



# Biopersistenza e traslocazione nel cervello degli adiuvanti vaccinali contenenti alluminio

Romain Kroum Gherardi\*, Housam Eidi, Guillemette Crépeaux, François Jerome Authier and Josette Cadusseau

Faculté de Médecine and Faculté des Sciences et Technologie, INSERM U955 Team 10, Université Paris Est-Créteil, Créteil, France

## Edited by:

Lucija Tomljenovic, University of British Columbia, Canada

## Reviewed by:

Samir Kumar-Singh, Antwerp University, Belgium

Mark P. Burns, Georgetown University Medical Center, USA  
Lucija Tomljenovic, University of British Columbia, Canada

## \*Correspondence:

Romain Kroum Gherardi, Faculté de Médecine and Faculté des Sciences et Technologie, INSERM U955 Team 10, Université Paris Est-Créteil, 8 rue du Général Sarraill, Créteil 9410, France e-mail: romain.gherardi@hmn.aphp.fr

L'idrossido di alluminio è un componente cristallino ampiamente utilizzato come adiuvante immunologico nei vaccini. Una certa inquietudine riguardo all'utilizzo di particelle di alluminio è emersa dopo che furono identificate come fattore causale della lesione da miofascite macrofagica (MMF) rilevata in pazienti affetti da encefalomielite mialgica/sindrome da stanchezza cronica. L'MMF ha rivelato una biopersistenza dell'alluminio duratura ed inattesa nelle cellule immunitarie di individui verosimilmente predisposti, evidenziando così come errata la concezione precedente riguardo la sua eliminazione dall'organismo. Abbiamo già dimostrato come particelle rivestite di alluminio leggermente biodegradabili iniettate per via intramuscolare vengano velocemente assorbite per fagocitosi dai muscoli e dai gangli linfatici e possano successivamente spargersi nell'intero corpo attraverso le cellule fagocitarie per poi accumularsi progressivamente nel cervello. Ciò lascia ampiamente presumere che la biopersistenza duratura degli adiuvanti nelle cellule fagocitarie sia un pre-requisito per una lenta traslocazione verso il cervello e per una neurotossicità a scoppio ritardato. Capire i meccanismi di base della biopersistenza delle particelle e della loro traslocazione nel cervello, rappresenta una sfida importante per il settore sanitario poiché permetterebbe di identificare i fattori di predisposizione legati all'insorgenza di lesioni neurotossiche croniche. È probabile che la biopersistenza dell'alluminio sia legata al suo effetto di disturbo al sistema lisosomiale, dovuto probabilmente alla rottura diretta dei cristalli delle membrane fagolisosomiali. I macrofagi che rilevano particelle estranee nel loro cytosol iniziano spesso uno speciale processo di autofagia, la xenofagia (la sua efficacia varia a seconda degli individui), che si ripete fino all'eliminazione della materia estranea. La compartimentazione completa delle particelle negli autofagosomi a doppia membrane e la successiva fusione con lisosomi riparati e riacidificati, espone l'allume al PH acido dei lisosomi, unico fattore che permette di rendere solubili le particelle di alluminio. La traslocazione delle particelle di allume verso il cervello è collegata ad un meccanismo a "cavallo di Troia" descritto precedentemente nel caso delle particelle infettive (HIV, epatite C), ed è controllato attraverso i segnali della proteina CCL2, il principale chemioattrattante dei monociti infiammatori.

Miliardi di persone sono state vaccinate, permettendo la regressione, persino l'eliminazione di svariate malattie infettive gravi. Oggi, gli ambiti potenziali di applicazione dei vaccini si sono spinti ben al di là della prevenzione delle malattie infettive e la vaccinazione è considerata un'arma promettente contro numerose malattie. I vaccini sono considerati assolutamente sicuri per la popolazione (1), ma sono stati segnalati anche effetti avversi (2).

Preoccupazioni sull'utilizzo dell'alluminio negli adiuvanti sono emerse (i) a seguito del riconoscimento del ruolo dell'alluminio nell'insorgenza della lesione da MMF nel 2001 (3, 4), che ha rivelato un errore fondamentale nella comprensione dell'effetto adiuvante e segnalato la sua biopersistenza duratura ed inaspettata (4); ed (ii) ha anche dimostrato la sua evidente capacità a migrare negli organi linfoidi e successivamente a disperdersi nel resto del corpo all'interno di

cellule di tipo monocitario e ad accumularsi progressivamente nel cervello (5).

Questo articolo analizza queste caratteristiche emergenti delle particelle di alluminio negli adiuvanti sollevando quesiti riguardo alla sicurezza di componenti ampiamente utilizzati.

## GLI ADIUVANTI CONTENENTI ALLUMINIO SONO COMPOSTI PARTICOLATI CHE DISTURBANO L'ATTIVITA' LISOSOMIALE

Gli adiuvanti vengono usati nei vaccini per la loro capacità di migliorare l'efficacia della risposta immunitaria ad un antigene somministrato in contemporanea. I sali di alluminio (conosciuti col nome di allume) sono gli adiuvanti vaccinali autorizzati per uso umano più utilizzati da più di 80 anni (6). Ancora oggi fanno parte della composizione dei vaccini contro il tetano, epatite A e B, papilloma virus, emophilus B, infezioni pneumococciche e meningococciche e l'antrace. Si tratta essenzialmente di ossidrossido di alluminio, un composto cristallino, di idrossifosfato

di alluminio e di fosfato di alluminio amorfo. L'allume ha la capacità di assorbire gli antigeni di superficie dei vaccini. Il maggior fenomeno di assorbimento risiede in uno scambio di leganti che implica la sostituzione di un gruppo idrossilico dell'adiuvante con un gruppo terminale di fosfato dell'antigene (7).

