



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Estudio de la reacción tisular del sistema nervioso en el
síndrome ASIA ovino

Ovine ASIA syndrome: study of the tisular reaction in the
nervous system

Autor

Ana Rodríguez Largo

Directores

Lluís Luján Lerma

Javier Asín Ros

Facultad de Veterinaria

Curso 2017-2018

Índice

1. Resumen	2
2. Introducción	3
2.1 Vacunas: uso y evolución	3
2.2 Adyuvantes vacunales.....	4
2.2.1 Adyuvantes: uso y evolución.....	4
2.2.2 Mecanismo de acción de los adyuvantes.....	5
2.2.3 Adyuvantes vacunales utilizados en veterinaria	7
2.2.4 El aluminio como adyuvante vacunal.....	8
2.3 Reacciones adversas asociadas al uso de vacunas y adyuvantes.....	9
2.3.1 Tipos de reacciones adversas.....	9
2.3.2 Reacciones adversas asociadas a los adyuvantes de aluminio	10
2.4 Síndrome ASIA.....	12
2.4.1 Síndrome ASIA en la especie humana.....	12
2.4.2 Síndrome ASIA en la especie ovina	14
2.5 Estudio de la reacción tisular del sistema nervioso	16
2.5.1 Los astrocitos y la GFAP (<i>glial fibrillary acidic protein</i>).....	16
2.5.2 El estudio de la GFAP en el síndrome ASIA	16
2.5.3 Técnicas de marcado y recuento celular.....	17
3. Justificación y objetivos	18
4. Metodología	19
4.1 Obtención de las muestras.....	19
4.2 Estudio de la GFAP <i>in situ</i>	20
4.3 Captura de imágenes.....	21
4.4 Análisis de imagen.....	21
4.5 Análisis estadístico	22
5. Resultados y discusión	23
6. Conclusiones	26
7. Valoración personal	27
8. Bibliografía	27
Anexos	33

1. Resumen: “Estudio de la reacción tisular del sistema nervioso en el síndrome ASIA ovino”

Las vacunas son una herramienta eficaz frente a numerosas enfermedades infecciosas, sin embargo, se han descrito diversos efectos adversos inherentes a su uso; entre ellos, destaca el denominado síndrome autoinmune/inflamatorio inducido por adyuvantes (síndrome ASIA). Este trabajo tiene como objetivo el estudio de la reacción tisular en el sistema nervioso central asociado a la inoculación repetitiva del hidróxido de aluminio (HdA) empleado como adyuvante en las vacunas ovinas. Para ello, se utilizaron muestras de la médula espinal lumbar de 21 corderos procedentes de un estudio anterior. Los animales fueron divididos en 3 grupos de 7 animales cada uno: i) Adyuvante: inoculados sólo con HdA, ii) Vacuna: inoculados con vacunas comerciales, y iii) Control: inoculados con PBS. Se realizó una técnica inmunohistoquímica sobre la médula espinal lumbar para poner de manifiesto la conocida como proteína GFAP (*glial fibrillary acidic protein*). Mediante un *software* de análisis de imagen se obtuvo un recuento objetivo de las estructuras inmunoteñidas. El grupo Adyuvante mostró una expresión de la GFAP significativamente mayor ($P=0,047$) que el grupo Control. No se observó ninguna otra diferencia significativa en el marcaje de esta proteína entre el resto de grupos. Este trabajo demuestra como el aluminio utilizado como adyuvante vacunal podría estar directamente relacionado con la activación de los astrocitos en el sistema nervioso central. Esto podría explicar, al menos parcialmente, algunos de los signos observados en el síndrome ASIA ovino.

Abstract: “Ovine ASIA syndrome: study of the tisular reaction in the nervous system”

Vaccines are an effective tool to face many infectious diseases, nevertheless, several adverse effects inherent to its use have been described; among them, it is interesting to note the so-called autoimmunity/inflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA). The aim of this work is the study of the tissue reaction in the central nervous system associated to the repetitive inoculation of aluminum hydroxide (AH) contained in ovine vaccines. The lumbar spinal cord samples of 21 lambs from a previous study were used. The animals were divided into 3 groups of 7 individuals each: i) Adjuvanted: received AH; ii) Vaccine: received comercial vaccines, and iii) Control: received PBS. Lumbar spinal cord was examined using immunochemistry to label GFAP protein (*glial fibrillary acidic protein*). An objective count of the immunostained structures was obtained using an image analysis software. Adjuvanted group showed a significantly higher GFAP expression ($P= 0,047$) compared with Control group. There was no significant difference in GFAP labelling between all other groups. This work shows how the aluminum used as vaccine adjuvant could be directly related to astrocytes activation in the central nervous system. This link could explain, at least partially, some of the signs observed in the ovine ASIA syndrome.

Abreviaturas

Al: Aluminio
Síndrome ASIA: síndrome autoinmune/inflamatorio inducido por adyuvantes
GFAP: <i>glial fibrillary acidic protein</i>
HdA: hidróxido de aluminio
IHQ: inmunohistoquímica
LN: linfonodo
SI: sistema inmune
SN: sistema nervioso
SNC: sistema nervioso central

2. Introducción

2.1 Vacunas: uso y evolución

La vacunación es uno de los hitos dentro de la medicina animal y humana. El uso de las vacunas ha demostrado ser una de las formas más eficaces y rentables para la prevención y el control de diversas enfermedades infecciosas y, en algún caso como el de la viruela humana, incluso ha facilitado su erradicación (Lee y Nguyen, 2015; Minor, 2015). En 1796 Edward Jenner desarrolló la primera vacuna frente a la viruela humana partiendo de las sospechas que sostenían que las mujeres que contraían la viruela bovina por contacto con vacas afectadas (enfermedad causada por un *cowpox*) quedaban protegidas de forma natural frente a la forma humana (causada por un *smallpox*). Jenner inoculó en un individuo sano el contenido de las aftas de una persona afectada por la viruela de las vacas; el individuo inoculado padeció una infección leve y, de forma paralela, su sistema inmune (SI) indujo una reacción de protección cruzada frente a la viruela humana. Este avance médico sirvió para acuñar el término vacuna y para asentar las bases del uso de las vacunas vivas atenuadas (Riedel, 2005).

La vacunación frente a agentes infecciosos tiene como objetivo fundamental la inducción de una respuesta inmune humoral y celular capaz de actuar de forma efectiva, duradera y específica frente a un patógeno (Schijns, 2016). Para alcanzar esta meta, el uso y la formulación de las vacunas han sufrido diversas modificaciones con el paso del tiempo. Inicialmente, se emplearon vacunas compuestas por microorganismos vivos atenuados, capaces de replicarse *in situ* en el hospedador y de conferir una inmunidad duradera, similar a la desarrollada por los individuos que superan la infección de forma natural (Coffman *et al.*, 2010). Posteriormente, se desarrollaron vacunas constituidas por el microorganismo completo e inactivado. Pese a que estos dos tipos de vacunas continúan utilizándose en el siglo XXI, algunas de ellas han sido responsables de problemas de seguridad debido a la reactivación del agente infeccioso contenido en ellas (Warren-Gash *et al.*, 2017). Las nuevas tecnologías han permitido

diseñar otros tipos de vacunas compuestas por ejemplo por antígenos purificados, las denominadas vacunas de subunidades (Zepp, 2010). El futuro de la vacunología debe encaminarse hacia la investigación y el desarrollo de nuevas vacunas no sólo seguras, sino también eficaces frente a los que se plantean como los dos principales desafíos en este campo. El primero está relacionado con el SI de la población a la que se destina la vacuna (personas con una capacidad de inmunorrespuesta disminuida debido a enfermedades inmunosupresoras o asociadas a la edad, individuos prematuros o muy jóvenes sin un desarrollo completo del SI y ancianos en los que se habla de inmunosenescencia). El otro, se asocia con los agentes infecciosos frente a los que se elabora la vacuna (la emergencia o reemergencia de algunos patógenos o los denominados “patógenos complejos”, conocidos así porque sus mecanismos de evasión de la respuesta inmune hacen difícil el desarrollo de una vacuna eficaz frente a ellos. Dos de esos agentes son: los protozoos del género *Plasmodium* responsables de la malaria y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) causante del SIDA) (Leroux-Roels, 2010).

2.2 Adyuvantes vacunales

2.2.1 Adyuvantes: uso y evolución

La palabra adyuvante deriva del latín (*adjuvare*) y se refiere a aquello que “ayuda o refuerza”. Dentro de la vacunología este término se emplea para englobar componentes que difieren en su composición y en su estructura química, pero que persiguen un mismo objetivo, mejorar la inmunogenicidad frente al antígeno contenido en las vacunas (O’Hagan y Fox, 2015). Las vacunas inactivadas, especialmente las de subunidades, son más específicas y seguras que las vacunas atenuadas, pero menos inmunógenas, y en consecuencia, requieren de los adyuvantes para incrementar la potencia, la calidad y la duración de la respuesta inmune (Coffman *et al.*, 2010; Tkachuk *et al.*, 2017).

Los adyuvantes se han convertido en un componente fundamental de las vacunas por varias razones: i) aumentan la respuesta inmune inducida por el antígeno vacunal, lo que cobra una especial relevancia en personas con una capacidad de inmunorrespuesta disminuida; ii) reducen el número de revacunaciones necesarias para alcanzar el grado de inmunización que garantiza la protección frente a una reinfección, y iii) permiten el uso de menores cantidades de antígeno, lo que podría ser de gran ayuda ante un brote pandémico donde la vacunación se convierte en una medida urgente y la producción vacunal se ve limitada. En esta situación sería útil poder aumentar la velocidad de la respuesta inicial, pero este efecto no es capaz de desencadenarlo un antígeno por sí solo, por ello, se están investigando y desarrollando nuevos

adyuvantes que puedan dirigir la respuesta inmune (Batista-Duarte *et al.*, 2014; Coffman *et al.*, 2010).

En las últimas décadas, el diseño y el uso de los adyuvantes han experimentado cambios que han propiciado que algunos autores diferencien entre dos generaciones de adyuvantes (O'Hagan y Fox, 2015). La primera generación nació en 1926, cuando el veterinario Gaston Ramon inyectó junto a la toxina diftérica inactivada (anatoxina) distintas sustancias como agar, tapioca, lecitina, etc. y observó que la reacción inflamatoria generada por estas sustancias en el punto de inoculación aumentaba la producción de anticuerpos (Di Pasquale *et al.*, 2015). Algunos de los adyuvantes más utilizados en la actualidad, como las sales de aluminio o las emulsiones, pertenecen a esta primera generación caracterizada por haber demostrado su efecto inmunopotenciador de forma empírica (O'Hagan y Fox, 2015). A día de hoy, la seguridad se ha convertido en uno de los pilares fundamentales de la vacunación, por ello, se está desarrollando una segunda generación de adyuvantes basada en el uso de potenciadores inmunológicos sintéticos, tales como los agonistas de los *Toll-like receptors* (TLRs) o las saponinas (O'Hagan y Fox, 2015). En los últimos años se ha propuesto el uso de distintas sustancias inmunoestimulantes, sin embargo, debido a la creciente preocupación por la seguridad vacunal pocos han llegado a ser registrados (Bastola *et al.*, 2017). Dos ejemplos de adyuvantes recientemente patentados en Europa son las emulsiones de aceite en agua MF59 o AS03 en vacunas frente al virus *influenza* para la especie humana (Mbow *et al.*, 2010).

2.2.2 Mecanismo de acción de los adyuvantes

Los adyuvantes llevan décadas siendo utilizados en las vacunas, no obstante, los mecanismos a través de los que estimulan la respuesta inmune aún no se comprenden en su totalidad. Cada tipo de adyuvante tiene sus propios mecanismos de acción y es frecuente que un mismo adyuvante actúe combinando varios de esos mecanismos (Awate *et al.*, 2013). Estas sustancias se han clasificado dependiendo del mecanismo de acción predominante en tres tipos: inmunopotenciadores, sistemas de depósito y liberación (O'Hagan y Valiante, 2003) e inmunopolarizantes (Pérez *et al.*, 2007). Hasta la fecha, se han descrito tres vías de estimulación del SI:

Estimulación de la señal 1: algunos adyuvantes generan un “efecto depósito” que supone una liberación lenta y prolongada del antígeno que garantiza el reclutamiento de las células presentadoras de antígenos (*Antigen Presenting Cells*, APCs) en el punto de inoculación. El resultado es una estimulación inmune continua (Awate *et al.*, 2013). La activación del SI adaptativo requiere que el antígeno vacunal inoculado, intramuscular o subcutáneo, llegue

hasta los linfonodos (LN) regionales (Schijns, 2016). En ese transporte son claves las APCs, células del SI innato entre las que destacan las células dendríticas y los macrófagos. Estas células fagocitan a los antígenos y adyuvantes inoculados, se activan y migran hasta los LN donde convierten a los antígenos en péptidos de menor tamaño para presentárselos a los linfocitos T a través de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) expresadas en su superficie. De este modo, estimulan células plasmáticas que inician la síntesis de anticuerpos específicos (Schijns, 2016). Los adyuvantes en los que predomina esta señal se denominan agentes de liberación y depósito, algunos de ellos son las sales minerales, emulsiones o micropartículas (O'Hagan y Valiante, 2003).

