansonetti, Vaccins, Odile Jacob, Paris, 2017.
- [10] Vaccine Papers, an Objective Look at Vaccine Dangers, <http://vaccinepapers.org/>, (2015).
- [11] InVS-Afssa-Afssaps, Aluminium, Quels risques pour la santé ? Synthèse des études épidémiologiques, [http://invs.santepubliquefrance.fr/publications/2003/aluminium\\_2003/rapport\\_alu.pdf/](http://invs.santepubliquefrance.fr/publications/2003/aluminium_2003/rapport_alu.pdf/), (2003).
- [12] Haut Conseil de Santé Publique, Aluminium et vaccins, <http://www.hcsp.fr/>, (2013).
- [13] Académie nationale de Pharmacie, Les adjuvants aluminiques, [http://www.acadpharm.org/dos\\_public/Rapport\\_Adjuvants\\_aluminiques\\_VF\\_CORR\\_5.pdf/](http://www.acadpharm.org/dos_public/Rapport_Adjuvants_aluminiques_VF_CORR_5.pdf/), (2016).
- [14] Groupe d'Etudes sur la vaccination, Assemblée Nationale, Les 11 recommandations, [http://www.alis-france.com/download/Groupe\\_etudes\\_vaccins.pdf/](http://www.alis-france.com/download/Groupe_etudes_vaccins.pdf/), (2012).
- [15] Office Parlementaire d'Évaluation des Choix Scientifiques et Technologiques (OPECST), Les adjuvants vaccinaux: une question controversée, [http://www.ladocumentationfrancaise.fr/Rapports\\_publics/](http://www.ladocumentationfrancaise.fr/Rapports_publics/), (2014).
- [16] S. Richards, G. Chalkiadis, R. Lakshman, J.P. Buttery, N.W. Crawford, Complex regional pain syndrome following immunisation, Arch. Dis. Child. 97 (2012) 913–915, <http://dx.doi.org/10.1136/archdischild-2011-301307>.
- [17] Report of the working group on the possible relationship between hepatitis B vaccination and the chronic fatigue syndrome, CMAJ 149 (1993) 314–319.
- [18] W.A. Jastaniah, S. Dobson, J.G. Lugsdin, R.E. Petty, Complex regional pain syndrome after hepatitis B vaccine, J. Pediatr. 143 (2003) 802–804, [http://dx.doi.org/10.1067/S0022-3476\(03\)00536-5](http://dx.doi.org/10.1067/S0022-3476(03)00536-5).
- [19] L. Brinth, Is chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis a relevant diagnosis in patients with suspected side effects to human papilloma virus vaccine? Int. J. Vaccines Vaccination 1 (2015), <http://dx.doi.org/10.15406/ijyv.2015.01.00003>.

- [20] L.S. Brinth, K. Pors, A.C. Theibel, J. Mehlsen, Orthostatic intolerance and postural tachycardia syndrome as suspected adverse effects of vaccination against human papilloma virus, *Vaccine* 33 (2015) 2602–2605, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.03.098>.
- [21] R.K. Gherardi, M. Coquet, P. Cherin, L. Belec, P. Moretto, P.A. Dreyfus, J.F. Pellissier, P. Chariot, F.J. Authier, Macrophagic myofasciitis lesions assess longterm persistence of vaccine-derived aluminium hydroxide in muscle, *Brain* 124 (2001) 1821–1831.
- [22] F.-J. Authier, S. Sauvat, J. Champey, I. Drogou, M. Coquet, R.K. Gherardi, Chronic fatigue syndrome in patients with macrophagic myofasciitis, *Arthritis Rheum.* 48 (2003) 569–570, <http://dx.doi.org/10.1002/art.10740>.
- [23] D. Bonnefont-Rousselot, C. Chantalat-Auger, A. Teixeira, M.-C. Jaudon, S. Pelletier, P. Cherin, Blood oxidative stress status in patients with macrophagic myofasciitis, *Biomed Pharmacother* 58 (2004) 516–519, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2004.04.012>.