L'allume innesca una forte risposta immunitaria innata nel sito di inoculazione, come dimostra l'osservazione di afflusso di neutrofili, monociti e di macrofagi, di eosinofili e di cellule portatrici di antigene MHC-II, principalmente cellule dendritiche (DCs) (8). I macrofagi presenti nei muscoli situati principalmente nelle fasce, sono tra le prime cellule a rilevare un disturbo dell'omeostasi del muscolo (9). Inviano un segnale di allerta al sistema immunitario grazie ad una produzione locale di chemiochine ed arruolano altre cellule mieloidi come i neutrofili ed i monociti infiammatori che si differenziano in DCs (9). Specializzate nel fissaggio degli antigeni, le DC infiammatorie derivate dai monociti hanno un fenotipo immaturo nel muscolo. Però, a contatto con una distruzione tissutale e con materiale estraneo, queste cellule dendritiche migrano verso la paracorteccia dei gangli linfatici contenenti i linfociti T e là arrivano mentre le cellule mature producono cellule co-stimolanti (10). Le DC infiammatorie potrebbero essere essenziali all'attività dell'alluminio come adjuvante, così come suggerito da studi sul deficit selettivo (11), ma anche gli eosinofili sembrano giocare un ruolo di primo piano (12).

Da lungo tempo è stato accertato che l'allume assicura una risposta immunitaria duratura grazie alla formazione di un deposito che libera lentamente gli antigeni sotto l'influenza di liquido interstiziale (13, 14). L'idea secondo cui l'adiuvante iniettato resterebbe extracellulare è contraddetta dai risultati delle biopsie muscolari realizzate su pazienti vaccinati (4). Contrariamente ai luoghi comuni, le particelle di alluminio vengono fortemente assorbite dalle cellule fagocitarie (15). Il forte legame tra gli antigeni e le particelle di allume aumenta l'assorbimento degli antigeni da parte delle DC, diminuisce la distruzione degli antigeni e sostiene il processo di presentazione degli antigeni *in vitro* (16). La sopravvivenza dei macrofagi sarebbe favorita anche dall'assorbimento delle particelle di alluminio (17). L'inoculazione di allume scatena *in vivo* una formazione di granulomi persistenti indotti dall'allume nel punto di una precedente vaccinazione (4, 18, 19). Tuttavia, una buona vaccinazione non necessita di persistenza locale dell'allume, poiché non sono state osservate diminuzioni alcune delle reazioni dei linfociti B e T specifici all'antigene dopo la rimozione dal sito di vaccinazione 2 ore dopo l'iniezione (20).

Malgrado il lungo utilizzo dei Sali di alluminio, la letteratura ha sottolineato che i loro meccanismi come adjuvanti restano ampiamente sconosciuti nonostante gli studi approfonditi degli ultimi anni (21, 22). L'allume ha una scarsa capacità di attivare una risposta immunitaria a mediazione cellulare e a sviluppare una risposta dei linfociti T ausiliari di tipo 2 (Th2), risposta associata ad una forte produzione di IL-4 e di anticorpi sottotipo IgG1 (23). Riguardo ai meccanismi dell'azione adjuvante dell'allume, sono state proposte svariate spiegazioni,

la maggioranza però è stata successivamente contestata (24). In particolare, è stato dimostrato che l'infiammasoma NLRP3 veniva fortemente attivato dall'allume (25,26), ma alla fine si è rivelato non essenziale all'effetto adjuvante (27, 28). E' pur vero che l'idrossido di alluminio ed altri cristalli come silicio, urato di sodio ed amianto, attivano fortemente l'NLRP3, liberano IL1b ed attivano una cascata di reazioni infiammatorie. Più recentemente, sono stati prodotti modelli alternativi di immunità indotta dall'alluminio, basati sul legame tra gli effetti adjuvanti dell'allume ed il rilascio di biomolecole non citochine come l'acido urico (29), il DNA a doppia elica (30), e la prostaglandina E2 (31). La specificità delle vie di segnalazione attivate dai cristalli è stata proposta come spiegazione del fatto che le particelle di idrossido di alluminio hanno un effetto più irritante dell'alluminio solubile (32). I cristalli di allume si legano sistematicamente al doppio strato lipidico della membrana plasmatica e l'attaccano (33), disturbano l'azione dei lisosomi incaricati della distruzione dei materiali assorbiti attraverso l'endocitosi, la fagocitosi o l'autofagocitosi (34, 35), e svolgono un ruolo importante nell'immunità. I metodi ben controllati di trattamento degli antigeni delle DC utilizzano delle proteasi lisosomiali e delle modificazioni del PH ottimali per la produzione di peptide piuttosto che per la distruzione totale delle proteine (36). Sappiamo che la limitazione della proteolisi lisosomiale delle proteine antigeniche aumenta la presentazione degli antigeni dell'immunogenicità (37), e che la stabilità dei peptidi complessi: MHCII che permettono il loro accumulo sulla superficie delle DC è aumentata dall'inibizione dell'attività lisosomiale (38). I meccanismi dell'azione adjuvante dell'allume possono, di conseguenza, implicare un'ostruzione dell'attività lisosomiale da parte dell'allume. Il disturbo dell'attività lisosomiale da parte dell'allume non è sicuro ma è possibile che la rottura fisica della membrana sia provocata direttamente dalla struttura cristallina dell'allume (39).