Estimulación de la señal 2: los adyuvantes en los que prevalece esta señal de activación de la respuesta inmune se conocen como inmunopotenciadores (O'Hagan y Valiante, 2003). La estimulación de esta señal puede efectuarse a través de dos vías:

a) Mediante el “reconocimiento de lo no propio” o “señal 0”: la activación del SI innato se produce a través del reconocimiento de estructuras moleculares específicas de algunos agentes patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) (Janeway y Medzhitov, 2002). Los PAMPs se unen y activan receptores de reconocimiento de patrones moleculares (*pathogen-recognition receptors*, PRRs) expresados por las células del SI innato. Un ejemplo de PRR son los TLR (*Toll-like receptors*) presentes en la membrana de APCs (Bastola *et al.*, 2017). La activación del SI innato promueve la expresión de moléculas coestimuladoras en la superficie de las células inmunitarias y la liberación de citoquinas proinflamatorias implicadas en la diferenciación de las células T (Schijns, 2016). Un tipo de adyuvante que estimula esta señal son los agonistas de los TLR, entre ellos se encuentran componentes de bacterias Gram negativas como lipopolisacáridos (LPS) y su derivado el monofosforil lípido A (MPLA) o la flagelina (Batista-Duarte *et al.*, 2014).

b) Otra vía de activación es a través del “reconocimiento de lo propio escondido” que se desencadena cuando en un tejido dañado las células necrosadas liberan moléculas intracelulares como pueden ser ácidos nucleicos, ácido úrico o proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*, HSP) al medio extracelular (Schijns, 2016). Esas moléculas presentan estructuras que reciben el nombre de DAMPs (del acrónimo en inglés *damage-associated molecular patterns*), al igual que los PAMPs, son reconocidas por el SI innato a través de los PRR, promoviendo la maduración de las células dendríticas e induciendo la liberación de citoquinas y otros mediadores de la respuesta inmune (Awate *et al.*, 2013). Este mecanismo de acción es empleado por adyuvantes que generan un efecto citotóxico como el hidróxido de aluminio (HdA), las saponinas y algunas emulsiones (Batista-Duarte *et al.*, 2014).

Estimulación de la señal 3: las APCs activadas son capaces de activar a los linfocitos T *helper* inactivados (Th0) y dirigir (“polarizar”) la respuesta inmune adaptativa. En función de la vía de inoculación, del tipo de antígeno, del tipo de adyuvante vacunal y de las citoquinas liberadas, los linfocitos T activados experimentan una expansión clonal y se diferencian en linfocitos Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 o Treg (linfocitos T *regulatory*). Esa diferenciación determina el tipo de respuesta inmune inducida (Schijns, 2016). La polarización de la respuesta inmune hacia un patrón u otro está muy condicionada por el tipo de adyuvante, por ejemplo, el monofosforil lípido A (MPLA) desencadena una respuesta de tipo Th1 mediada por células T efectoras específicas de antígeno (linfocitos T citotóxicos y células *natural killer*). Mientras que el HdA induce una respuesta de tipo Th2 basada en la síntesis de anticuerpos específicos (Bastola *et al.*, 2017). Los adyuvantes en los que predomina esta vía de estimulación se denominan inmunopolarizantes y un ejemplo son los proteoliposomas (Pérez *et al.*, 2007).

El desconocimiento de estos mecanismos hace que a menudo sea impredecible determinar el inicio, la magnitud, la vía de activación del SI y la duración de la respuesta inducida por la combinación antígeno-adyuvante (Schijns, 2016). Las investigaciones que se están llevando a cabo en la actualidad tienen como objetivo promover el diseño racional de nuevos adyuvantes, capaces de estimular el SI de forma eficaz a través de mecanismos bien definidos y reproducibles, además de garantizar la seguridad de las vacunas que los contienen (O’Hagan y Fox, 2015).

2.2.3 Adyuvantes vacunales utilizados en veterinaria

El establecimiento de programas de vacunación es un procedimiento habitual en pequeños rumiantes y otras especies animales. Los criterios que fundamentan el uso de las vacunas difieren según la población de destino. En los animales de compañía, los criterios son similares a los utilizados en la especie humana, y se basan en la mejora de la salud y el bienestar del animal. En los animales de producción, la vacunación no sólo busca la mejora de la salud, sino también aumentar la productividad y reducir/eliminar los riesgos de contraer enfermedades zoonóticas por parte de los consumidores (Meeusen *et al.*, 2007).

La mayor parte de los adyuvantes registrados en vacunas para animales y seres humanos derivan de aceites (ej: escualeno y emulsiones) y de sales minerales (ej: sales de aluminio y fosfato cálcico) (Ruiz *et al.*, 2017). La investigación y el desarrollo de vacunas para especies animales cuentan con menores inversiones económicas y con estudios preclínicos de seguridad vacunal menos exhaustivos y exigentes que en la especie humana. Como resultado, el número de adyuvantes registrados en veterinaria es mayor que en la medicina humana. Compuestos

como la saponina Quil-A o algunas emulsiones a base de aceites minerales están prohibidas en las vacunas destinadas a los seres humanos debido a problemas de seguridad (Burakova *et al.*, 2018). La incorporación de nuevos adyuvantes en la formulación de una vacuna debe optimizar su efectividad y minimizar su toxicidad (Petrovsky y Aguilar, 2004).

2.2.4 El aluminio como adyuvante vacunal

En 1926 Alexander Glenny y otros investigadores demostraron por primera vez el efecto inmunoestimulante del aluminio (Al). Constataron que la inoculación en cobayas de toxoides diftéricos precipitados con una sal de aluminio (alumbre de potasio) inducía una respuesta inmune mucho mayor que el toxoide por sí solo (Glenny *et al.*, 1926). Noventa años después, los mecanismos de acción de los adyuvantes de Al siguen sin conocerse con exactitud (Crépeaux *et al.*, 2017). Algunos estudios evidencian que el tipo de respuesta inducida por un mismo adyuvante puede variar en función de la especie a la que se le administra. En ratones se ha comprobado que el Al utilizado como adyuvante dirige la respuesta inmune hacia el tipo Th2, mientras que en la especie humana induce un mix entre el tipo Th1 y Th2 (Coffman *et al.*, 2010). En el ser humano, este elemento induce una pobre respuesta inmune celular (tipo Th1) basada en la activación de linfocitos T citotóxicos y células NK (del inglés, *natural killer*) (Pellegrino *et al.*, 2015). Por el contrario, desencadena una fuerte respuesta inmune humoral (tipo Th2) que promueve el aumento de la producción de anticuerpos específicos IgG e IgE y a la activación de eosinófilos (Grun y Maurer, 1989). El predominio de este tipo de respuesta convierte a las vacunas con adyuvantes a base de Al en una herramienta eficaz contra patógenos extracelulares, exotoxinas bacterianas y parásitos helmintos, pero resultan poco inmunógenas frente a agentes intracelulares como virus, micobacterias y algunos protozoos (HogenEsch, 2002).

Los adyuvantes de Al son los más utilizados tanto en la veterinaria como en la medicina humana debido a su eficacia como agentes inmunoestimulantes y su bajo coste económico (Burakova *et al.*, 2018). Actualmente, las vacunas pueden contener dos tipos de adyuvantes a base de Al: cristales de hidróxido de aluminio [(Al (OH)₃], es la forma más empleada] y fosfato de aluminio amorfo (Al₄(OHPO₄)₃) (Lambrecht *et al.*, 2009). Se ha demostrado que presentan diferencias en sus propiedades físico-químicas, en la forma de interaccionar con los componentes biológicos y en su potencial toxigénico (Mold *et al.*, 2016). En cuanto a las vacunas de uso clínico en los pequeños rumiantes (ovinos y caprinos), prácticamente todas contienen HdA. Algunas de esas vacunas son: bacterianas (vacunas frente a *Chlamydomypha abortus* y *Salmonella* spp), víricas (vacunas contra la lengua azul) y basadas en toxoides (vacunas clostridiales) (Asín *et al.*, 2018).

2.3 Reacciones adversas asociadas al uso de vacunas y adyuvantes

2.3.1 Tipos de reacciones adversas

En las últimas décadas, el establecimiento de programas de vacunación por parte de las autoridades sanitarias entre la población animal y humana ha supuesto todo un éxito a la hora de disminuir la morbilidad y mortalidad de distintas enfermedades infecciosas (Guimarães *et al.*, 2015). Los adyuvantes son uno de los componentes fundamentales para el desarrollo de una respuesta protectora eficaz, sin embargo, la activación del SI puede provocar reacciones adversas. El límite entre los efectos farmacológicos deseados y los inmunotóxicos generados por las vacunas adyuvantadas depende de distintos factores tales como la estructura genética del individuo, las propiedades físico-químicas del adyuvante, la dosis, la frecuencia o la vía de administración de la vacuna (Batista-Duarte *et al.*, 2018).

Las reacciones adversas asociadas a la vacunación se han clasificado en tres tipos: locales, sistémicas y alérgicas (Kroger *et al.*, 2017).

Reacciones locales: son las más leves pero las más frecuentes. El primer contacto del adyuvante con el tejido puede provocar una irritación química inmediata en el lugar de inyección. La introducción de sustancias extrañas para el SI y/o el daño tisular provocado inducen una reacción inflamatoria en el punto de inoculación caracterizada por enrojecimiento, dolor leve, edema y tumefacción (Batista-Duarte *et al.*, 2013; Goto *et al.*, 1997). Otros tipos de reacciones locales pueden aparecer meses, incluso años después de la vacunación, se asocian con la inducción de una reacción inflamatoria crónica debida a la persistencia del inóculo vacunal en el lugar de inyección (Goto *et al.*, 1997). Estas reacciones retardadas se relacionan con la formación de abscesos estériles o granulomas vacunales (Co *et al.*, 2004) y con procesos tumorogénicos. Dentro de la vacunología veterinaria, el uso de vacunas adyuvantadas a base de Al se ha vinculado con el desarrollo de sarcomas en el punto de inoculación en gatos (Graf *et al.*, 2018).

Reacciones sistémicas: generalmente son leves y transitorias. Este tipo de reacciones suelen aparecer horas después de la vacunación, se relacionan con la liberación de citoquinas proinflamatorias e incluyen signos como fiebre, fatiga, mialgia o náuseas (Batista-Duarte *et al.*, 2018). Otra reacción inmunotóxica vinculada con la vacunación es la inducción de enfermedades autoinmunes. El uso intensificado y repetitivo de las vacunas conlleva a la sobreestimulación del SI y puede favorecer la síntesis de autoanticuerpos en individuos susceptibles genéticamente (Tsumiyama *et al.*, 2009). Agmon-Levin *et al.* (2014) demostraron que la vacuna adyuvantada con Al de la hepatitis B aceleraba la producción de autoanticuerpos y el desarrollo de una enfermedad autoinmune como es el lupus eritematoso sistémico en ratones predispuestos

genéticamente. En el año 2011, las enfermedades autoinmunes/inflamatorias inducidas por el uso de adyuvantes comenzaron a englobarse dentro de un síndrome conocido como ASIA (del inglés, *Autoimmune/Inflammatory Syndrome Induced by Adjuvants*) (Shoenfeld y Agmon-Levin, 2011). Estudios posteriores establecieron una relación directa entre el aumento de la prevalencia de enfermedades autoinmunes con el uso de adyuvantes (Watad *et al.*, 2018). El desarrollo de inmunotoxicidad embrionaria es otro de los efectos adversos asociados con la inoculación de vacunas adyuvantadas durante la gestación. Se han descrito casos de abortos y efectos teratogénicos tanto en especies animales (Savini *et al.*, 2014) como en la especie humana (Batista-Duarte *et al.*, 2018).