- [24] C. Exley, L. Swarbrick, R.K. Gherardi, F.-J. Authier, A role for the body burden of aluminium in vaccine-associated macrophagic myofasciitis and chronic fatigue syndrome, *Med. Hypotheses* 72 (2009) 135–139, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2008.09.040>.
- [25] A. Shivane, D.A. Hilton, R.M. Moate, P.R. Bond, A. Endean, Macrophagic myofasciitis: a report of second case from UK, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 38 (2012) 734–736, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2990.2012.01293.x>.
- [26] B. Palmieri, D. Poddighe, M. Vadalà, C. Laurino, C. Carnovale, E. Clementi, Severe somatoform and dysautonomic syndromes after HPV vaccination: case series and review of literature, *Immunol. Res.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1007/s12026-016-8820-z>.
- [27] N. Agmon-Levin, Y. Zafrir, S. Kivity, A. Balofsky, H. Amital, Y. Shoenfeld, Chronic fatigue syndrome and fibromyalgia following immunization with the hepatitis B vaccine: another angle of the “autoimmune (auto-inflammatory) syndrome induced by adjuvants” (ASIA), *Immunol. Res.* 60 (2014) 376–383, <http://dx.doi.org/10.1007/s12026-014-8604-2>.
- [28] T. Kinoshita, R.-T. Abe, A. Hineno, K. Tsunekawa, S. Nakane, S.-I. Ikeda, Peripheral sympathetic nerve dysfunction in adolescent Japanese girls following immunization with the human papillomavirus vaccine, *Intern. Med.* 53 (2014) 2185–2200.
- [29] O. Hotta, A. Tanaka, A. Torigoe, K. Imai, N. Ieiri, Japanese Focal Inflammation Research Group, Involvement of chronic epipharyngitis in autoimmune (auto-inflammatory) syndrome induced by adjuvants (ASIA), *Immunol. Res.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1007/s12026-016-8859-x>.
- [30] M. Martínez-Lavín, L.-A. Martínez-Martínez, P. Reyes-Loyola, HPV vaccination syndrome. A questionnaire-based study, *Clin. Rheumatol.* 34 (2015) 1981–1983, <http://dx.doi.org/10.1007/s10067-015-3070-3>.
- [31] T. Santiago, O. Rebelo, L. Negrão, A. Matos, Macrophagic myofasciitis and vaccination: consequence or coincidence? *Rheumatol. Int.* 35 (2015) 189–192, <http://dx.doi.org/10.1007/s00296-014-3065-4>.
- [32] S. Blitshteyn, Postural tachycardia syndrome following human papillomavirus vaccination, *Eur. J. Neurol.* 21 (2014) 135–139, <http://dx.doi.org/10.1111/ene.12272>.
- [33] R.E. Chandler, K. Juhlin, J. Fransson, O. Caster, I.R. Edwards, G.N. Norén, Current safety concerns with human papillomavirus vaccine: a cluster analysis of reports in VigiBase®, *Drug Saf.* 40 (2017) 81–90, <http://dx.doi.org/10.1007/s40264-016-0456-3>.
- [34] A.K. Gonçalves, R.N. Cobucci, H.M. Rodrigues, A.G. de Melo, P.C. Giraldo, Safety, tolerability and side effects of human papillomavirus vaccines: a systematic quantitative review, *Braz. J. Infect. Dis.* 18 (2014) 651–659, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2014.02.005>.
- [35] C. Exley, Aluminium-based adjuvants should not be used as placebos in clinical trials, *Vaccine* 29 (2011) 9289, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.08.062>.
- [36] European Medicines Agency, Assessment Report. Human Papilloma Virus (HPV) Vaccines, [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Referrals\\_document/HPV\\_vaccines\\_20/Opinion\\_provided\\_by\\_Committee\\_for\\_Medicinal\\_Products\\_for\\_Human\\_Use/WC500197129.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Referrals_document/HPV_vaccines_20/Opinion_provided_by_Committee_for_Medicinal_Products_for_Human_Use/WC500197129.pdf), (2015).