### L'MMF E' UN BIOMARCATORE CHE ATTESTA LA BIOPERSISTENZA A LUNGO TERMINE DELL'ALLUME NEGLI INDIVIDUI

Nel 1998, alcuni miopatologi francesi hanno descritto l'MMF come una patologia emergente con causa sconosciuta caratterizzata da una lesione patognomica alla biopsia muscolare che riunisce molti macrofagi contenenti agglomerati di nanocristalli nel loro citoplasma e degli infiltrati linfocitari (3), diversa dalle altre malattie istiocitarie e sempre individuata nel muscolo deltoide negli adulti (40). Le inclusioni citoplasmatiche vengono costantemente individuate, che siano o no circondate da membrane lisosomiali modificate e contengano alluminio (4). La loro struttura cristallina è tipica dell'idrossido di alluminio e nessuna esposizione all'alluminio oltre a quella causata da una precedente vaccinazione (100%) ha potuto essere individuata (4). Oggi è chiaro che l'insorgenza rapida dell'MMF in Francia riflette una combinazione (i) dell'abbandono della via sottocutanea (s.c.) per l'intramuscolare (i.m.) per le iniezioni vaccinali all'inizio degli anni '90; (ii) della campagna vaccinale su larga scala contro

l'epatite B rivolta agli adulti a metà degli anni '90 ; e (iii) della scelta preferenziale del muscolo deltoide per le biopsie, contrariamente alla scelta del bicipite brachiale e del quadricipite in altri paesi. I vaccini contenenti alluminio possono ugualmente indurre un pseudo-linfoma cutaneo nell'uomo (41), ed un fibrosarcoma nei gatti (42).

La MMF è stata riprodotta sperimentalmente dalla vaccinazione intramuscolare nei topi, nei ratti e nelle scimmie (4, 18, 19). La lesione sperimentale diminuisce costantemente col passare del tempo (19), e nella scimmia comincia a sparire completamente dal muscolo tra 6 e 12 mesi dall'iniezione di DTP, corrispondente ad una dose di allume da 14 a 20 volte l'equivalente per gli umani (18).

Poiché fare una biopsia muscolare ad un soggetto asintomatico è contrario all'etica, non si può determinare direttamente se un MMF di lunga durata possa esistere comunemente in forma latente. Questa ipotesi sembra però improbabile a seguito di un riesame recente di 130 biopsie consecutive del muscolo deltoide realizzate a fini diagnostici in pazienti affetti da mialgia che avevano in precedenza fatto un vaccino contenente alluminio. Questo studio ha rivelato che la maggior parte dei soggetti a cui era stata fatta un'iniezione contenente allume, non sono affetti da MMF di lunga durata. Questo risultato è piuttosto debole sapendo che l'età, la ratio H/F, il numero di inoculazioni vaccinali contenenti alluminio e la durata intercorsa tra l'ultima inoculazione e la biopsia del muscolo deltoide erano simili nei gruppi affetti e non da MMF (43). Ciò porta a rifiutare la convinzione non documentata che ogni soggetto vaccinato possa soffrire di lesioni da MMF di lunga durata se la biopsia viene effettuata nel deltoide (44). Inoltre, i pazienti affetti e non da MMF presentavano delle differenze cliniche come spiegato dettagliatamente di seguito.

Alla luce dei modelli sperimentali, è importante verificare l'elenco storico delle vaccinazioni di ogni paziente per determinare il carattere "insolitamente persistente" dell'MMF. In una recente analisi dei dati raccolti tra il 1994 ed il 2012 su 583 pazienti (45), la durata media tra l'ultima somministrazione di alluminio e la biopsia, era di 65 mesi. A confronto con i nostri precedenti studi, questa durata è progressivamente aumentata da 36 mesi nel 2001, o poco dopo il picco vaccinale degli adulti in Francia, a 53 mesi nel 2003 (46). Una media di 5,3 iniezioni contenenti allume sono state somministrate nel corso dei 10 anni precedenti una biopsia rilevante lesioni da MMF, corrispondenti principalmente a vaccinazioni contro l'epatite B (89.7%), il tetano (42.2%), e l'epatite A (8.8%). In pratica l'MMF è considerata insolitamente persistente quando la durata tra l'ultima vaccinazione e l'individuazione oltrepassa 18 mesi. È importante tener conto di questo dato per i bambini sottoposti ad inoculazioni multiple di vaccini prima dell'anno di età, aumentando così il rischio di associazione fortuita tra una malattia muscolare intrinseca ed un MMF individuata nel muscolo quadricipite, utilizzato per le vaccinazioni pediatriche. Sebbene il rischio di tali associazioni accidentali esista potenzialmente anche negli adulti, nella pratica si manifesta raramente. Per esempio, i pazienti adulti affetti sia da MMF che

da malattie muscolari ereditarie, sono estremamente rari, malgrado l'intenso programma di vaccinazioni in pazienti affetti da distrofia muscolare.