Reacciones alérgicas: se han reportado casos de reacciones de hipersensibilidad frente a alguno de los componentes de las vacunas. Por su frecuencia de aparición cabe destacar dos tipos de reacciones alérgicas. La reacción de tipo I es desencadenada por adyuvantes como las sales de aluminio o las saponinas. El estímulo excesivo de la respuesta Th2 provoca una síntesis elevada de anticuerpos IgE y la aparición de efectos adversos tras un segundo contacto con el antígeno (Ohmori *et al.*, 2005). La hipersensibilidad de tipo IV o retardada es generada por adyuvantes como los liposomas, las emulsiones o las sales de aluminio (Batista-Duarte *et al.*, 2018). Su efecto citotóxico directo provoca el reclutamiento de neutrófilos, macrófagos y otros mediadores de la inflamación y la producción de citoquinas en el punto de inoculación que generan una reacción inflamatoria crónica. Las reacciones de hipersensibilidad retardada son fundamentales en la formación de los granulomas post-vacunales (Co *et al.*, 2004).

2.3.2 Reacciones adversas asociadas a los adyuvantes de aluminio

Las propiedades intrínsecas del Al le convierten en un potente adyuvante vacunal capaz de inducir tanto un efecto inmunoestimulante favorecedor de la respuesta inmune deseada como de provocar efectos toxigénicos indeseables. El efecto depósito del Al se asocia a su baja biodegradabilidad, su viscosidad y a un tamaño grande de partícula (Batista-Duarte *et al.*, 2018). Las propiedades citadas frustran el proceso fagocítico llevado a cabo por los macrófagos y células dendríticas atraídos hasta el punto de inoculación (Co *et al.*, 2004), consecuentemente, el Al forma agregados intracitoplasmáticos en dichas células (Asín *et al.*, 2018; Eidi *et al.*, 2015; Khan *et al.*, 2013). La persistencia del inóculo en el punto de inyección desencadena un tipo de reacción de hipersensibilidad retardada responsable de la formación de un granuloma vacunal al que le caracteriza la presencia de macrófagos cargados de Al en su interior (Gherardi *et al.*, 2001; Asín *et al.*, 2018). En la especie humana, la aparición de esta lesión post-vacunal junto con otros síntomas sistémicos como mialgia, fatiga crónica o disfunciones cognitivas, es conocida

como miofascitis macrofágica (*macrophagic myofasciitis*, MMF) (Gherardi y Authier, 2012). Esta enfermedad neuromuscular fue descrita por primera vez en Francia y se asoció con la exposición al HdA contenido en las vacunas frente al virus de la hepatitis B (Gherardi y Authier, 2003; WHO, 2012). Se ha demostrado que los granulomas en el lugar de inyección pueden persistir durante más de seis meses en ratones (Gherardi *et al.*, 2001) y en primates no humanos incluso un año (Verdier *et al.*, 2005). Otro estudio experimental realizado en la especie ovina en el que se comparaba la inoculación de vacunas con aluminio y aluminio solo, demostró la presencia de granulomas en todos los animales vacunados, alguno de ellos de larga duración (Asin *et al.*, 2018).

El Al es conocido por ser un agente neurotóxico capaz de desencadenar una respuesta inflamatoria responsable de inducir cambios degenerativos en el sistema nervioso central (SNC) (Shaw y Petrik, 2009). Estudios experimentales en ratones (Eidi *et al.*, 2015; Khan *et al.*, 2013) y en ovejas (Asín *et al.*, 2018) muestran como el Al vacunal inyectado en el músculo y en el tejido subcutáneo puede alcanzar los LN regionales a través de los macrófagos que lo contienen. Además, las partículas de Al son capaces de biodistribuirse y bioacumularse en órganos distantes, como el bazo y el hígado, o en el tejido nervioso (Eidi *et al.*, 2015; Khan *et al.*, 2013). En modelos animales se ha evidenciado la capacidad del Al inyectado en el músculo de atravesar la barrera hematoencefálica y acumularse en el cerebro de forma lenta y progresiva (Crépeaux *et al.*, 2017; Khan *et al.*, 2013). El estudio sobre el síndrome de la guerra del Golfo (*Gulf War Syndrome*, GWS) y su relación con el Al detectó la presencia de neuronas apoptóticas y la proliferación de las células de la microglia tanto en la corteza motora como en la médula espinal de los animales inoculados con HdA (Petrik *et al.*, 2007). Continuando esta línea de investigación, Shaw y Petrik (2009) identificaron en los ratones inyectados con Al una mayor activación astrocitaria en la médula espinal y la corteza motora y la presencia de partículas de Al en el citoplasma de motoneuronas de la médula lumbar. Se sospecha que la bioacumulación del Al en el SNC altera la funcionalidad de los astrocitos hasta inducir su apoptosis (Shaw y Petrik, 2009), pudiendo ser esta la causa del desarrollo de desórdenes de carácter cognitivo y memorístico descritos en seres humanos que padecen alguna de las enfermedades descritas dentro del síndrome ASIA (Passeri *et al.*, 2011) y reproducidos experimentalmente en algunas especies animales. En ratones inoculados con Al se han observado cambios comportamentales como el aumento de los niveles de ansiedad, la disminución de conductas exploratorias (Agmon-Levin *et al.*, 2014; Crépeaux *et al.*, 2017; Shaw, Li y Tomljenovic, 2013) o la aparición de disfunciones motoras (Petrik *et al.*, 2007; Shaw y Petrik, 2009).

En la especie humana, la administración de vacunas adyuvantadas podría ser el factor desencadenante de manifestaciones clínicas musculoesqueléticas, neurológicas, comportamentales y otros síntomas inespecíficos. Esta relación causal ha sido reproducida experimentalmente en modelos animales (Ruiz *et al.*, 2017). En la especie ovina, el uso repetitivo de vacunas con adyuvantes a base de Al se ha asociado con el desarrollo de reacciones adversas muy similares a las descritas en el ser humano (Luján *et al.*, 2013).

2.4 Síndrome ASIA

2.4.1 Síndrome ASIA en la especie humana

En el año 2011, Shoenfeld y Agmon-Levin acuñaron el término ASIA para definir por primera vez un síndrome caracterizado por compartir una sintomatología similar y que suele incluir mialgias, astenia, debilidad muscular, fatiga crónica, fiebre, trastornos cognitivos y alteraciones neurológicas. El desarrollo de este cuadro clínico se vincula con la hiperestimulación del SI (sobreinmunización) debido a un estímulo adyuvante que se prolonga en el tiempo (Tsumiyama *et al.*, 2009). Ese estímulo puede ser generado por diversos agentes entre los que destacan, aceites minerales utilizados en productos cosméticos (Vera-Lastra *et al.*, 2012), el Al empleado como adyuvante vacunal y la silicona, un polímero sintético usado con fines médicos y estéticos para la fabricación de válvulas cardíacas, lentes intraoculares, prótesis de mama, de rodilla, etc. (Perricone *et al.*, 2013).

Dentro de este síndrome se han englobado cinco entidades clínicas: siliconosis, miofascitis macrofágica (MMF), síndrome de la Guerra del Golfo (GWS), los fenómenos postvacunales (Shoenfeld y Agmon-Levin, 2011) y el síndrome del edificio enfermo (Sick building syndrome, SBS) (Perricone *et al.*, 2013). El diagnóstico del síndrome ASIA se realiza tras confirmar que el paciente cumple con alguno de los criterios propuestos por Shoenfeld y Agmon-Levin (2011) (Tabla 1). Según Watad *et al.* (2018) confirmar el diagnóstico supone cumplir con uno de los criterios mayores y dos de los criterios menores.

Tabla 1.

Criterios diagnósticos del síndrome ASIA en seres humanos.

Criterios mayores	Criterios menores
<ul style="list-style-type: none"> + Exposición a un estímulo externo (infección, vacuna, adyuvante) previo a las manifestaciones clínicas. + Aparición de alguna manifestación clínica “típica”: mialgia, miositis o debilidad muscular, artralgia y/o artritis, fatiga crónica, alteraciones del sueño, manifestaciones neurológicas (sobre todo asociadas con desmielinización), deterioro cognitivo o pérdida de memoria. + La eliminación del agente incitador conduce a la mejora clínica. + Biopsia típica de los tejidos afectados. 	<ul style="list-style-type: none"> + La aparición de autoanticuerpos o anticuerpos dirigidos contra el supuesto adyuvante. + Otras manifestaciones clínicas (ej. síndrome del colon irritable). + Un haplotipo HLA específico (predisposición genética). + Evolución de una enfermedad autoinmune (ej. esclerosis múltiple).

A lo largo de la vida de un individuo existen muchas probabilidades de entrar en contacto con algún tipo de adyuvante, no obstante, la aparición de este síndrome es relativamente raro (Agmon-Levin *et al.*, 2012). Los procesos autoinmunes representan un grupo de enfermedades caracterizados por desarrollarse en individuos predispuestos genéticamente (Arango *et al.*, 2017), sin embargo, una genética favorable no es suficiente para padecer este tipo de alteración. La confluencia de factores inmunes, hormonales y/o ambientales son los responsables de que un individuo predispuesto genéticamente llegue a desencadenar una enfermedad autoinmune, es lo que se ha venido denominando el “Mosaico de Autoinmunidad” (Shoenfeld *et al.*, 2008).

El estudio de los factores genéticos y epigenéticos asociados a la autoinmunidad han sido fundamentales para avanzar en el conocimiento del síndrome ASIA. Algunos estudios en genética en la especie humana apuntan a que las diversas respuestas inmunes inducidas por las vacunas/infecciones en una población o en cada individuo, se deben a un polimorfismo localizado en el sistema denominado *Human leukocyte antigen* (HLA). El sistema HLA, también conocido como sistema del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), es el grupo de genes más polimórfico en los mamíferos (Arango *et al.*, 2017). En cuanto a las investigaciones sobre los factores epigenéticos, recientemente se ha descrito el término “exosoma”. Este nuevo concepto hace referencia al conjunto de factores ambientales endógenos y exógenos a los que se expone un individuo durante toda su vida y que contribuyen al desarrollo de fenómenos autoinmunes en personas predispuestas genéticamente (Bogdanos *et al.*, 2013). El exosoma se subdivide en dos tipos de desencadenantes y/o exacerbantes de la autoinmunidad, infecciosos y no infecciosos. Entre los infecciosos se incluyen: bacterias, virus, parásitos y hongos, y dentro

de los factores no infecciosos destacan: el uso de vacunas, implantes de silicona, metales pesados, el humo del tabaco, agentes de exposición ocupacional como el sílice o los pesticidas y factores climáticos como las radiaciones solares (Bogdanos *et al.*, 2013) o las bajas temperaturas (Luján *et al.*, 2013).

2.4.2 Síndrome ASIA en la especie ovina

En la medicina veterinaria, las vacunas adyuvantadas son utilizadas de forma rutinaria para hacer frente a distintos agentes patógenos. En consecuencia, se han descrito casos de sobreinmunización asociados a vacunaciones repetitivas. En la especie ovina, la campaña de vacunación contra la lengua azul hizo evidente la existencia de efectos adversos inherentes al uso de los adyuvantes vacunales (Luján *et al.*, 2013).

En la primera década del siglo XXI un brote de lengua azul causado por un serotipo del virus nunca antes identificado en Europa (serotipo 8), se extendió rápidamente por varios países. Esta enfermedad es provocada por distintos serotipos del virus de la lengua azul (género *Orbivirus*), es transmitido a través de vectores (dípteros de la especie *Culicoides imicola*) y afecta a los rumiantes (principalmente a la especie ovina) (OIE, 2013). Dado que su aparición ponía en gran riesgo al sector ganadero, la Comisión Europea decidió implantar en 2008 una campaña de vacunación masiva para reducir las pérdidas causadas por la enfermedad y tratar de frenar su diseminación (Decisión de la Comisión 2008/655/CE, 24 de julio de 2008). De forma paralela, ganaderos y veterinarios de distintos países comenzaron a reportar manifestaciones clínicas muy similares que parecían estar directamente relacionadas con el uso de vacunas inactivadas que contenían Al como adyuvante (Agence française de sécurité sanitaire, 2009; Dyer *et al.*, 2009). Las principales alteraciones observadas en los animales vacunados fueron neurológicas, reproductivas y físicas. Se describieron signos tales como bruxismo, ceguera, cambios comportamentales, alteraciones motoras, abortos, pérdidas de lana y de peso, llegando en algunos casos a mostrar una caquexia extrema a pesar de que los animales continuaban con sus niveles de ingesta habituales (o incluso presentaban polifagia) y, en última instancia, podían provocar la muerte del animal (González *et al.*, 2010). Ninguno de estos signos parecía guardar ninguna relación con problemas de manejo, alimentación o infecciosos, por lo que su aparición se asoció a un efecto de sobreinmunización causado por la gran presión vacunal ejercida durante las campañas de vacunación frente a la lengua azul en los rebaños ovinos. Finalmente, en el año 2013 Luján *et al.* describieron por primera vez un síndrome ovino asociado a la vacunación repetida con adyuvantes de Al, la hiperestimulación del SI y la influencia de diversos estresores que pasó a formar parte del síndrome ASIA.