- [37] M. Zureik, R. Dray-Spira, S. Miranda, C. Collin, Vaccins anti-HPV et risque de maladies auto-immunes: étude pharmacoépidémiologique (Rapport CNAM/ANSM), [http://ansm.sante.fr/var/ansm\\_site/storage/original/application/ea5e12b9c18ae41c2b8163ae5d7cb6f3.pdf](http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/ea5e12b9c18ae41c2b8163ae5d7cb6f3.pdf), (2015), Accessed date: 17 April 2012.
- [38] N.M. Scheller, H. Svanström, B. Pasternak, L. Arnheim-Dahlström, K. Sundström, K. Fink, A. Hviid, Quadrivalent HPV vaccination and risk of multiple sclerosis and other demyelinating diseases of the central nervous system, *JAMA* 313 (2015) 54–61, <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2014.16946>.
- [39] P.C. Gøtzsche, K.J. Jørgensen, T. Jefferson, M. Auken, L. Brinth, Complaint to the European Medicines Agency (EMA) Over Maladministration at the EMA,

- <https://nordic.cochrane.org/sites/nordic.cochrane.org/files/public/uploads/ResearchHighlights/Complaint-to-EMA-over-EMA.pdf>, (2016).
- [40] R.K. Gherardi, Lessons from macrophagic myofasciitis: towards definition of a vaccine adjuvant-related syndrome, *Rev. Neurol. (Paris)* 159 (2003) 162–164.
- [41] Y. Shoenfeld, N. Agmon-Levin, “ASIA” - autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants, *J. Autoimmun.* 36 (2011) 4-8, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2010.07.003>.
- [42] N. Petrovsky, Comparative safety of vaccine adjuvants: a summary of current evidence and future needs, *Drug Saf.* 38 (2015) 1059-1074, <http://dx.doi.org/10.1007/s40264-015-0350-4>.
- [43] WHO, *Weekly Epidemiological Record*, 79(29) Global Advisory Committee on Vaccine Safety, 2004, p. 269.
- [44] A.R. Spickler, J.A. Roth, Adjuvants in veterinary vaccines: modes of action and adverse effects, *J. Vet. Intern. Med.* 17 (2003) 273-281.
- [45] B.S. Thompson, P.M. Chilton, J.R. Ward, J.T. Evans, T.C. Mitchell, The low-toxicity versions of LPS, MPL adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4+ T cells, *J. Leukoc. Biol.* 78 (2005) 1273-1280, <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0305172>.
- [46] M.J. Caulfield, L. Shi, S. Wang, B. Wang, T.W. Tobery, H. Mach, P.L. Ahl, J.L. Cannon, J.C. Cook, J.H. Heinrichs, R.D. Sitrin, Effect of alternative aluminum adjuvants on the absorption and immunogenicity of HPV16 L1 VLPs in mice, *Hum. Vaccin.* 3 (2007) 139-145.
- [47] C. Exley, P. Siesjö, H. Eriksson, The immunobiology of aluminium adjuvants: how do they really work? *Trends Immunol.* 31 (2010) 103-109, <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2009.12.009>.
- [48] P. Marrack, A.S. McKee, M.W. Munks, Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium, *Nat. Rev. Immunol.* 9 (2009) 287-293, <http://dx.doi.org/10.1038/nri2510>.
- [49] N.W. Baylor, W. Egan, P. Richman, Aluminum salts in vaccines. US perspective, *Vaccine* 20 (Suppl. 3) (2002) S18-23.
- [50] H. Eidi, M.-O. David, G. Crépeaux, L. Henry, V. Joshi, M.-H. Berger, M. Sennour, J. Cadusseau, R.K. Gherardi, P.A. Curmi, Fluorescent nanodiamonds as a relevant tag for the assessment of alum adjuvant particle biodisposition, *BMC Med.* 13 (2015), <http://dx.doi.org/10.1186/s12916-015-0388-2>.
- [51] M. Mold, E. Shardlow, C. Exley, Insight into the cellular fate and toxicity of aluminium adjuvants used in clinically approved human vaccinations, *Sci. Rep.* 6 (2016) 31578, , <http://dx.doi.org/10.1038/srep31578>.