Studi realizzati su animali indicano che la grandezza delle lesioni granulomatose causata dall'allume varia considerabilmente in base al bagaglio genetico (19), e che resta valida l'ipotesi iniziale dell'OMS secondo la quale l'MMF potrebbe riflettere l'incapacità di alcuni individui di eliminare l'allume dall'organismo (47). In sintesi, le lesioni durature da MMF dovrebbero essere considerate un biomarcatore che attesta la biopersistenza insolitamente lunga dell'allume in individui malati.

### I PAZIENTI CON MMF ALLA BIOPISICA SOFFRONO DI ENOCEFALOMIELITE MIALGICA/SINDROME DELLA FATICA CRONICA

La miofasciite macrofagica è tipicamente rilevata in pazienti con mialgie diffuse e affaticamento cronico, come mostrato in entrambe le serie (46) e nelle serie di 16 pazienti recentemente pubblicate. (48).

In entrambe le serie, la maggioranza dei pazienti sono donne (70–80%) con un'età media di 45 anni al momento della biopsia, che tipicamente si lamentano di mialgie, con o senza artralgie o e fatica cronica invalidante. L'insorgenza di questi sintomi è tipicamente ritardata dall'immunizzazione.

Una forte associazione statistica tra mialgie e MMF è stata riscontrata da un'indagine generale in diversi centri neuromuscolari francesi (mialgia nel 90% dei pazienti con MMF vs il 44% senza MMF,  $p < 0.0001$ ) (4). L'inizio delle mialgie può seguire. Solitamente iniziano agli arti inferiori e non nel sito della pregressa immunizzazione da 0,5 a 84 mesi in pazienti Francesi, e da 3 a 192 mesi nei pazienti Portoghesi. Gradualmente si estendono verso la parte superiore del corpo, compromettendo i muscoli paravertebrali, e diventano generalizzate (46). Un elettromiogramma miopatico e l'aumento della creatinasi (CK) sono, rispettivamente, osservate in meno della metà dei pazienti. Il confronto dei vaccinati mialgici con o senza MMF alla biopsia del muscolo deltoide ha mostrato differenze significative: i pazienti con MMF raramente mostravano fibromialgia (gli 11 punteggi necessari dei criteri ACR 1990 per la fibromialgia presenti nel 16.6 vs. 55.5%,  $p < 0.04$ ), e più spesso avevano potenziali evocati ritardati suggestivi di una demielinizzazione del SNC (il 38.5 vs. 5.7%,  $p < 0.01$ ) (43), cosa che non supporta una associazione casuale.

La fatica cronica è un altro sintomo importante (48, 49). Uno studio caso-controllo condotto sotto l'egida dell'agenzia regolatrice francese AFSSAPS ha determinato l'affaticamento cronico sia come significativamente più presente e più severo nei pazienti con MMF rispetto a quelli senza MMF nel muscolo deltoide ([http://ansm.sante.fr/var/ansm\\_site/storage/original/application/030593fa4e393af7cec8ff7092832215.pdf](http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/030593fa4e393af7cec8ff7092832215.pdf)).

Alterazioni cognitive sono una stima del coinvolgimento del SNC anche se spesso non sono identificate da un esame di

routine. I pazienti lamentano perdita di memoria, annebbiamento cerebrale, e cambiamenti di umore. I test cognitive quasi costantemente mostrano alterazioni suggestive di danneggiamento organico cortico-sottocorticale che incide sulla memoria visiva, memoria di lavoro e l'ascolto dicotico (50). Questi deficit di solito rimangono stabili nel tempo (51).

Messi insieme, il dolore muscolare cronico, la fatica cronica, e le disfunzioni cognitive sono consistenti per la così detta encefalomielite mialgica /sindrome della fatica cronica (ME/CFS) e circa il 50% dei pazienti con MMF incontra i criteri internazionali per ME/CFS (48, 49). La ME/CFS è una grave e complessa malattia acquisita classificata come un disturbo neurologico nella WHO classificazione internazionale delle malattie dal 1969 (ICD 10 G93.3), distinta dalla fibromialgia e psicoastenìa, che sono classificate come disturbi muscoloscheletrici (M79.7) e psichiatrici (F48.8), rispettivamente. Gli studi internazionali hanno stimato la prevalenza della ME/CFS tra il 0.4 e il 2.6% della popolazione, con un onere annuale complessivo per la società di circa \$ 18,7- \$ 24,0 miliardi negli Stati Uniti (52). I sintomi della ME/CSF sono strettamente simili alla sindrome da affaticamento cronico post-infettivo (53). Le cause sottostanti alla ME/CSF sono attualmente sconosciute, ma si pensa che la malattia sia scatenata da una anomala risposta immunitaria ad una infezione o ad agenti tossici che risultano in un'attivazione immunitaria (54). In particolare, i pazienti ME / CFS hanno aumentato il rischio di sviluppare linfoma diffuso a grandi cellule B e linfoma a cellule B della zona marginale (55). Tale onere per la salute pubblica merita sforzi costanti per indagare sulle possibili cause e comprendere i meccanismi patologici della CFS.