Dentro del síndrome ASIA ovino se han descrito dos formas clínicas:

Fase aguda: aparece entre los 2-6 días post-vacunación y se caracteriza por la observación de signos neurológicos graves tales como letargia, bruxismo, convulsiones, ceguera transitoria, desorientación o cambios en el comportamiento, además de una disminución en la respuesta a estímulos externos. Dentro de un mismo rebaño afecta a menos del 1% de los animales y la tasa de mortalidad puede ser incluso menor. La mayoría de casos observados se recuperan 2-3 días después de presentar las manifestaciones clínicas. En el examen *post-mortem*, los animales afectados no muestran ningún hallazgo macroscópico relevante. A nivel histológico se observa meningoencefalitis severa aguda, compuesta por una mezcla de neutrófilos, macrófagos, eosinófilos y células plasmáticas, localizado mayoritariamente en los surcos cerebrales y en menor medida en la médula espinal. Este cambio puede estar acompañado de otros como: gliosis, muerte neuronal en encéfalo y médula espinal, coroiditis y desmielinización de la sustancia blanca.

Fase crónica: afecta a un mayor número de rebaños que la forma aguda. La fase crónica tiene una prevalencia entorno al 50-70% de los rebaños y dentro de un mismo rebaño puede afectar incluso al 100% de los animales. La dificultad diagnóstica en estos casos viene dada porque el intervalo temporal que separa el momento de la vacunación del desarrollo de los signos clínicos puede ser incluso de meses. Por lo general, esta fase es desencadenada por uno o varios estímulos/estresores externos (ej. bajas temperaturas, mala nutrición o partos fuera de la época natural). Tras ellos, al igual que ocurre en la fase aguda, se observan anormalidades en el comportamiento, aumentan las tasas de abortos (sin que llegue a ser identificado ningún agente etiológico), aparecen alteraciones motoras como ataxia o tetraplejia y por último, la muerte. Las lesiones macroscópicas más reseñables halladas durante la necropsia son: un aumento del grosor de los nervios periféricos (muy evidente en el tejido subcutáneo de la cavidad abdominal y torácica, pero también visible en otros nervios como el ciático), una depleción de los depósitos grasos y una atrofia muscular generalizada. Microscópicamente, destaca la pérdida de neuronas y la necrosis neuronal multifocal observada en la sustancia gris de la médula espinal (Luján *et al.*, 2013).

Este mismo grupo de investigación logró reproducir parcialmente el síndrome ASIA ovino mediante la inoculación repetida de vacunas que contenían AI (Asín *et al.*, 2018). Entre los resultados obtenidos cabe destacar dos de ellos: i) el estudio histopatológico reveló que la administración de vacunas con AI en el ovino induce la formación de granulomas en el punto de inoculación y que es posible detectar macrófagos cargados con AI en el LN regional, lo que sugiere una biodistribución sistémica, y ii) existe una mayor concentración de AI en el tejido

nervioso de la médula espinal del grupo de animales inoculados solo con el AI que el grupo inoculado con vacunas comerciales adyuvantadas a base de AI (Asín *et al.*, datos no publicados).

2.5 Estudio de la reacción tisular del sistema nervioso

2.5.1 Los astrocitos y la GFAP (*glial fibrillary acidic protein*)

Los astrocitos son células gliales caracterizadas por participar activamente en procesos fisiológicos y patológicos en el SNC. En condiciones normales, resultan indispensables en el desarrollo del cerebro, manteniendo la mielinización normal del SNC, modulando las señales neuronales, colaborando en la formación y regulación de la barrera hematoencefálica y manteniendo la homeostasis en el SNC. Además, intervienen en procesos de regeneración y de respuesta a cambios patológicos (Hol y Pekny, 2015; Middeldorp y Hol, 2011). Se ha demostrado que la proteína GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) está involucrada en muchas de esas funciones tanto fisiológicas como patológicas (Eng *et al.*, 2000). La GFAP es uno de los filamentos más importantes que conforman el citoesqueleto de los astrocitos en el SNC (encéfalo y médula espinal), de las células de Schwann no mielinizadas en el sistema nervioso (SN) periférico y de las células gliales en el SN entérico (Yang y Wang, 2015). Es sabido que tanto los astrocitos como la GFAP sufren cambios como consecuencia de la respuesta del SNC de los animales vertebrados superiores ante traumatismos, procesos infecciosos, inflamatorios o degenerativos. Estas alteraciones del SN provocan la activación de los astrocitos (la denominada astrogliosis) que da lugar a modificaciones en su función y su morfología. Como resultado, se produce la sobreexpresión y la acumulación de la GFAP en sus cuerpos celulares (Eng *et al.*, 2000).

2.5.2 El estudio de la GFAP en el síndrome ASIA

La detección de esta proteína ha sido utilizada como marcador astrocitario y ha servido para profundizar en el conocimiento de diversas enfermedades neurológicas como la enfermedad de Alexander, el Alzheimer o la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (Middeldorp, y Hol, 2011). En la última década, el marcado inmunohistoquímico de esta proteína ha cobrado importancia en estudios sobre el síndrome ASIA humano, un ejemplo es el síndrome de la guerra del Golfo (*Gulf War Syndrome*, GWS) (Petrik *et al.*, 2007; Shaw y Petrik, 2009).

El GWS es una condición clínica caracterizada por una serie de síntomas inespecíficos como fatiga crónica, artralgia, ataxia, alteraciones cognitivas, etc. que se describieron en algunos veteranos americanos de guerra. Su etiología se desconoce y se ha propuesto la exposición a distintas sustancias como posibles agentes causales, entre las que se incluye la vacunación

repetida contra el ántrax. Esta vacuna contenía como adyuvantes HdA y escualeno (Israeli, 2012). Entre los afectados por este síndrome se detectó un aumento significativo en el número de casos de ELA, enfermedad degenerativa que afecta a las motoneuronas del cerebro y de la médula espinal (Petrik *et al.*, 2007). Modelos experimentales en ratones han permitido establecer una relación entre el desarrollo de procesos degenerativos de las motoneuronas con los adyuvantes de AI. Para ello, se realizaron inmunohistoquímicas (IHQ) específicas frente a la proteína GFAP con el objetivo de analizar la activación astrocitaria en el sistema nervioso. Los resultados revelaron que los animales inoculados con HdA presentaban un incremento en la expresión de la GFAP en la médula espinal lumbar respecto al grupo control. Otro cambio histológico observado en el grupo que recibió el adyuvante de AI fue la identificación de neuronas apoptóticas en la médula espinal y en la corteza motora (Petrik *et al.*, 2007; Shaw y Petrik, 2009).

2.5.3 Técnicas de marcado y recuento celular

La IHQ es una técnica que permite la identificación de constituyentes tisulares *in situ* (antígenos) mediante la adición de anticuerpos que se unen a ellos de un modo específico. La unión antígeno-anticuerpo logra hacerse visible utilizando sustancias cromógenas (Ramos-Vara y Miller, 2014). En el estudio del SNC, la inmunotinción de la proteína GFAP es uno de los métodos más habituales para examinar la distribución y la respuesta de los astrocitos ante traumatismos, procesos infecciosos, inflamatorios o degenerativos (Martin y O'Callaghan, 1995). En las últimas décadas, la IHQ se ha convertido en una de las técnicas histopatológicas de rutina en la veterinaria (Brown, 2017), tanto en investigación como en su uso clínico, donde ha demostrado ser de gran utilidad en la realización de diagnósticos, la toma de decisiones terapéuticas o la emisión de pronósticos (Ramos-Vara y Miller, 2014).

La IHQ es una técnica histopatológica cualitativa que permite la visualización directa de células o estructuras marcadas de un modo específico, pero que requiere del “factor humano” para la interpretación y la evaluación de los resultados (Hamilton *et al.*, 2014). Recientemente, se ha comenzado a implantar el uso de técnicas de análisis de imagen cuantitativas de forma complementaria a las técnicas histopatológicas cualitativas (Brown, 2017). La incorporación de *softwares* de recuento automático en trabajos de investigación y en la emisión de diagnósticos permite aumentar la objetividad, precisión y reproducibilidad de los resultados (Bertram y Klopfleisch, 2017). Se prevé que en las próximas décadas el uso de estas herramientas de análisis de imagen informatizadas se generalice, ya que las ventajas que ofrecen pueden mejorar el trabajo y la toma de decisiones de investigadores y clínicos (Bertram y Klopfleisch, 2017).

3. Justificación y objetivos

La realización de este Trabajo Fin de Grado es consecuencia de la concesión de una beca de colaboración por parte del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. Este estudio se centra en el síndrome ASIA en la especie ovina ya que los programas de vacunación en animales de producción son un medio eficaz para la prevención y el control de distintos agentes patógenos en el ganado ovino, pero el número de descripciones de reacciones adversas asociadas al uso de vacunas con adyuvantes ha ido en aumento. Entre estas reacciones está el síndrome ASIA, desencadenado por la confluencia de diversos factores entre los que se encuentran los adyuvantes vacunales a base de Al.

El Al es el adyuvante más utilizado en vacunas destinadas tanto a especies animales como a la especie humana (Ruiz *et al.*, 2017). Este elemento no ha dejado de incluirse en la formulación de dichos productos desde que en 1926 se descubriera que aumentaba la respuesta inmune frente al antígeno vacunal (Glenny *et al.*, 1926). Los avances científicos han facilitado poner en el mercado nuevas vacunas frente a distintas enfermedades, mientras que los adyuvantes registrados son prácticamente los mismos que hace noventa años (O'Hagan y Fox, 2015). El desarrollo y la incorporación de nuevas vacunas en los programas de vacunación han permitido cubrir un espectro de enfermedades cada vez mayor, por otro lado, han supuesto un aumento en el número de vacunaciones sucesivas y en la cantidad de Al inoculado durante la vida de los animales en producción.

El estudio de la reacción tisular del SNC resulta interesante tras haberse demostrado que el Al es un elemento neurotóxico capaz de distribuirse desde el punto de inoculación hasta otros tejidos, como la médula espinal o el cerebro, donde puede bioacumularse y desencadenar un efecto toxigénico indeseable (Crépeaux *et al.*, 2017; Eidi *et al.*, 2015; Gherardi *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2013). Este tipo de lesiones en el SNC se han relacionado con la sobreexpresión de la proteína GFAP, un filamento específico de los astrocitos que ha sido ampliamente utilizado para identificar este tipo de células gliales mediante técnicas de marcado inmunohistoquímico (Martin y O'Callaghan, 1995; Yang y Wang, 2015). Otros trabajos relacionados con el uso de vacunas adyuvantadas a base de Al también han centrado sus estudios en la médula espinal lumbar. En ratones, la inoculación del HdA se ha asociado con la aparición de cambios degenerativos e inflamatorios en este tejido (Petrik, *et al.*, 2007). Una investigación posterior, detectó la presencia del HdA inoculado únicamente a nivel lumbar, mientras que la zona cervical y torácica no presentó ningún resto de este elemento (Shaw y Petrik, 2009).

El objetivo de este trabajo es determinar si, en ovino, existe una activación astrocitaria en el SNC tras la inoculación repetitiva de AI, ya sea como AI en solitario o como AI integrado en vacunas. La activación astrocitaria se determinará estudiando la expresión de la proteína GFAP. Para llevar a cabo este estudio, se utilizarán secciones de la médula espinal lumbar de 3 grupos de animales: i) grupo Adyuvante: inoculados sólo con HdA (Alhydrogel); ii) grupo Vacuna: inoculados con vacunas con AI como adyuvante, y iii) grupo Control: inoculados con PBS (del acrónimo en inglés: *phosphate-buffered saline*). Sobre esas muestras se realizará:

1. Un estudio inmunohistoquímico con un anticuerpo primario específico (anti-GFAP monoclonal de ratón; EMD Chemicals Inc., EEUU) para poner de manifiesto la GFAP en la sustancia gris de la médula de todos los animales.