- [52] R.E. Flarend, S.L. Hem, J.L. White, D. Elmore, M.A. Suckow, A.C. Rudy, E.A. Dandashli, In vivo absorption of aluminium-containing vaccine adjuvants using 26Al, *Vaccine* 15 (1997) 1314-1318.
- [53] T.C. Eickhoff, M. Myers, Workshop summary. Aluminum in vaccines, *Vaccine* 20 (Suppl. 3) (2002) S1-4.
- [54] Oxford Vaccine Group, University of Oxford. Vaccine Knowledge Project. Authoritative Information for All 2015, <http://vk.ovg.ox.ac.uk/> (accessed in 2016, content subsequently modified).
- [55] S.L. Hem, Elimination of aluminum adjuvants, *Vaccine* 20 (Suppl. 3) (2002) S40-43.
- [56] N.D. Priest, D. Newton, J.P. Day, R.J. Talbot, A.J. Warner, Human metabolism of aluminium-26 and gallium-67 injected as citrates, *Hum. Exp. Toxicol.* 14 (1995) 287-293, <http://dx.doi.org/10.1177/096032719501400309>.
- [57] R.J. Talbot, D. Newton, N.D. Priest, J.G. Austin, J.P. Day, Inter-subject variability in the metabolism of aluminium following intravenous injection as citrate, *Hum. Exp. Toxicol.* 14 (1995) 595-599, <http://dx.doi.org/10.1177/096032719501400707>.
- [58] S. Hutchison, R.A. Benson, V.B. Gibson, A.H. Pollock, P. Garside, J.M. Brewer, Antigen depot is not required for alum adjuvant activity, *FASEB J.* 26 (2012) 1272-1279, <http://dx.doi.org/10.1096/fj.11-184556>.
- [59] S.J. Seeber, J.L. White, S.L. Hem, Solubilization of aluminum-containing adjuvants by constituents of interstitial fluid, *J. Parenter. Sci. Technol.* 45 (1991) 156-159.
- [60] F. Verdier, R. Burnett, C. Michelet-Habchi, P. Moretto, F. Fievet-Groyne, E. Sauzeat, Aluminium assay and evaluation of the local reaction at several time points after intramuscular administration of aluminium containing vaccines in the cynomolgus monkey, *Vaccine* 23 (2005) 1359-1367, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.09.012>.
- [61] F.-J. Authier, S. Sauvat, C. Christov, P. Chariot, G. Raisbeck, M.-F. Poron, F. Yiou, R. Gherardi, AIOH3-adjuvanted vaccine-induced macrophagic myofasciitis in rats is influenced by the genetic background, *Neuromuscul. Disord.* 16 (2006) 347-352, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2006.02.004>.
- [62] M. Mold, H. Eriksson, P. Siesjö, A. Darabi, E. Shardlow, C. Exley, Unequivocal identification of intracellular aluminium adjuvant in a monocytic THP-1 cell line, *Sci. Rep.* 4 (2014) 6287, , <http://dx.doi.org/10.1038/srep06287>.
- [63] M. Erdohazi, R.L. Newman, Aluminium hydroxide granuloma, *Br. Med. J.* 3 (1971) 621-623.
- [64] R.E. Mrak, Muscle granulomas following intramuscular injection, *Muscle Nerve* 5 (1982) 637-639, <http://dx.doi.org/10.1002/mus.880050808>.
- [65] D.N. Slater, J.C. Underwood, T.E. Durrant, T. Gray, I.P. Hopper, Aluminium hydroxide granulomas: light and electron microscopic studies and X-ray microanalysis, *Br. J. Dermatol.* 107 (1982) 103-108.

- [66] G.L. Morefield, A. Sokolovska, D. Jiang, H. HogenEsch, J.P. Robinson, S.L. Hem, Role of aluminum-containing adjuvants in antigen internalization by dendritic cells in vitro, *Vaccine* 23 (2005) 1588-1595, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.07.050>.
