

REACCIONES LOCALES GRANULOMATOSAS PERSISTENTES OCASIONADAS POR ADYUVANTES ALUMÍNICOS EN OVINO: ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO Y ULTRAESTRUCTURAL

Asín¹ J., Molín J., Lacasta D., Gimeno M., Pinczowski P., Pérez M., Crespo H., Muniesa A.,
Fernández A., de Blas I., de Pablo L., Navascués N., de Andrés D., Reina R., Luján L.

¹Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. Miguel Servet, 177. 50013.

Zaragoza. jasinros@unizar.es

INTRODUCCIÓN

Los adyuvantes vacunales a base de sales de aluminio son los más usados en ganado ovino y otras especies animales. Su utilización permite al sistema inmune establecer una respuesta rápida y eficaz frente al antígeno vacunal (Lindblad, 2004). A nivel local, su uso está asociado a reacciones transitorias en forma de nódulo (HogenEsch, 2013) que, generalmente, se monitorizan *in vivo* por unos pocos meses mediante la valoración de su severidad. El presente estudio pretende valorar la evolución de estas reacciones a largo plazo, estudiar su morfología *post mortem* y establecer el papel del aluminio en su génesis; así como definir su posible rol en episodios de reacciones adversas a vacunas con adyuvantes alumínicos, como los ocurridos durante las campañas de vacunación frente a la Lengua Azul entre 2008 y 2010 (González et al., 2010; Luján et al., 2013) actualmente adscritos al Síndrome Autoinmune/inflamatorio Asociado a Adyuvantes (ASIA syndrome) (Shoenfeld y Agmon-Levin, 2011; Luján et al., 2013).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron un total de 84 corderos, machos castrados, de 3 meses de edad que se distribuyeron en 3 grupos de 28 animales cada uno. Cada grupo siguió un protocolo de inoculación intensivo mediante la aplicación de distintos productos por vía subcutánea. El Grupo A recibió inyecciones de vacunas comerciales ovinas con hidróxido de aluminio como adyuvante. El Grupo B fue inoculado solo con el adyuvante, siempre con la misma concentración de aluminio que la vacuna usada en el Grupo A. El Grupo C fue inyectado con PBS. Cada grupo recibió un total de 19 inoculaciones del producto respectivo, 16 en el lado derecho de la espalda y 3 en el izquierdo, siempre en puntos distintos. Los protocolos de aplicación indicados por el fabricante de cada vacuna fueron respetados. Los animales fueron sacrificados tras 15 meses. Solo los datos recogidos de las inoculaciones del lado derecho han sido considerados para su análisis. Las reacciones se monitorizaron periódicamente *in vivo* mediante palpación. Tras el sacrificio, se llevaron a cabo distintos estudios en los puntos de inoculación y el linfonodo preescapular derecho: i) Estudio anatomopatológico macro y microscópico: Presencia y número de nódulos en el punto de inoculación, forma, caracterización del componente celular, presencia de necrosis y/o mineralización y estatus de reactividad del linfonodo regional; ii) Microbiología; iii) Microscopía Electrónica para caracterización morfológica de las partículas de aluminio; iv) Espectroscopia de rayos X (EDX) para identificación del aluminio. Se realizó un estudio estadístico de los distintos caracteres mediante el programa IBM SPSS Statistics para Windows, versión 19 (IBM Corp., Armonk, NY., USA). El protocolo experimental fue aprobado por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal (ref: P115/14).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

In vivo, los animales de los grupos vacunados e inoculados con adyuvante presentaron reacciones en el punto de inoculación en forma de nódulo subcutáneo. La severidad fue siempre mayor ($p < 0,001$) en los animales vacunados que en los inoculados con aluminio. En ambos grupos las valoraciones mostraban más severidad cuando la inyección anterior se había realizado con concentraciones altas de aluminio. *Post mortem*, el 100 % de los animales vacunados presentaron nódulos subcutáneos en el pániculo adiposo del área de inoculación (Fig. 1) mientras que solo el 84,6 % de los inoculados con aluminio lo hicieron. Estos nódulos fueron más numerosos ($p < 0,001$) en el grupo vacunado, presentando un 76,9% de ellos más de 7 nódulos. Algunos animales vacunados llegaron a presentar hasta 15-16 nódulos. El análisis microbiológico descartó cualquier tipo de contaminación bacteriana. A nivel macroscópico, los nódulos de los animales inoculados con vacunas eran redondeados mientras que en el caso de los inoculados con adyuvante eran más aplanados.