### I FAGOCITI TRASPORTANO LE PARTICELLE DI ALLUMINIO AGLI ORGANI LINFOIDI E POI AL CERVELLO

Il collegamento concettuale tra la persistenza a lungo termine delle particelle di alluminio all'interno dei macrofagi nel sito di una precedente immunizzazione, e l'avverarsi di eventi avversi sistemici, in particolare quelli neurologici, è rimasta a lungo una domanda irrisolta. L'Alluminio è stato da tempo identificato come un metallo neurotossico, in grado di colpire la memoria, la cognizione ed il controllo neuro-motorio, attraverso l'alterazione della neurotrasmissione e dell'attività sinaptica, danneggiando la barriera ematoencefalica (BEE) esercitando effetti pro-ossidanti, attivando le microglia e la neuro infiammazione, deprimendo il metabolismo del glucosio cerebrale, e le funzioni mitocondriali, interferendo con le attività di trascrizione, e promuovendo l'aggregazione beta-amiloide e neurofilamentosa (56). In più, le particelle di alluminio hanno un impatto sul sistema immunitario attraverso il loro effetto adiuvante e attraverso molti altri modi. Esse assorbono gli antigeni vaccinali sulla loro superficie, che li proteggono dalla proteolisi formando così uno pseudo-patogeno persistentemente immunogenico (57). Le particelle di alluminio potrebbero inoltre legare prodotti di residuo inerenti alle procedure di produzione vaccinale, come

dimostrato per le sequenze di DNA di HPV (58) o proteine di lieviti (59) che potrebbero essere potenzialmente pericolose (60). In fine, le particelle di alluminio possono direttamente indurre allergie, (61,62) come altri metalli (63).

Le preoccupazioni relative alla biopersistenza a lungo termine dell'alluminio dipende largamente dalla capacità del particolato di alluminio di raggiungere ed esercitare la tossicità in organi remoti. Questa capacità è stata suggerita da parecchi studi (64-67). Lo studio di riferimento sulla biodisponibilità dell'Idrossido di Alluminio utilizzò alluminio arricchito con l'isotopo <sup>26</sup>Al iniettato nel muscolo di coniglio: il <sup>26</sup>Al fu debolmente eliminato nelle urine (il 6% al giorno 28) e fu rilevato in linfonodi, milza, fegato e cervello (13). Non è stato esplorato se il <sup>26</sup>Al fosse ancora in forma di particella o in forma solubile. Il destino del materiale particolato è stato esplorato dal nostro team. Abbiamo eseguito successivamente iniezioni i.m. di vaccino contenente allume, perle di lattice fluorescenti e ibridi nano fluorescenti rivestiti con allume precipitato (5). Questi materiali sono stati rapidamente catturati dai macrofagi, una grande percentuale dei quali ha spaccato il muscolo iniettato, principalmente all'interno delle cellule immunitarie, raggiungendo i linfonodi drenanti. Le cellule cariche di particelle sono poi sfuggite al sistema linfatico per raggiungere la circolazione sanguigna, presumibilmente attraverso il dotto toracico. Così facendo, sono state in grado di raggiungere organi distanti come la milza, il fegato e, molto lentamente, il cervello. L'iniezione di chemochine ricombinanti e l'utilizzo di topi geneticamente modificati ha mostrato che la biodistribuzione sistemica delle particelle dipende in modo cruciale dal chemo-attraattore del monocita MCP/CCL2. Nel cervello, le particelle sono state trovate principalmente nelle cellule microgliali. In accordo con una buona tolleranza generale dell'allume, la penetrazione cerebrale era estremamente bassa in condizioni normali.

Tuttavia, la traslocazione cerebrale risultava aumentata in modo significativo nei casi di alterazione della BEE o dopo un aumento sistemico e/o cerebrale dai segnali del MCP-1/CCL2 (5). L'espressione di questa chemochina è soggetta a significative variazioni interindividuali collegate all'età, il sesso, la genetica e fattori ambientali. Abbiamo identificato un aumento selettivo della circolazione di MCP-1/CCL2 in pazienti CFS/ME con MMF (45). Il disequilibrio tra un enorme numero di individui vaccinati e il relativo basso numero di casi di MMF suggerisce un coinvolgimento cruciale di fattori di suscettibilità individuale nell'intolleranza all'allume. La produzione geneticamente guidata di MCP-1/CCL2 potrebbe rappresentare uno di questi fattori (5).

Perciò l'allume ed altri materiali poco biodegradabili assunti alla periferia dai fagociti si diffondono nella circolazione linfatica e sanguigna e possono penetrare nel cervello utilizzando un meccanismo tipo cavallo di Troia, simile a quello utilizzato dalle particelle infettive (68,69). Precedenti esperimenti avevano mostrato che la somministrazione di allume può causare disfunzioni e danni



a carico del SNC (70-72), mettendo in dubbio gli esatti livelli di sicurezza dell'alluminio (73).

## IL CONCETTO DI ASIA

Molte malattie del SNC risultano con tutta probabilità da un'interazione gene-ambiente. Alcune di loro, come la ME/SFC idiopatica e la sclerosi multipla (SM), sono state già associate con sovraccarico di alluminio. E' stato anche riportato un aumento del rischio di sviluppare SM nel lungo termine dopo la somministrazione di vaccini contenenti allume (76,77) e rimane soggetto di un dibattito feroce.

Nello specifico, circa il 10% dei nostri pazienti con MMF avevano in concomitanza malattie SM-simili (78), un aggiuntivo 5-10% aveva un'altra malattia autoimmune, come la tiroidite e una miopatia infiammatoria diffusa, e il resto dei pazienti occasionalmente avevano bassi titoli di vari auto anticorpi (46).