2. Un estudio de evaluación numérica de la expresión de la GFAP. Para ello, las tinciones inmunohistoquímicas se evaluarán mediante un *software* de análisis de imagen (Nikon NIS-Elements Basic Research) que permitirá asignar valores numéricos a su expresión.

3. Un estudio estadístico para comparar entre los tres grupos los valores obtenidos mediante tests no paramétricos (Kruskall-Wallis, post hoc de Dunn).

4. Metodología

4.1 Obtención de las muestras

Las muestras del SNC que se emplearon en este trabajo fueron de médula espinal lumbar y procedían de un experimento anterior sobre el síndrome ASIA ovino (Asín *et al.*, 2018). Este estudio se realizó con 21 corderos macho, de tres meses de edad, de la raza Rasa Aragonesa, castrados y libres de las principales patologías de la especie ovina. Los animales se ubicaron en el servicio de experimentación animal de los SAI de la Universidad de Zaragoza y durante todo el experimento los animales se mantuvieron con las mismas condiciones de alojamiento, manejo y dieta (La Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza autorizó todos los procedimientos experimentales, ref. PI15 / 14).

Los animales se dividieron en 3 grupos de 7 corderos cada uno: i) grupo Adyuvante: inoculados sólo con HdA (Alhydrogel); ii) grupo Vacuna: inoculados con vacunas con AI como adyuvante, y iii) grupo Control: inoculados con PBS. Para intentar reproducir el síndrome ASIA se administró una cantidad de AI similar a la que puede recibir una oveja en condiciones de campo a lo largo de 6-7 años. Se estableció un programa de vacunación acelerado que suponía la aplicación de 19 inoculaciones subcutáneas durante un periodo de 15 meses. Las

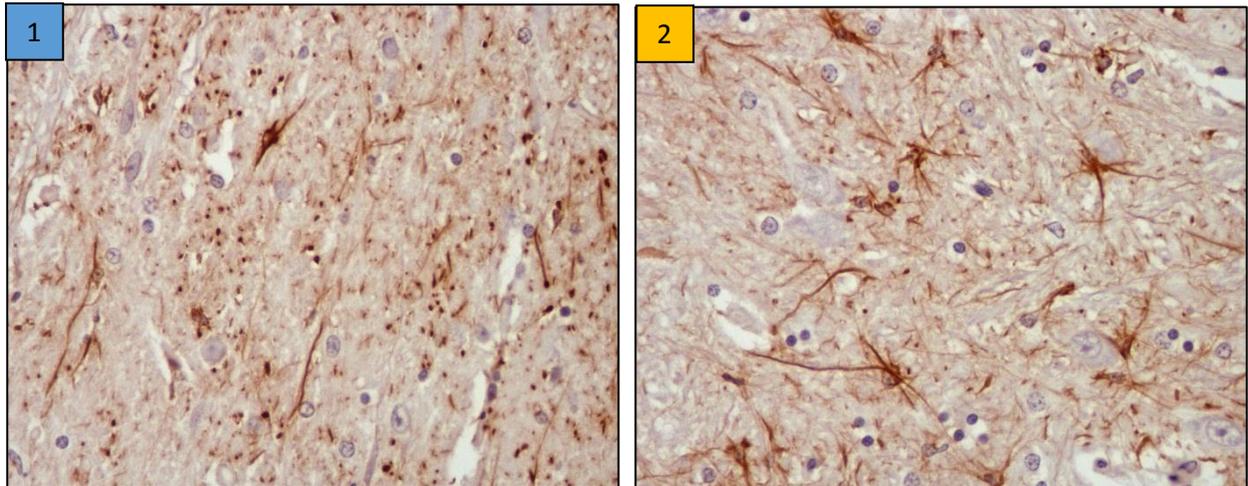
inoculaciones se realizaron en ambos flancos, en la zona comprendida entre el borde caudal de la escápula y el costillar. Se cumplieron los protocolos de aplicación y los períodos entre vacunas recomendados para cada producto. Los animales del grupo Adyuvante y Vacuna recibieron la misma cantidad de Al. El grupo Control recibió el mismo volumen de PBS que los otros dos grupos. El contenido de Al inoculado en cada cordero del grupo Adyuvante o Vacuna se cuantificó mediante espectrofotometría de emisión atómica y fue un total de 81,29 mg.

4.2 Estudio de la GFAP *in situ*

La expresión de la GFAP en la sustancia gris de las secciones de la médula espinal lumbar, previamente fijadas en parafina, se evidenció mediante la realización de una técnica IHQ indirecta (Anexo I). La inmunotinción de todas las muestras se realizó a lo largo de tres días, en cada uno de ellos fueron procesadas 7 preparaciones junto con dos controles. Para marcar de forma específica dicho neurofilamento, las muestras se desparafinaron, rehidrataron e incubaron con 100 microlitros de un anticuerpo primario frente a la GFAP (anti-GFAP monoclonal de ratón; EMD Chemicals Inc., EEUU; 1:100) durante 120 minutos en una estufa a 90°C. Se utilizó una solución de bloqueo de la biotina para evitar uniones no específicas de los anticuerpos secundarios y las muestras se incubaron 30 minutos con el anticuerpo secundario biotilado. Como tercer reactivo se usó un complejo de avidina mezclado con biotina conocido como *avidin-biotin complex* (ABC) unido a la enzima peroxidasa (VECTASTAIN ABC- Elite kit, Vector Laboratories Inc., EEUU). Finalmente, para poner de manifiesto la unión antígeno-anticuerpo se utilizó la 3,3'-diaminobencidina o DAB (Kit de substrato DAB para la peroxidasa, Vector Laboratories Inc., EEUU). El DAB es una sustancia cromógena que reacciona de forma específica con la enzima peroxidasa del complejo ABC. El marcaje se considera específico ya que la actividad peroxidasa y la biotina endógena habían sido inactivadas mediante las apropiadas soluciones de bloqueo.

4.3 Captura de imágenes

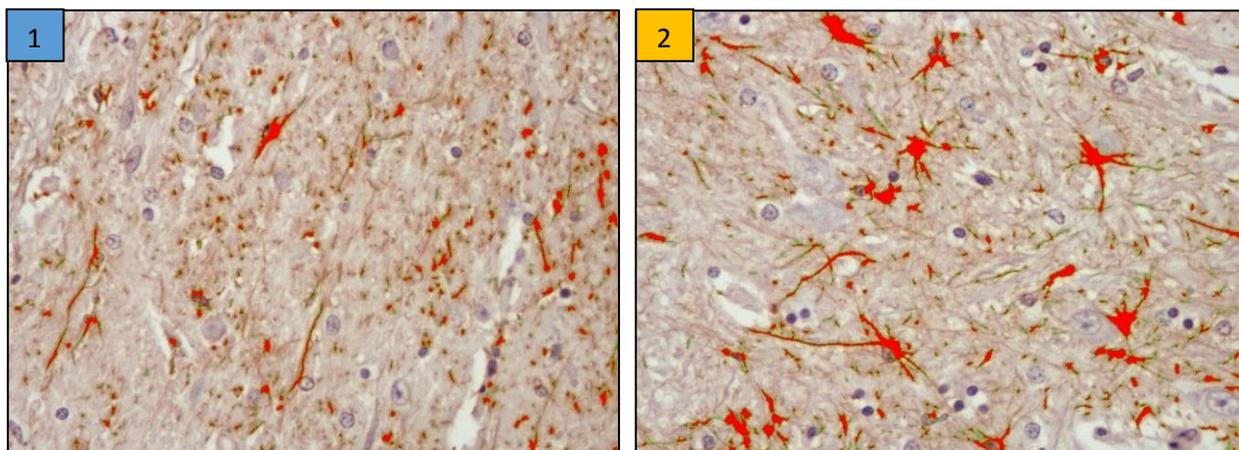
Las 21 secciones de médula espinal inmunoteñidas se estudiaron mediante microscopía óptica a cuatrocientos aumentos (x40). Se tomaron 10 imágenes de la sustancia gris de todas las secciones medulares (n= 210) siguiendo un procedimiento sistemático y ordenado: la captura de las imágenes se inició en el asta dorsal izquierda de la médula y siguiendo una dirección dorso-ventral, se fotografiaron de forma aleatoria y consecutiva 5 áreas. Seguidamente, se repetía la misma sistemática en el lado derecho (Figs. 1 y 2).



Figuras 1 y 2. GFAP marcada mediante técnica inmunohistoquímica en la médula espinal de corderos del grupo Vacuna (x40) en muestras 1 y 2.

4.4 Análisis de imagen

A cada una de las imágenes capturadas se le asignó un código numérico por una tercera persona, dicho código hacía irreconocible el animal y el grupo al que pertenecía. De esta manera, el análisis de imagen fue ciego evitándose la introducción de subjetividad en el momento de señalar con el programa de recuento informático las áreas marcadas por la IHQ. Para evaluar de forma porcentual el área marcada, o lo que es lo mismo, la expresión de la proteína GFAP, se utilizó el *software* informático de Nikon NIS-Elements Basic Research (Anexo II). La medición se realizó con el programa estableciendo un sistema de selección de áreas basado en la intensidad de color emitido por los píxeles de la imagen a analizar. En cada una de las 210 fotos se fijó un umbral mínimo y máximo de intensidad de color con el que se hacía una primera selección de las estructuras que previamente habían sido teñidas con la IHQ. A continuación, se eliminaron manualmente los cuerpos celulares de las motoneuronas que podían haber sido seleccionados por el programa y únicamente se dejaron marcados los filamentos astrocitarios que habían sido inmunoteñidos de forma específica (Figs. 3 y 4).



Figuras 3 y 4. Áreas inmunoteñidas específicamente correspondientes a las muestras 1 y 2 seleccionadas con el *software* de análisis de imagen.

Tras la selección, el programa calculaba el porcentaje de área señalada y lo exportaba a una tabla Excel (Tabla 2). Una vez obtenidos los porcentajes de cada una de las secciones medulares se procedió a descodificar las imágenes y a relacionar cada resultado con un animal y un grupo (Adyuvante, Vacuna o Control), lo que supuso obtener 10 datos de cada animal analizado (n= 70/grupo).

Tabla 2.

Ejemplos de las áreas marcadas correspondientes a las imágenes 1 y 2.

	Nº de áreas marcadas	Área total	% (área marcada)
Muestra 1	754	184512	3,37
Muestra 2	1124	184512	5,97

4.5 Análisis estadístico

Los resultados porcentuales obtenidos se analizaron con el *software* IBM SPSS Statistics 19.0 (IBM Corp., EEUU) mediante un análisis de medidas individuales (n=70/grupo). Se realizó un análisis descriptivo de los datos de la variable cuantitativa (porcentaje de GFAP medido) de los tres grupos de tratamiento: Adyuvante (A), Vacuna (V) y Control (C). El test Kolmogorov-Smirnov se utilizó para verificar que los datos (variable cuantitativa) no seguían una distribución normal ($P < 0,05$). La relación existente de la variable cuantitativa con una distribución no normal con una variable cualitativa con 3 categorías (los 3 grupos de tratamiento) se evaluó mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido por el test post-hoc de Dunn. Estas pruebas de

comparación múltiple permitieron estudiar la asociación de la variable cuantitativa con una distribución no normal entre dos categorías de la variable cualitativa (A-V, A-C y V-C), lo que en definitiva supone determinar si entre los grupos de tratamiento existe una diferencia significativa en la cantidad de GFAP expresada. El valor $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

5. Resultados y discusión

El análisis descriptivo realizado sobre los datos de la expresión de la GFAP en la médula espinal de los 3 grupos ($n=70$ /grupo) mostró que el grupo Adyuvante presentaba una media de 5,03 con una desviación típica de 2,21; la media del porcentaje de GFAP marcado en el grupo Vacuna fue de 4,27 y la desviación típica fue de 1,47, por último, el grupo de animales Control presentó una media de la cantidad de GFAP expresada de 4,21, con una desviación típica de 1,87.

Tabla 3.

Análisis descriptivo del porcentaje de GFAP marcado en cada uno de los grupos.