Microscópicamente, estas reacciones tisulares fueron clasificadas como granulomas que estaban compuestos mayoritariamente por macrófagos reactivos, en ocasiones formando células gigantes multinucleadas y observándose también neutrófilos dispersos. El centro del granuloma se presentaba necrótico y con mineralización distrófica. En la periferia de los granulomas aparecían grupos de linfocitos que de forma muy ocasional formaban tejido linfoide terciario. El tamaño del granuloma, la necrosis y la mineralización presentaban mayor frecuencia y severidad patológica en los animales vacunados. En todos los casos se observaron numerosos vasos con activación endotelial en el interior de los granulomas. Habitualmente se observaba una cápsula fibrosa alrededor de los nódulos de ambos grupos, además de cierta fibrosis interna, esta última con una frecuencia algo superior en los granulomas procedentes del grupo de inoculados con adyuvante. En el caso de los linfonodos, tanto los animales inoculados con adyuvante como los vacunados mostraron características de activación como hiperplasia cortical con mayor frecuencia y severidad que los controles. Además, ambos grupos presentaron -en sus linfonodos regionales- agregados de macrófagos voluminosos con citoplasma basofílico espumoso a espiculado con mucha más frecuencia que los controles. A nivel ultraestructural, el estudio de microscopía electrónica llevado a cabo en los granulomas reveló agregados intracitoplasmáticos de partículas espiculadas en los macrófagos. Estos agregados fueron identificados como aluminio mediante EDX (Fig. 2). La longitud de las partículas era mayor en el caso de los granulomas vacunales ($p < 0,001$), mientras que el área de los agregados era similar en ambos grupos ($p = 0,637$).

Las reacciones subcutáneas inducidas por la inyección de sales de aluminio corresponden a granulomas inmunomediados estériles y altamente persistentes. Tanto los estudios clínicos *in vivo* como los llevados a cabo tras el sacrificio revelaron mayor severidad y persistencia en los granulomas de los animales inoculados con vacunas. Los estudios *in vivo* no muestran la severidad y número de nódulos con exactitud. Es necesaria una disección *post mortem* cuidadosa del panículo adiposo subcutáneo para recuperar todos los granulomas. Características histológicas como la mayor presencia de necrosis o de mineralización indican un mayor grado lesional a nivel microscópico en los animales vacunados. La presencia de otros componentes en las vacunas además del adyuvante podría explicar estas diferencias entre los dos grupos. A nivel ultraestructural, el mayor tamaño de las partículas de aluminio observado en los vacunados podría deberse a la asociación de éstas con el antígeno (Shardlow et al., 2017). El mayor tamaño de partícula podría inducir un mayor daño celular en las células fagocíticas (Mold et al., 2016), llegando a ser irreversible por las altas concentraciones intracitoplasmáticas de aluminio. Este nivel de daño celular superior es compatible con las características tisulares macro y microscópicas observadas en los animales vacunados, así como con el incremento de la persistencia.