Yehuda Shoenfeld aveva delineato la "sindrome autoimmune (autoinfiammatoria) indotta da adiuvanti" (ASIA) (79) riconoscendo che varie combinazioni di (i) malattie autoimmuni specifiche identificate da criteri ben specifici, (ii) sintomi meno specifici, come mialgie, artralgia, fatica cronica, deterioramento cognitivo (la combinazione delle quali definisce ME/CFS); (iii) la comparsa di autoanticorpi circolanti, possono verificarsi dopo l'esposizione ad una varietà di prodotti chimici o naturali con proprietà adiuvanti immunologiche. La discussione sull'ASIA è molto utile poiché potrebbe alertare i medici, quando incontrano i sintomi sopra citati, per verificare le vaccinazioni precedenti, e potrebbe aiutarli a dare un nome a condizioni di questo tipo.

I sintomi associati alla MMF sono sorprendentemente simili a quelli descritti come la sindrome della guerra del Golfo (GWS), una condizione fortemente associata alle somministrazioni di vaccinazioni multiple ai soldati (80,81), specialmente il vaccino dell'antrace che contiene allume, capace di indurre MMF (82), e probabilmente squalene (83). Per questi motivi, abbiamo proposto di delineare una sindrome da adiuvante del vaccino (84). Yehuda Shoenfeld ha ragionato in modo simile ma ha aggiunto al GWS e MMF, la sua personale esperienza con la siliconosi, una malattia complessa osservata in pazienti con protesi mammarie di silicone mammarie che perdono, attribuita a deleteria azione adiuvante delle particelle di silicone (85,86).

In tal modo, ha allargato la relazione causale ad ogni composto con proprietà adiuvanti.

I criteri diagnostici maggiori e minori dell'ASIA hanno ancora bisogno di una validazione internazionale ma il concetto di ASIA ha già catturato l'attenzione della comunità medica umana e veterinaria, evidenziando un bisogno nel settore (87,88).

## DEVE ESSERE FATTO ANCORA MOLTO PER COMPRENDERE COME IN CERTI INDIVIDUI I VACCINI CONTENENTI ALLUME POTREBBERO DIVENTARE INSIDIOSAMENTE NON SICURI

L'allume è stato utilizzato per decenni a livelli considerati come un compromesso accettabile tra il suo ruolo di adiuvante ed i suoi effetti tossici dall'industria e dalle agenzie di regolamentazione.

Tuttavia, la storia della MMF rivela diverse lacune nella conoscenza delle particelle di alluminio, incluso il loro esatto meccanismo di azione, il loro destino dopo l'iniezione, la loro disseminazione sistemica e la loro sicurezza nel lungo termine. Sono stati fatti degli sforzi negli ultimi anni per sviluppare nuovi adiuvanti, ma i tentativi di esaminare seriamente i problemi di sicurezza sollevati dal carattere bio-persistente e l'accumulo cerebrale di particelle di allume non sono stati fatti.

Le principali domande che dovrebbero essere affrontate in merito ai problemi di sicurezza dell'allume sono elencate nella **Tabella 1**.

E' importante guardare i fattori di suscettibilità genetica che potrebbero spiegare perché un dato individuo apparirà intollerante ai vaccini contenenti allume, mentre la vasta maggioranza degli individui vaccinati con gli stessi vaccini rimane sana. Alcuni pazienti con MMF appartengono al gruppo HLA-DRB1\*01, il quale è associato a un rischio aumentato di sviluppare malattie autoimmuni (89).

Anche i fattori genetici che influenzano la biodistribuzione dell'allume sono stati investigati. In linea con le prove sperimentali che il segnale chemochina CCL2/MCP-1 regola la traslocazione cerebrale delle particelle fagocitate (5), e che i livelli sierici di CCL2/MCP-1 sono selettivamente aumentati nei pazienti con MMF (45), la genotipizzazione di 252 pazienti sintomatici per MMF e 516 controlli sani per 4 polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) localizzati nel gene CCL2 ha mostrato che l'aplotipo AG della SNP rs3760396C (G927G>C) era associato con un lieve aumento del rischio di malattia. (5). E' interessante notare che l'allele rs3760396 C è associato con un livello più alto dell'espressione di CCL2 *in vitro* come valutato tramite transfezione (90).

Questi risultati preliminari meritano ulteriori indagini. Un altro asse di ricerca consiste nei tentativi di scoprire se sottili difetti geneticamente determinati nel macchinario cellulare utilizzato per eliminare le particelle, cioè l'autofagia (91), potrebbe contribuire alla biopersistenza di lunga data delle particelle di allume, come precedentemente riportato per spiegare la persistenza intracellulare dei patogeni intestinali nella malattia di Crohn (92). Le cellule che fanno fronte ai microbi utilizzano una forma dedicata di autofagia chiamata "xenofagia" come meccanismo di difesa dell'ospitante per inghiottire e degradare i patogeni intracellulari.

Lo stesso vale per le particelle inerti sottoposte a fagocitosi / endocitosi (93).

Come menzionato sopra, le particelle di cristallo sono probabilmente tossiche per le membrane, che possono destabilizzare i fagosomi e lisosomi, innescare il montaggio

dell'infiammosoma, ed ostacolare le vie autofagiche (32-35, 39).