		Media	Mediana (M _e)	Desviación típica	Valor mínimo	Valor máximo
Grupo	Adyuvante	5,03	4,82	2,21	1,19	12,82
	Vacuna	4,27	4,18	1,47	1,54	8,34
	Control	4,21	4,09	1,87	0,99	12,21

Los animales del grupo Adyuvante [$M_e=4,82$; rango intercuartílico (IQR)=3,45-6,45] presentaron una mayor expresión de la proteína GFAP en comparación con el grupo Control [$M_e=4,09$; IQR=2,82-5,27], diferencia que resultó ser estadísticamente significativa ($P= 0,047$). La comparación entre el resto de grupos permitió apreciar algunas variaciones, pero sin llegar a mostrar ninguna diferencia estadísticamente significativa en la expresión de la GFAP. El grupo Vacuna [$M_e=4,18$; IQR=3,17-5,13] presentó una menor expresión de la GFAP respecto al grupo Adyuvante [$M_e=4,82$; rango IQR= 3,45-6,45] y ligeramente superior respecto al grupo Control [$M_e=4,09$; IQR=2,82-5,27].

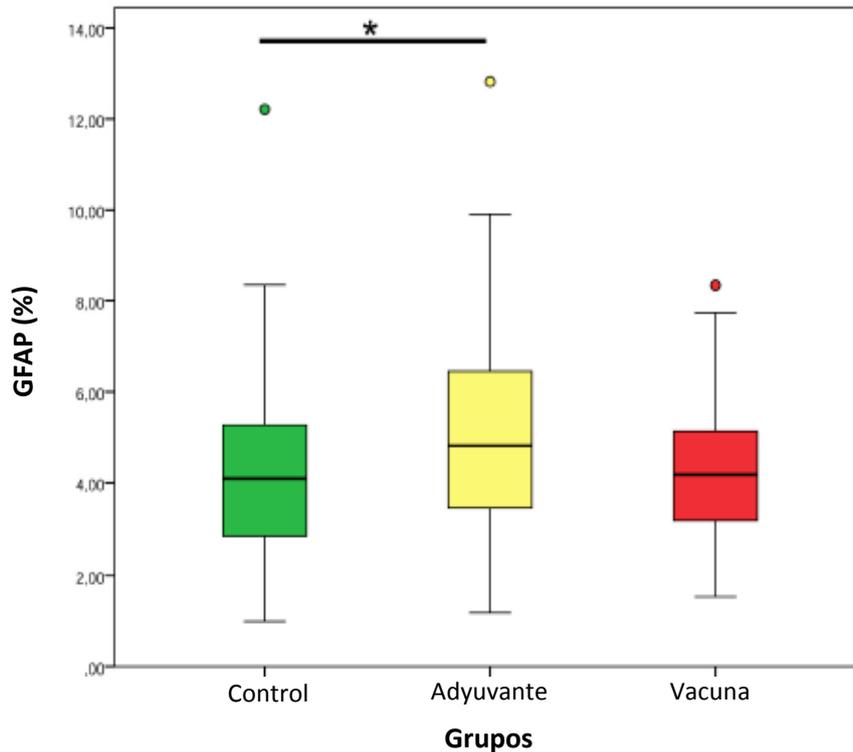


Figura 5. Expresión de la GFAP en la médula espinal lumbar (*P=0,047). El grupo Adyuvante presenta un marcaje de la GFAP significativamente superior al del grupo Control.

El análisis de los datos obtenidos en la médula espinal lumbar mostró una mayor activación glial en el grupo Adyuvante (animales inoculados sólo con HdA) que el grupo Control (inoculado con PBS). La sobreexpresión de la proteína GFAP en esta sección medular podría reflejar la capacidad de transporte del AI vacunal desde el punto de inoculación a la médula espinal lumbar, de bioacumularse en ella y desencadenar una reacción neuroinflamatoria de activación astrocitaria. Ensayos experimentales en ratones inoculados con HdA observaron un aumento en el número de astrocitos reactivos, la proliferación de células gliales y un incremento en la cantidad de neuronas apoptóticas en la médula espinal lumbar (Petrik *et al.*, 2007; Shaw y Petrik, 2009). El estudio histopatológico de ovejas afectadas por el síndrome ASIA ovino de forma natural mostró necrosis y la pérdida de neuronas en la sustancia gris de la médula espinal (Luján *et al.*, 2013). Por otro lado, Shaw y Petrik (2009) analizaron la presencia del AI en las 3 secciones medulares (cervical, torácica y lumbar) y únicamente fue identificado a nivel lumbar. De este hallazgo extrajeron dos conclusiones acerca de la biodistribución del AI: i) el punto de entrada de este elemento a la médula podría ser la zona lumbar, y ii) el AI podría penetrar en la médula vía retrógrada, transportándose desde los músculos hasta alcanzar las motoneuronas de la médula.

Un modelo experimental en ratones inoculados con distintas concentraciones de HdA, reflejó que la inyección de dosis más bajas generaba una reacción tisular menos intensa en el punto de inoculación y formaba granulomas subcutáneos de menor tamaño, mientras que los cambios comportamentales aparecían más temprano y los niveles de AI en el cerebro, medidos al mismo tiempo, eran superiores respecto al grupo de animales inoculados con dosis más altas. Este estudio concluyó que el uso de menores cantidades de AI generaba una reacción inflamatoria menos potente, por lo que el adyuvante persistía menos tiempo en el punto de inoculación y se transportaba a otros órganos en un período de tiempo post-vacunación inferior (Crépeaux *et al.*, 2017). La reproducción experimental del ASIA ovino obtuvo unos resultados similares al comparar la inoculación de vacunas adyuvantadas con AI (grupo Vacuna) y de AI solo (grupo Adyuvante). Macroscópicamente se observó que todos los animales del grupo Vacuna y la gran mayoría del grupo Adyuvante presentaban granulomas en el lugar de inyección, mientras que ninguno de los animales del grupo Control presentó esta reacción post-inyección. El número y el tamaño de los nódulos subcutáneos del grupo Vacuna fueron superiores respecto al grupo Adyuvante. Sin embargo, la cantidad de AI detectada en la médula lumbar fue superior en el grupo Adyuvante con respecto al grupo Vacuna. A nivel histológico, tanto en los granulomas como en los LN de animales de ambos grupos, se detectaron macrófagos activados que contenían en su citoplasma vacuolas con agregados de AI. Además, los animales del grupo Vacuna mostraron una reacción tisular local más severa. Estos hallazgos indican que el AI combinado con el antígeno en los preparados vacunales resulta en una combinación que induce una reacción inflamatoria más persistente y más inmunógena que el adyuvante solo. Esta reacción podría influir en el tiempo de persistencia del granuloma en el lugar de inoculación, que sería menor en el caso del adyuvante solo, facilitando la biodistribución temprana y sistémica del AI desde el punto de inoculación (Asín *et al.*, 2018). Esta hipótesis encaja con lo descrito en la bibliografía y podría explicar los resultados obtenidos en este trabajo, donde únicamente se aprecia una expresión significativamente mayor de la proteína GFAP en la sustancia gris de la médula espinal en los animales del grupo Adyuvante. Estos resultados podrían estar ligados al limitado número de muestras estudiadas y a la propia bioacumulación del AI en el tejido nervioso, un proceso lento de cuya cinética se está empezando a conocer ahora. Son necesarios más estudios sobre el AI utilizado como adyuvante vacunal y su capacidad para inducir alteraciones neuroinflamatorias en el SNC, especialmente en la médula espinal, para poder explicar algunas de las disfunciones motoras descritas dentro del síndrome ASIA ovino.

6. Conclusiones

1. Las secciones histológicas de la médula espinal lumbar de ovinos que fueron inoculados repetitivamente solo con el Al empleado como adyuvante vacunal mostraron una expresión de la proteína GFAP significativamente aumentada al compararla con el grupo Control.

2. En las muestras de los animales inoculados repetitivamente con vacunas comerciales adyuvantadas con Al, el aumento de la expresión de la proteína GFAP fue mayor que en el grupo Control, pero menor que en el grupo Adyuvante. En ningún caso la diferencia resultó ser estadísticamente significativa.

3. El Al utilizado como adyuvante vacunal podría estar directamente relacionado con la activación de los astrocitos en el sistema nervioso central. Esto podría explicar, al menos parcialmente, algunos de los signos observados en el síndrome ASIA ovino.

Conclusions

1. The histological sections of ovine lumbar spinal cord that were repetitively inoculated with the aluminum used as vaccine adjuvant shown a significant increase in GFAP protein expression.

2. The GFAP expression in the samples of animals that were repetitively inoculated with commercial aluminum adjuvanted vaccines was higher than in the Control group, but lower than the Adjuvant group. The differences were not statistically significant.

3. The aluminum used as vaccine adjuvant could be directly related to astrocytes activation in the central nervous system. This link could explain, at least partially, some of the signs observed in the ovine ASIA syndrome.

7. Valoración personal

La realización de este Trabajo Fin de Grado ha supuesto una gran satisfacción a nivel personal. El estudio del síndrome ASIA me ha permitido conocer y profundizar en un tema totalmente desconocido para mí, pero que rápidamente logró captar mi interés. La parte práctica del trabajo, constituida por el procesamiento de las muestras y el análisis de las imágenes, la considero realmente gratificante y valiosa en mi formación, pudiendo ser de gran utilidad en mi futuro profesional. Llevarla a cabo me ha permitido adquirir nuevos conocimientos, realizar técnicas histopatológicas como la inmunohistoquímica y acercarme a la sistemática de trabajo dentro de un laboratorio. Por otro lado, la utilización del *software* de análisis de imagen ha supuesto el mayor reto personal durante la realización del trabajo al no haber tenido nunca contacto con programas informáticos similares. No obstante, considero una gran oportunidad poder haber tenido acceso a él y haber adquirido ciertas habilidades en su uso. Por último, agradecer enormemente a mi director Lluís Luján, Javier Asín y Ricardo de Miguel por su colaboración y su total disposición para ayudarme ante cualquier duda o problema que me ha surgido durante el desarrollo de este estudio. También agradecer a aquellas personas que de un modo más indirecto me han prestado su ayuda para llevar a término este trabajo.

8. Bibliografía

- Agence française de sécurité sanitaire. (2009). Review of adverse affects observed after vaccination against bluetongue, serotype 1 and serotype 8, as of 31/05/2009. Recuperado de: <https://www.anses.fr/en/system/files/ANMV-Fi-VaccinFCOEN.pdf>
- Agmon-Levin, N., Arango, M.-T., Kivity, S., Katzav, A., Gilburd, B., Blank, M., ... Chapman, J. (2014). Immunization with hepatitis B vaccine accelerates SLE-like disease in a murine model. *Journal of Autoimmunity*, 54, 21–32. <https://doi.org/10.1016/J.JAUT.2014.06.006>
- Agmon-Levin, N., Hughes, G. R. V, y Shoenfeld, Y. (2012). The spectrum of ASIA: “Autoimmune (Auto-inflammatory) Syndrome induced by Adjuvants”. *Lupus*, 21(2), 118–120. <https://doi.org/10.1177/0961203311429316>
- Arango, M.-T., Perricone, C., Kivity, S., Cipriano, E., Ceccarelli, F., Valesini, G., y Shoenfeld, Y. (2017). HLA-DRB1 the notorious gene in the mosaic of autoimmunity. *Immunologic Research*, 65(1), 82–98. <https://doi.org/10.1007/s12026-016-8817-7>
- Asín, J., Molín, J., Pinczowski, P., Gimeno, M., Navascués, N., Muniesa, A., ... Luján, L. (2018). Pathologic characterization of granulomas following subcutaneous inoculation with aluminum adjuvant-containing products in sheep. *Veterinary Pathology*. (en prensa).
- Awate, S., Babiuk, L. A., y Mutwiri, G. (2013). Mechanisms of action of adjuvants. *Frontiers in Immunology*, 4, 114. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00114>
- Bastola, R., Noh, G., Keum, T., Bashyal, S., Seo, J. E., Choi, J., ... Lee, S. (2017). Vaccine adjuvants: smart components to boost the immune system. *Archives of Pharmacal Research*, 40(11), 1238–1248. <https://doi.org/10.1007/s12272-017-0969-z>