La presencia de granulomas subcutáneos persistentes podría estar relacionada con algunos de los efectos adversos sistémicos observados a largo plazo tras el uso de vacunas con adyuvante aluminico en ovino (González et al., 2008; Luján et al., 2013). Se trata de focos con altas concentraciones de metal que pueden inducir la translocación de éste a otros tejidos (Khan et al., 2013). Este tipo de patogenia ha sido demostrada en el caso de la miofascitis macrofágica (MMF) en medicina humana (Gherardi et al., 2001), en la cual grupos de macrófagos con aluminio intracitoplasmático persisten en el punto de inyección originando síntomas neuromusculares a largo plazo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Lindblad E.B. Vaccine. 2004; 22:3658-68. • HogenEsch H. Front Immunol. 2013; 3:406. • González J.M. et al. Vet Rec. 2010; 166:757-8. • Luján L et al. Immunol Res. 2013; 56:317-24. • Shoenfeld Y. & Agmon-Levin N. J Autoimmun. 2011; 36:4-8. • Shardlow E. et al. Front Chem. 2017; 4:48. • Mold M. et al. Sci Rep. 2016; 6:31578. • Khan Z. et al. BMC Med. 2013; 11:99. • Gherardi R.K. et al. Brain. 2001; 124:1821-31.

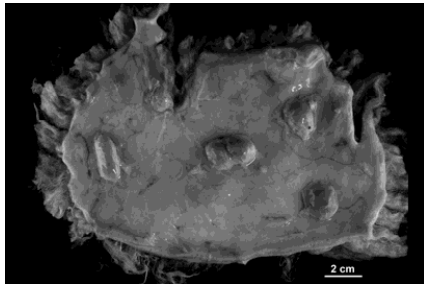


Fig. 1

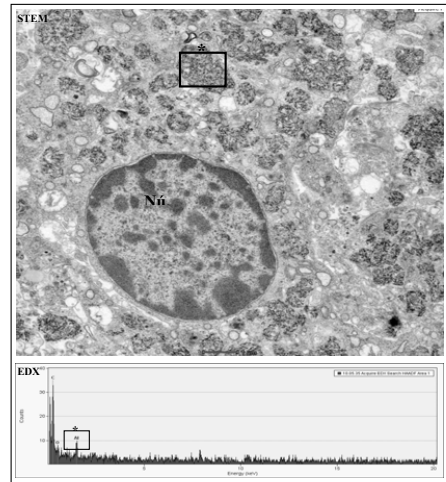


Fig. 2

Figura 1. Presencia de múltiples granulomas vacunales en el tejido subcutáneo de un animal vacunado (la grasa ha sido retirada).

Figura 2. Microscopía electrónica (STEM) de un macrófago de un animal vacunado con agregados intracitoplasmáticos de un material espiculado electrodenso identificado como aluminio mediante EDX. Nú.:Núcleo.

PERSISTENT LOCAL REACTIONS CAUSED BY ALUMINIUM ADJUVANTS IN SHEEP: PATHOLOGIC AND ULTRASTRUCTURAL STUDIES

The use of aluminium-based adjuvants is very important in sheep and other animal species. They are related to transient local reactions which are thought to disappear in a few months. The present work aims to study the long-term evolution of these reactions and to fully characterize them by different methods, including gross and microscopical pathology, microbiology, Scanning Transmission Electron Microscopy (STEM) and Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX) in order to establish the role of the aluminium in its genesis. A total of 84 neutered, 3 month old lambs were used. They were divided into 3 groups (n=28 each). Each group was repetitively inoculated with a different substance: Group A) Commercial vaccines against main ovine diseases containing aluminium adjuvant; Group B) The adjuvant alone at the same concentration of aluminium as the vaccine used; Group C) PBS. Local reactions consisted in subcutaneous foreign body sterile granulomas which showed more severity in the vaccinated group. They were composed mainly by macrophages with intracytoplasmic aggregates of a needle-shaped material observed by STEM and identified as aluminium by EDX. They were highly persistent. The persistency of aluminium containing nodules and the chronic and constant immune stimulation they produce could be related with some adverse systemic effects occasionally associated with the use of aluminium-adjuvant containing vaccines as it has previously described in the ovine ASIA syndrome.

Keywords: Adjuvants, aluminium, granulomas, ASIA syndrome