**Tabella 1 | Principali questioni irrisolte legate agli effetti tossici degli adiuvanti di alluminio**

#### WHAT IS THE MOST TOXIC

Tossicità del Metallo Al<sup>3+</sup> (o allergie al Al)

Tossicità delle particelle dovuto a nanoparticelle elementari, per es. la tossicità mitocondriale, o gli agglomerati micronici che esse formano, per es. effetti proinfiammatori

Reazioni immunitarie contro biomolecole persistenti adsorbite sull'allume e protette dalla degradazione fino alla completa solubilizzazione delle particelle (antigeni vaccinali o vaccine antigen o tracce residue di sequenze di DNA collegate alla produzione, o persino auto-antigeni adsorbiti su allume al momento della necrosi muscolare indotta dall'iniezione)

#### QUALI FATTORI CONTRIBUISCONO ALLA BIOPERSISTENZA?

La quantità somministrata

Molecole adsorbite che impediscono la solubilizzazione extracellulare e / o favoriscono la fagocitosi delle particelle di allume

Struttura cristallina dell' adiuvante che danneggia il doppio strato lipidico (ad es. Lisosomi)

#### QUALI FATTORI CONTRIBUISCONO ALLA TRASLOCAZIONE CEREBRALE?

Il trasporto degli ioni Al<sup>3+</sup> da parte della transferrina (i recettori presenti nel SNC aumentano con il deficit di ferro)

Danni diretti alla BEE da parte delle particelle di allume (la proporzione e la cinetica nella circolazione sono sconosciute)

Trasporto delle cellule Monocita delle particelle (il meccanismo del Cavallo di Troia MCP1/CCL2-dipendente è aumentato in caso di alterazioni della BEE e/o neuro-infiammazione)

#### QUALI SONO I FATTORI DI SUSCETTIBILITA'?

L'Ambiente individuale (altre esposizioni ad Al, esposizione ad altri metalli, esposizione ad altre particelle, infezioni virali croniche)

Età di immunizzazione, inclusa la precoce età (basso peso corporea, BEE immature, stadi precoci del neuro-sviluppo) ed età avanzata ( aumento della produzione di MCP-1/CCL2 debolezza progressiva della BEE, processi neuropatologici nascosti)

Fattori genetici che influiscono o sulla risposta immunologica (per es genotipo HLA) o sulla persistenza intracellulare di particelle (geni della xeno/autophagia), o sulla neuro-migrazione (chimiocine o altri geni dell'infiammazione)

Tuttavia, le particelle di cristallo invece di uccidere i macrofagi promuovono la loro sopravvivenza (17). Pertanto, i macrofagi percepiranno continuamente così le particelle estranee nel loro citosol, proprio come gli organelli o i batteri senescenti, e probabilmente ripeteranno il processo autofagico fino a quando non disporranno di materiali alieni. Il processo include la

compartimentalizzazione delle particelle all'interno di autofagosomi a doppia membrana e successiva fusione con lisosomi riparati e riacidificati, esponendo le particelle di allume antigene–legate al pH acido lisosomiale, l'unico agente che può solubilizzare i cristalli di allume e alle idrolasi acide che degraderanno l'antigene. Il processo coinvolge una via conservata in cui le particelle guarnite da proteine ubiquitarie reclutano la proteina adattatore p62/SQSTM1 (sequestosome1), che indirizza il tutto all'autofagosoma attraverso il legame alla proteina di membrana autofagosomale LC3/Atg8 (94, 95). La formazione degli autofagosomi coinvolge anche altre molecole Atg, come il complesso ad alto peso molecolare (Atg12–Atg5–Atg16L), Atg7, e molti altri ed è regolata dalla IRGM (la M1immunità-correlata della famiglia GTPase). La membrana esterna dell'autofagosoma alla fine si fonde con i lisosomi. I geni di tutte le molecole della via autofagica sono soggetti a variazioni che sono attualmente vagliate nei pazienti con MMF.

#### RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro è stato beneficiato dal fondo per la ricerca da associazioni di pazienti : E3M(Entraide aux Malades de Myofasciite à Macrophages), “Neurodélivrance des particules injectées par voie intramusculaire et sécurité des adjuvants aluminiques,” Associazione Francese contro le Miopatie (AFM) “Etude des mécanismes de la myofasciite à macrophages,”and DwoSkin Foundation (Nano in brain); dalla Regione Ile-de-France attraverso un programma through PICRI (Partenariat Institutions-Citoyens pour la Recherche et l'Innovation) “Recherche de polymorphismes dans les gènes codant pour des facteurs inflammatoires (chimiocines) dans la myofasciite à macrophages” e dalla ANSM, procedure hors appel d'offre “Biopersistenza e neuromigrazione degli adiuvanti di alluminio dei vaccini: fattori di rischio genetico e neurotossicità sperimentale.”