- Batista-Duharte, A., Lastre, M., y Pérez, O. (2014). Immunological adjuvants. Determinant factors in the efficacy-toxicity ratio of the contemporary vaccines. *Medicina Clinica*, 32(2), 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.11.012>
- Batista-Duharte, A., Martínez, D. T., y Carlos, I. Z. (2018). Efficacy and safety of immunological adjuvants. Where is the cut-off?. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 105, 616–624. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.026>
- Batista-Duharte, A., Portuondo, D., Carlos, I. Z., y Pérez, O. (2013). An approach to local immunotoxicity induced by adjuvanted vaccines. *International Immunopharmacology*, 3(17), 526–536. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.07.025>
- Bertram, C. A., y Klopfeisch, R. (2017). The Pathologist 2.0: An Update on Digital Pathology in Veterinary Medicine. *Veterinary Pathology*, 54(5), 756–766. <https://doi.org/10.1177/0300985817709888>
- Bogdanos, D. P., Smyk, D. S., Invernizzi, P., Rigopoulou, E. I., Blank, M., Pouria, S., y Shoenfeld, Y. (2013). Infectome: A platform to trace infectious triggers of autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 12(7), 726–740. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2012.12.005>
- Brown, D. L. (2017). Practical Stereology Applications for the Pathologist. *Veterinary Pathology*, 54(3), 358–368. <https://doi.org/10.1177/0300985817695781>
- Burakova, Y., Madera, R., McVey, S., Schlup, J. R., y Shi, J. (2018). Adjuvants for Animal Vaccines. *Viral Immunology*, 31(1), 11–22. <https://doi.org/10.1089/vim.2017.0049>
- Co, D. O., Hogan, L. H., Il-Kim, S., y Sandor, M. (2004). T cell contributions to the different phases of granuloma formation. *Immunology Letters*, 92(1–2), 135–142. <https://doi.org/10.1016/J.IMLET.2003.11.023>
- Coffman, R. L., Sher, A., y Seder, R. A. (2010). Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity*, 33(4), 492–503. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.002>
- Crépeaux, G., Eidi, H., David, M.-O., Baba-Amer, Y., Tzavara, E., Giros, B., ... Gherardi, R. K. (2017). Non-linear dose-response of aluminium hydroxide adjuvant particles: Selective low dose neurotoxicity. *Toxicology*, 375, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.11.018>
- Decisión 2008/655/CE de la Comisión, de 24 de julio de 2008 por la que se aprueban los planes de vacunación de urgencia contra la fiebre catarral ovina de determinados Estados miembros y se determina el nivel de la participación de la Comunidad para 2007 y 2008. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 9 de agosto de 2008, núm. C(2008)3757. Recuperado de: <https://eurlex.europa.eu/legalcontent/ES/TXT/?uri=celex:32008D0655>
- Di Pasquale, A., Preiss, S., Tavares Da Silva, F., y Garçon, N. (2015). Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. *Vaccines*, 3(2), 320–343. <https://doi.org/10.3390/vaccines3020320>
- Dyer, F., Brown, E., Cooles, S., y Tait, A. (2009). Suspected adverse reactions, 2008. *Veterinary Record*, 165(6), 162–164. <https://doi.org/10.1136/vr.165.6.162>
- Eidi, H., David, M.-O., Crépeaux, G., Henry, L., Joshi, V., Berger, M.-H., ... Curmi, P. A. (2015). Fluorescent nanodiamonds as a relevant tag for the assessment of alum adjuvant particle biodisposition. *BMC Medicine*, 13(1), 144. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0388-2>
- Eng, L. F., Ghirnikar, R. S., y Lee, Y. L. (2000). Glial Fibrillary Acidic Protein : GFAP-Thirty-One Years (1969-2000). *Neurochemical Research*, 25(9–10), 1439–1451. <https://doi.org/10.1023/A:1007677003387>
- Gherardi, R. K., y Authier, F. J. (2003). Aluminum inclusion macrophagic myofasciitis: A recently identified condition. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 23(4), 699–712. [https://doi.org/10.1016/S0889-8561\(03\)00095-X](https://doi.org/10.1016/S0889-8561(03)00095-X)

- Gherardi, R. K., y Authier, F. J. (2012). Macrophagic myofasciitis: characterization and pathophysiology. *Lupus*, 21(2), 184–189. <https://doi.org/10.1177/0961203311429557>
- Gherardi, R. K., Coquet, M., Cherin, P., Belec, L., Moretto, P., Dreyfus, P. A., ... Authier, F. J. (2001). Macrophagic myofasciitis lesions assess long-term persistence of vaccine-derived aluminium hydroxide in muscle. *Brain*, 124(9), 1821–1831. <https://doi.org/10.1093/brain/124.9.1821>
- Glenny, A. T., Pope, C. G., Waddington, H., y Wallace, U. (1926). Immunological notes. XVII-XXIV. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 29(1), 31–40. <https://doi.org/10.1002/path.1700290106>
- González, J. M., Figueras, L., Ortega, M. E., Lozano, M., de Arcaute, M. R., Royo, R., ... De las Heras, M. (2010). Possible adverse reactions in sheep after vaccination with inactivated BTV vaccines. *The Veterinary Record*, 166(24), 757–758. <https://doi.org/10.1136/vr.b4849>
- Goto, N., Kato, H., Maeyama, J., Shibano, M., Saito, T., Yamaguchi, J., y Yoshihara, S. (1997). Local tissue irritating effects and adjuvant activities of calcium phosphate and aluminium hydroxide with different physical properties. *Vaccine*, 15(12–13), 1364–1371. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(97\)00054-6](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(97)00054-6)
- Graf, R., Guscetti, F., Welle, M., Meier, D., y Pospischil, A. (2018). Feline Injection Site Sarcomas: Data from Switzerland 2009–2014. *Journal of Comparative Pathology*, 163, 1–5. <https://doi.org/10.1016/J.JCPA.2018.06.008>
- Grun, J. L., y Maurer, P. H. (1989). Different T helper cell subsets elicited in mice utilizing two different adjuvant vehicles: The role of endogenous interleukin 1 in proliferative responses. *Cellular Immunology*, 121(1), 134–145. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(89\)90011-7](https://doi.org/10.1016/0008-8749(89)90011-7)
- Guimarães, L. E., Baker, B., Perricone, C., y Shoenfeld, Y. (2015). Vaccines, adjuvants and autoimmunity. *Pharmacological Research*, 100, 190–209. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.08.003>
- Hamilton, P. W., Bankhead, P., Wang, Y., Hutchinson, R., Kieran, D., McArt, D. G., ... Salto-Tellez, M. (2014). Digital pathology and image analysis in tissue biomarker research. *Methods*, 70(1), 59–73. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.06.015>
- HogenEsch, H. (2002). Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants. *Vaccine*, 20(Suppl 3), 34–39. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00169-X](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00169-X)
- Hol, E. M., y Pekny, M. (2015). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current Opinion in Cell Biology*, 32, 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.02.004>
- Israeli, E. (2012). Gulf War Syndrome as a part of the autoimmune (autoinflammatory) syndrome induced by adjuvant (ASIA). *Lupus*, 21(2), 190–194. <https://doi.org/10.1177/0961203311429552>
- Janeway, C. A., y Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, 20(1), 197–216. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>
- Khan, Z., Combadière, C., Authier, F. J., Itier, V., Lux, F., Exley, C., ... Cadusseau, J. (2013). Slow CCL2-dependent translocation of biopersistent particles from muscle to brain. *BMC Medicine*, 11(1), 99. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-99>
- Kroger, A. T., Duchin, J., y Vázquez, M. (2017). General Best Practice Guidelines for Immunization. Best Practices Guidance of the Advisory Committee on Immunization

- Practices (ACIP). Recuperado de: <https://www.cdc.gov/vaccines/hcp/acip-recs/general-recs/adverse-reactions.html>
- Lambrecht, B. N., Kool, M., Willart, M. A., y Hammad, H. (2009). Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Current Opinion in Immunology*, 21(1), 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.01.004>
- Lee, S., y Nguyen, M. T. (2015). Recent Advances of Vaccine Adjuvants for Infectious Diseases. *Immune Network*, 15(2), 51. <https://doi.org/10.4110/in.2015.15.2.51>
- Leroux-Roels, G. (2010). Unmet needs in modern vaccinology. *Vaccine*, 28, 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.07.021>
- Luján, L., Pérez, M., Salazar, E., Álvarez, N., Gimeno, M., Pinczowski, P., ... Chapullé, J. L. G. (2013). Autoimmune/autoinflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA syndrome) in commercial sheep. *Immunologic Research*, 56(2–3), 317–324. <https://doi.org/10.1007/s12026-013-8404-0>
- Martin, P. M., y O'Callaghan, J. P. (1995). A direct comparison of GFAP immunocytochemistry and GFAP concentration in various regions of ethanol-fixed rat and mouse brain. *Journal of Neuroscience Methods*, 58(1–2), 181–192. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(94\)00175-G](https://doi.org/10.1016/0165-0270(94)00175-G)
- Mbow, M. L., De Gregorio, E., Valiante, N. M., y Rappuoli, R. (2010). New adjuvants for human vaccines. *Current Opinion in Immunology*, 22(3), 411–416. <https://doi.org/10.1016/J.COI.2010.04.004>
- Meeusen, E. N. T., Walker, J., Peters, A., Pastoret, P.-P., y Jungersen, G. (2007). Current status of veterinary vaccines. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(3), 489–510. <https://doi.org/10.1128/CMR.00005-07>
- Middeldorp, J., y Hol, E. M. (2011). GFAP in health and disease. *Progress in Neurobiology*, 93(3), 421–443. <https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2011.01.005>
- Minor, P. D. (2015). Live attenuated vaccines: Historical successes and current challenges. *Virology*, 479–480, 379–392. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2015.03.032>
- Mold, M., Shardlow, E., y Exley, C. (2016). Insight into the cellular fate and toxicity of aluminium adjuvants used in clinically approved human vaccinations. *Scientific Reports*, 6(1), 31578. <https://doi.org/10.1038/srep31578>
- O'Hagan, D. T., y Fox, C. B. (2015). New generation adjuvants - From empiricism to rational design. *Vaccine*, 33, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.01.088>
- O'Hagan, D. T., y Valiante, N. M. (2003). Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(9), 727–735. <https://doi.org/10.1038/nrd1176>
- Ohmori, K., Masuda, K., Maeda, S., Kaburagi, Y., Kurata, K., Ohno, K., ... Sakaguchi, M. (2005). IgE reactivity to vaccine components in dogs that developed immediate-type allergic reactions after vaccination. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 104(3–4), 249–256. <https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2004.12.003>
- OIE-World Organization for Animal Health. (2013). OIE Technical Disease Cards: Bluetongue. Recuperado de: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/BLUETONGUE.pdf
- Passeri, E., Villa, C., Couette, M., Itti, E., Brugieres, P., Cesaro, P., ... Authier, F. J. (2011). Long-term follow-up of cognitive dysfunction in patients with aluminum hydroxide-induced

- macrophagic myofasciitis (MMF). *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105(11), 1457–1463. <https://doi.org/10.1016/J.JINORGBIO.2011.08.006>
- Pellegrino, P., Clementi, E., y Radice, S. (2015). On vaccine's adjuvants and autoimmunity: Current evidence and future perspectives. *Autoimmunity Reviews*, 14(10), 880–888. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2015.05.014>
- Pérez, O., Lastre, M., Cabrera, O., del Campo, J., Bracho, G., Cuello, M., ... Campa, C. (2007). New Vaccines Require Potent Adjuvants like AFPL1 and AFCo1. *Scandinavian Journal of Immunology*, 66(2–3), 271–277. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2007.01981.x>
- Perricone, C., Colafrancesco, S., Mazor, R. D., Soriano, A., Agmon-Levin, N., y Shoenfeld, Y. (2013). Autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA) 2013: Unveiling the pathogenic, clinical and diagnostic aspects. *Journal of Autoimmunity*, 47, 1–16. <https://doi.org/10.1016/J.JAUT.2013.10.004>
- Petrik, M. S., Wong, M. C., Tabata, R. C., Garry, R. F., y Shaw, C. A. (2007). Aluminum adjuvant linked to Gulf War illness induces motor neuron death in mice. *NeuroMolecular Medicine*, 9(1), 83–100. <https://doi.org/10.1385/NMM:9:1:83>
- Petrovsky, N., y Aguilar, J. C. (2004). Vaccine adjuvants: Current state and future trends. *Immunology and Cell Biology*, 82(5), 488–496. <https://doi.org/10.1111/j.0818-9641.2004.01272.x>
- Ramos-Vara, J. A., y Miller, M. A. (2014). When Tissue Antigens and Antibodies Get Along. *Veterinary Pathology*, 51(1), 42–87. <https://doi.org/10.1177/0300985813505879>
- Riedel, S. (2005). Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proceedings*, 18(1), 21–25. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16200144>
- Ruiz, J. T., Luján, L., Blank, M., y Shoenfeld, Y. (2017). Adjuvants- and vaccines-induced autoimmunity: animal models. *Immunologic Research*, 65(1), 55–65. <https://doi.org/10.1007/s12026-016-8819-5>
- Savini, G., Lorusso, A., Paladini, C., Migliaccio, P., Di Gennaro, A., Di Provvio, A., ... Monaco, F. (2014). Bluetongue Serotype 2 and 9 Modified Live Vaccine Viruses as Causative Agents of Abortion in Livestock: A Retrospective Analysis in Italy. *Transboundary and Emerging Diseases*, 61(1), 69–74. <https://doi.org/10.1111/tbed.12004>
- Schijns, V. E. J. C. (2016). Vaccine Adjuvants' Mode of Action: Unraveling “the Immunologist's Dirty Little Secret.” In *Immunopotentiators in Modern Vaccines: Second Edition* (pp. 1–22). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804019-5.00001-3>
- Shaw, C. A., Li, Y., y Tomljenovic, L. (2013). Administration of aluminium to neonatal mice in vaccine-relevant amounts is associated with adverse long term neurological outcomes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 128, 237–244. <https://doi.org/10.1016/J.JINORGBIO.2013.07.022>
- Shaw, C. A., y Petrik, M. S. (2009). Aluminum hydroxide injections lead to motor deficits and motor neuron degeneration. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103(11), 1555–1562. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.05.019>
- Shoenfeld, Y., y Agmon-Levin, N. (2011). “ASIA” - Autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants. *Journal of Autoimmunity*, 36(1), 4–8. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2010.07.003>
- Shoenfeld, Y., Gilburd, B., Abu-Shakra, M., Amital, H., Barzilai, O., Berkun, Y., ... Tomer, Y. (2008). The mosaic of autoimmunity: Genetic factors involved in autoimmune diseases - 2008. *Israel Medical Association Journal*, 10(1), 3–7. Recuperado de:

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18300562>
- Tkachuk, A. P., Gushchin, V. A., Potapov, V. D., Demidenko, A. V., Lunin, V. G., y Gintsburg, A. L. (2017). Multi-subunit BCG booster vaccine GamTBvac: Assessment of immunogenicity and protective efficacy in murine and Guinea pig TB models. *PLoS ONE*, *12*(4), e0176784. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176784>
- Tsumiyama, K., Miyazaki, Y., y Shiozawa, S. (2009). Self-organized criticality theory of autoimmunity. *PLoS One*, *4*(12), e8382. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008382>
- Vera-Lastra, O., Medina, G., Cruz-Dominguez, M. del P., Ramirez, P., Gayosso-Rivera, J., Anduaga-Dominguez, H., ... Jara, L. (2012). Human adjuvant disease induced by foreign substances: a new model of ASIA (Shoenfeld's syndrome). *Lupus*, *21*(2), 128–135. <https://doi.org/10.1177/0961203311429317>
- Verdier, F., Burnett, R., Michelet-Habchi, C., Moretto, P., Fievet-Groyne, F., y Sauzeat, E. (2005). 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*(11), 1359–1367. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2004.09.012>
- Warren-Gash, C., Forbes, H., y Breuer, J. (2017). Varicella and herpes zoster vaccine development: lessons learned. *Expert Review of Vaccines*, *16*(12), 1191–1201. <https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1394843>
- Watad, A., Quaresma, M., Bragazzi, N. L., Cervera, R., Tervaert, J. W. C., Amital, H., y Shoenfeld, Y. (2018). The autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA)/Shoenfeld's syndrome: descriptive analysis of 300 patients from the international ASIA syndrome registry. *Clinical Rheumatology*, *37*(2), 483–493. <https://doi.org/10.1007/s10067-017-3748-9>
- WHO - World Health Organization. (2012). Macrophagic myofasciitis and aluminium-containing vaccines. Recuperado de: http://www.who.int/vaccine_safety/committee/reports/october_1999/en/
- Yang, Z., y Wang, K. K. W. (2015). Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends in Neurosciences*, *38*(6), 364–374. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2015.04.003>
- Zepp, F. (2010). Principles of vaccine design-Lessons from nature. *Vaccine*, *28*(Suppl. 3), 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.07.020>

Anexos

Anexo I. Protocolo para la realización de la técnica inmunohistoquímica indirecta específica frente a la proteína GFAP (VECTASTAIN ABC-Elite kit, Vector Laboratories Inc., EEUU).

1. Desparafinar e hidratar las secciones tisulares: introducir las muestras en distintos alcoholes durante tiempos fijados.

1º Incubar 30 minutos en xilol I	4º Incubar 3 minutos en alcohol absoluto II
2º Incubar 20 minutos en xilol II	5º Incubar 3 minutos en alcohol absoluto III.
3º Incubar 3 minutos en alcohol absoluto I	6º Lavado con agua destilada.

2. Recuperación antigénica por calor (baño a 96°C): dejar 30 minutos las muestras en una solución de citrato (pH 6).

3. Lavar las muestras 5 minutos con tampón TRIS.

4. Preparar la solución de bloqueo de la peroxidasa endógena (184 ml de metanol y 16 ml de peróxido de hidrógeno), cubrir con ella las preparaciones y dejarlas 20 minutos en una cámara oscura.

5. Preparar la solución de bloqueo de la biotina, cubrir todo el tejido y dejar las muestras 20 minutos en una cámara húmeda.

6. Preparación del anticuerpo primario (anticuerpo anti-GFAP monoclonal) en una disolución 1:100 con PBS. Cubrir las muestras con 100 microlitros de la disolución e incubarlas en la estufa a 90°C durante 2 horas.

7. Lavar las muestras 5 minutos con tampón TRIS.

8. Preparar el anticuerpo secundario biotinilado, cubrir las muestras e incubarlas 30 minutos.

9. Lavar las muestras 5 minutos con tampón TRIS.

10. Preparar el reactivo ABC (30 minutos antes de su uso), cubrir las muestras e incubarlas 30 minutos.

11. Lavar las preparaciones 5 minutos con tampón TRIS.

12. Preparar la solución del cromógeno DAB (3,3'-diaminobencidina), pipetear 500 microlitros en cada muestra e incubar durante 1,5 minutos (tiempo fijado previamente para lograr la intensidad de tinción deseada).

13. Lavar con agua corriente e introducir las secciones dentro de una cubeta con hematoxilina durante 45 segundos.

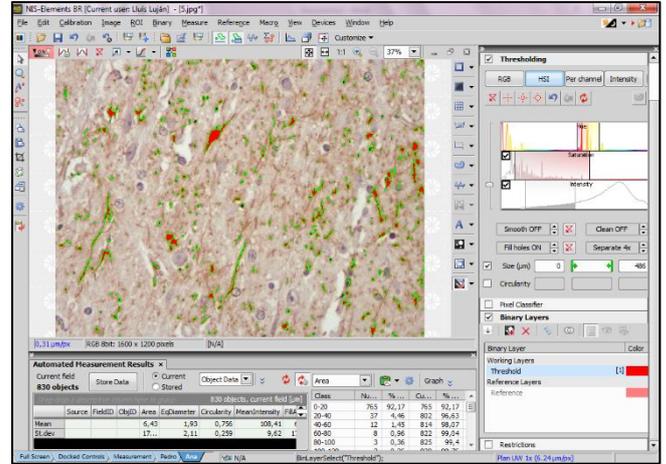
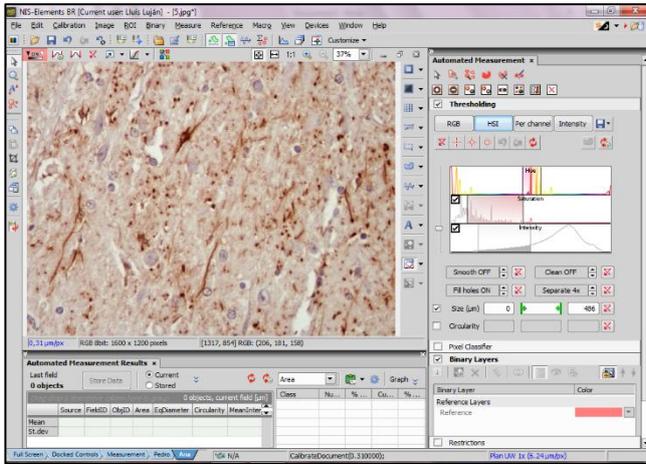
14. Lavar las muestras 5 minutos en agua corriente.

15. Deshidratar las preparaciones introduciéndolas en alcoholes con una graduación decreciente y xilol:

1º Tres minutos en alcohol 85º	5º Tres minutos en alcohol absoluto III (100º)
2º Tres minutos en alcohol 95º	6º Tres minutos en xilol I
3º Tres minutos en alcohol absoluto I (100º)	7º Tres minutos en xilol II
4º Tres minutos en alcohol absoluto II (100º)	8º Tres minutos en xilol III

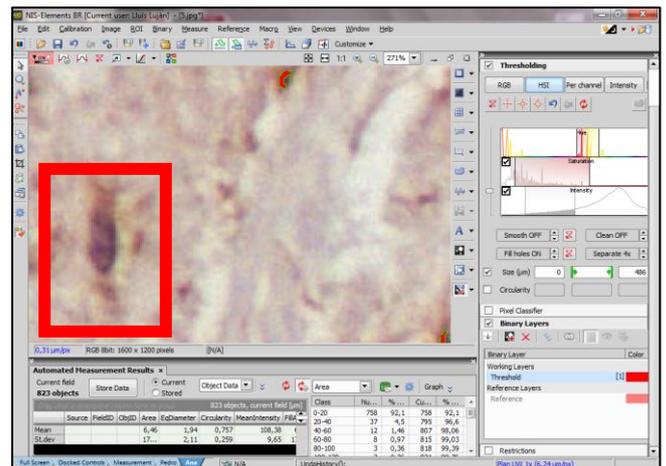
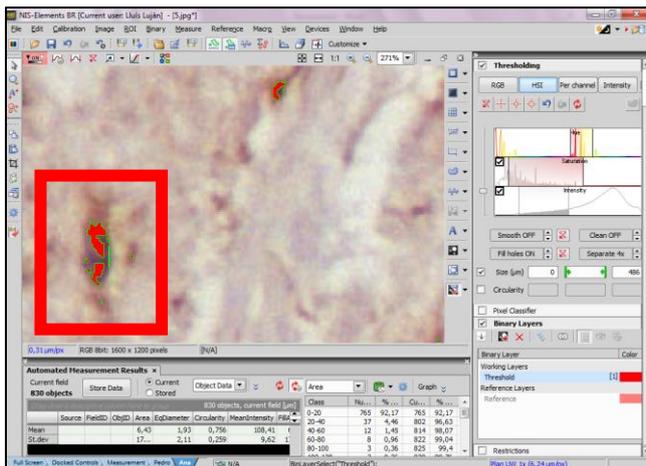
16. Montar el cubreobjetos sobre el tejido en el portaobjetos y etiquetar cada muestra.

Anexo II. Secuencia del proceso de análisis de imagen con el programa informático de Nikon NIS-Elements Basic Research.

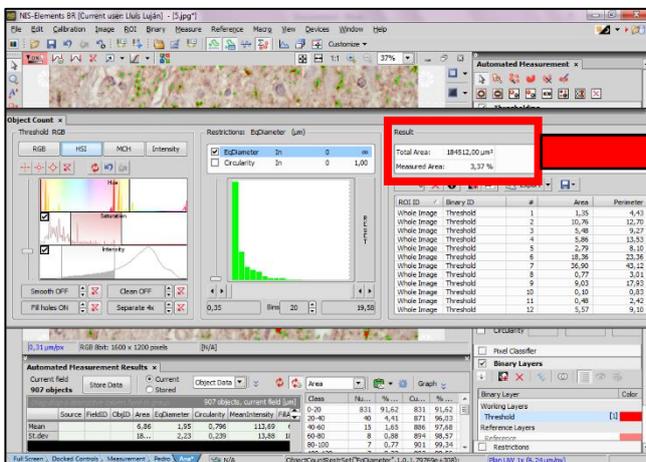


i) IHQ de una sección del asta dorsal de la médula espinal lumbar de un cordero del grupo Vacuna (x40).

ii) Marcaje de las áreas teñidas.



iii) Secuencia de imágenes: eliminar zonas seleccionadas inmunoteñidas no específicas.



Total Area: 184512,00 µm²
Measured Area: 3,37 %

iv) Obtención de resultados: área total marcada (% de GFAP).