- [67] S. Sabella, R.P. Carney, V. Brunetti, M.A. Malvindi, N. Al-Juffali, G. Vecchio, S.M. Janes, O.M. Bakr, R. Cingolani, F. Stellacci, P.P. Pompa, A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles, *Nanoscale* 6 (2014) 7052-7061, <http://dx.doi.org/10.1039/c4nr01234h>.
- [68] D.W. Cain, S.E. Sanders, M.M. Cunningham, G. Kelsoe, Disparate adjuvant properties among three formulations of “alum” , *Vaccine* 31 (2013) 653-660, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.11.044>.
- [69] Z. Khan, C. Combadiere, F.-J. Authier, V. Itier, F. Lux, C. Exley, M. Mahrouf-Yorgov, X. Decrouy, P. Moretto, O. Tillement, R.K. Gherardi, J. Cadusseau, Slow CCL2-dependent translocation of biopersistent particles from muscle to brain, *BMC Med.* 11 (2013) 99.
- [70] G. Crépeaux, H. Eidi, M.-O. David, E. Tzavara, B. Giros, C. Exley, P.A. Curmi, C.A. Shaw, R.K. Gherardi, J. Cadusseau, Highly delayed systemic translocation of aluminum-based adjuvant in CD1 mice following intramuscular injections, *J. Inorg. Biochem.* 152 (2015) 199-205, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.07.004>.
- [71] V.R. Walker, R.A. Sutton, O. Meirav, V. Sossi, R. Johnson, J. Klein, D. Fink, R. Middleton, Tissue disposition of 26aluminum in rats measured by accelerator mass spectrometry, *Clin. Invest. Med.* 17 (1994) 420-425.
- [72] Afssaps, Rapport d'expertise: Évaluation du risque lié à l'utilisation de l'aluminium dans les produits cosmétiques, [http://ansm.sante.fr/var/ansm\\_site/storage/original/application/ad548a50ee74cc320c788ce8d11ba373.pdf/](http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/ad548a50ee74cc320c788ce8d11ba373.pdf/), (2011).
- [73] R.J. Mitkus, D.B. King, M.A. Hess, R.A. Forshee, M.O. Walderhaug, Updated aluminum pharmacokinetics following infant exposures through diet and vaccination, *Vaccine* 29 (2011) 9538-9543, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.124>.
- [74] L.S. Keith, D.E. Jones, C.H.S.J. Chou, Aluminum toxicokinetics regarding infant diet and vaccinations, *Vaccine* 20 (Suppl. 3) (2002) S13-17.
- [75] T.Z. Movsas, N. Paneth, W. Rumblei, J. Zyskowski, I.H. Gewolb, Effect of routine vaccination on aluminum and essential element levels in preterm infants, *JAMA Pediatr.* 167 (2013) 870-872.
- [76] ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), Toxicological Profile for Aluminum, Atlanta, GA, <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp22.pdf>, (1999).
- [77] M.S. Golub, J.M. Donald, M.E. Gershwin, C.L. Keen, Effects of aluminum ingestion on spontaneous motor activity of mice, *Neurotoxicol. Teratol.* 11 (1989) 231-235.
- [78] Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Recommended Immunization Schedule for Persons Aged 0 Through 18 Years, <https://www.cdc.gov/vaccines/schedules/hcp/imz/child-adolescent.html>, (2016).
- [79] ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), Toxicological Profile for Aluminum, Atlanta, GA, (2008) ([cdcinfo@cdc.gov](mailto:cdcinfo@cdc.gov)).
- [80] A. Miodovnik, Environmental neurotoxicants and developing brain, *Mt Sinai J. Med.* 78 (2011) 58-77, <http://dx.doi.org/10.1002/msj.20237>.
- [81] N.D. Priest, The biological behaviour and bioavailability of aluminium in man, with special reference to studies employing aluminium-26 as a tracer: review and study update, *J. Environ. Monit.* 6 (2004) 375-403, <http://dx.doi.org/10.1039/b314329p>.
- [82] S. Sharifi, S. Behzadi, S. Laurent, M.L. Forrest, P. Stroeve, M. Mahmoudi, Toxicity of nanomaterials, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 2323-2343, <http://dx.doi.org/10.1039/c1cs15188f>.
- [83] C.C. Willhite, N.A. Karyakina, R.A. Yokel, N. Yenugadhati, T.M. Wisniewski, I.M.F. Arnold, F. Momoli, D. Krewski, Systematic review of potential health risks posed by pharmaceutical, occupational and consumer exposures to metallic and nanoscale aluminum, aluminum oxides, aluminum hydroxide and its soluble salts, *Crit. Rev. Toxicol.* 44 (Suppl. 4) (2014) 1-80, <http://dx.doi.org/10.3109/10408444.2014.934439>.
- [84] G. Crépeaux, H. Eidi, M.-O. David, Y. Baba-Amer, E. Tzavara, B. Giros, F.-J. Authier, C. Exley, C.A. Shaw, J. Cadusseau, R.K. Gherardi, Non-linear dose-response of aluminium hydroxide adjuvant particles: selective low dose neurotoxicity, *Toxicology* 375 (2017) 48-57, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2016.11.018>.
- [85] M.S. Golub, S.L. Germann, Long-term consequences of developmental exposure to aluminum in a suboptimal diet for growth and behavior of Swiss Webster mice, *Neurotoxicol. Teratol.* 23 (2001) 365-372.
- [86] A. Bilkei-Gorzó, Neurotoxic effect of enteral aluminium, *Food Chem. Toxicol.* 31 (1993) 357-361.
- [87] P. Sethi, A. Jyoti, R. Singh, E. Hussain, D. Sharma, Aluminium-induced electrophysiological, biochemical and cognitive modifications in the hippocampus of aging rats, *Neurotoxicology* 29 (2008) 1069-1079, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2008.08.005>.
- [88] P. Sethi, A. Jyoti, E. Hussain, D. Sharma, Curcumin attenuates aluminium-induced functional neurotoxicity in rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 93 (2009) 31-39, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2009.04.005>.
- [89] Z. Cao, X. Yang, H. Zhang, H. Wang, W. Huang, F. Xu, C. Zhuang, X. Wang, Y. Li, Aluminum chloride induces neuroinflammation, loss of neuronal dendritic spine and cognition impairment in developing rat, *Chemosphere* 151 (2016) 289-295, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.092>.

- [90] S.H. Alawdi, E.S. El-Denshary, M.M. Safar, H. Eidi, M.-O. David, M.A. Abdel-Wahhab, Neuroprotective effect of nanodiamond in Alzheimer's disease rat model: a pivotal role for modulating NF- $\kappa$ B and STAT3 signaling, *Mol. Neurobiol.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-016-9762-0>.
- [91] I.H. Borai, M.K. Ezz, M.Z. Rizk, H.F. Aly, M. El-Sherbiny, A.A. Matloub, G.I. Fouad, Therapeutic impact of grape leaves polyphenols on certain biochemical and neurological markers in AlCl<sub>3</sub>-induced Alzheimer's disease, *Biomed Pharmacother* 93 (2017 Sep) 837-851, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.038>.
- [92] C.S. Martinez, C.D.C. Alterman, F.M. Peçanha, D.V. Vassallo, P.B. Mello-Carpes, M. Miguel, G.A. Wiggers, Aluminum exposure at human dietary levels for 60 days reaches a threshold sufficient to promote memory impairment in rats, *Neurotox. Res.* 31 (2017) 20-30, <http://dx.doi.org/10.1007/s12640-016-9656-y>.
- [93] R.K. Gherardi, H. Eidi, G. Crépeaux, F.J. Authier, J. Cadusseau, Biopersistence and brain translocation of aluminum adjuvants of vaccines, *Front. Neurol.* 6 (2015), <http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2015.00004>.
- [94] C.A. Shaw, Y. Li, L. Tomljenovic, Administration of aluminium to neonatal mice in vaccine-relevant amounts is associated with adverse long term neurological outcomes, *J. Inorg. Biochem.* 128 (2013) 237-244, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.07.022>.