#### REFERENCES

1. Moxon ER, Siegrist CA. The next decade of vaccines: societal and scientific challenges. *Lancet* (2011) **378**:348–59. doi:10.1016/S0140-6736(11)60407-8
2. Agmon-Levin N, Paz Z, Israeli E, Shoenfeld Y. Vaccines and autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol* (2009) **5**(11):648–52. doi:10.1038/nrrheum.2009.196
3. Gherardi RK, Coquet M, Chérin P, Authier FJ, Laforêt P, Bélec L, et al. Macrophagic myofasciitis: an emerging entity. *Lancet* (1998) **352**(9125):347–52. doi:10.1016/S0140-6736(98)02326-5
4. Gherardi RK, Coquet M, Chérin P, Bélec L, Moretto P, Dreyfus PA, et al. Macrophagic myofasciitis lesions assess long-term persistence of vaccinated-derived aluminum hydroxide in muscle. *Brain* (2001) **124**:1821–31. doi:10.1093/brain/124.9.1821
5. Khan Z, Combadiere C, Authier FJ, Itier V, Lux F, Exley C, et al. Slow CCL2-dependent translocation of biopersistent particles from muscle to brain. *BMC Med* (2013) **11**:99. doi:10.1186/1741-7015-11-99
6. Glenny A, Pope C, Waddington H, Wallace U. Immunological notes. XVII. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. *J Pathol Bacteriol* (1926) **26**:38–9.

7. Lu F, Boutselis I, Borch RF, Hogenesch H. Control of antigen-binding to aluminum adjuvants and the immune response with a novel phosphonate linker. *Vaccine* (2013) **13**:946–8. doi:10.1016/j.vaccine.2013.07.019
8. Lu F, Hogenesch H. Kinetics of the inflammatory response following intramuscular injection of aluminum adjuvant. *Vaccine* (2013) **31**(37):3979–86. doi:10.1016/j.vaccine.2013.05.107
9. Brigitte M, Schilte C, Plonquet A, Baba-Amer Y, Henri A, Charlier C, et al. Muscle resident macrophages control the immune cell reaction in a mouse model of notexin-induced myoinjury. *Arthritis Rheum* (2010) **62**:268–79. doi:10.1002/art.27183
10. Liao H, Franck E, Fréret M, Adriouch S, Baba-Amer Y, Authier FJ, et al. Myoinjury transiently activates muscle antigen-specific CD8+ T cells in lymph nodes in a mouse model. *Arthritis Rheum* (2012) **64**(10):3441–51. doi:10.1002/art.34551
11. Kool M, Soullié T, van Nimwegen M, Willart MA, Muskens F, Jung S, et al. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med* (2008) **205**:869–82. doi:10.1084/jem.20071087
12. Wang HB, Weller PF. Pivotal advance: eosinophils mediate early alum adjuvant-elicited B cell priming and IgM production. *J Leukoc Biol* (2008) **83**:817–21. doi:10.1189/jlb.0607392
13. Flarend RE, Hem SL, White JL, Elmore D, Suckow MA, Rudy AC, et al. In vivo absorption of aluminum-containing vaccine adjuvants using <sup>26</sup>Al. *Vaccine* (1997) **15**:1314–8. doi:10.1016/S0264-410X(97)00041-8
14. Shi Y, Hogenesch H, Hem SL. Change in the degree of adsorption of proteins by aluminum-containing adjuvants following exposure to interstitial fluid: freshly prepared and aged model vaccines. *Vaccine* (2001) **20**:80–5. doi:10.1016/S0264-410X(01)00313-9
15. Morefield GL, Sokolovska A, Jiang D, Hogenesch H, Robinson JP, Hem SL. Role of aluminum-containing adjuvants in antigen internalization by dendritic cells in vitro. *Vaccine* (2005) **23**:1588–95. doi:10.1016/j.vaccine.2004.07.050
16. Ghimire TR, Benson RA, Garside P, Brewer JM. Alum increases antigen uptake, reduces antigen degradation and sustains antigen presentation by DCs in vitro. *Immunol Lett* (2012) **147**(1–2):55–62. doi:10.1016/j.imlet.2012.06.002
17. Hamilton JA, Byrne R, Whitty G. Particulate adjuvants can induce macrophage survival, DNA synthesis, and a synergistic, proliferative response to GM-CSF and CSF-1. *J Leukoc Biol* (2000) **67**:226–32.
18. Verdier F, Burnett R, Michelet-Habchi C, Moretto P, Fievet-Groynne F, Sauzeat E. Aluminum assay and evaluation of the local reaction at several time points after intramuscular administration of aluminum-containing vaccines in the *Cynomolgus* monkey. *Vaccine* (2005) **23**:1359–67. doi:10.1016/j.vaccine.2004.09.012
19. Authier FJ, Sauvat S, Christov C, Chariot P, Raisbeck G, Poron MF, et al. AIOH3-adjuvanted vaccine-induced macrophagic myofasciitis in rats is influenced by the genetic background. *Neuromuscul Disord* (2006) **16**:347–52. doi:10.1016/j.nmd.2006.02.004
20. Hutchison S, Benson RA, Gibson VB, Pollock AH, Garside P, Brewer JM. Antigen depot is not required for alum adjuvanticity. *FASEB J* (2012) **26**:1272–9. doi:10.1096/fj.11-184556
21. Exley C, Swarbrick L, Gherardi RK, Authier FJ. A role for the body burden of aluminum in vaccine-associated macrophagic myofasciitis and chronic fatigue syndrome. *Med Hypotheses* (2009) **72**:135–9. doi:10.1016/j.mehy.2008.09.040
22. Exley C, Siesjö P, Eriksson H. The immunobiology of aluminum adjuvants: how do they really work? *Trends Immunol* (2010) **31**:103–9. doi:10.1016/j.it.2009.12.009
23. Ulanova M, Tarkowski A, Hahn-Zoric M, Hanson LA. The common vaccine adjuvant aluminum hydroxide up-regulates accessory properties of human monocytes via an interleukin-4-dependent mechanism. *Infect Immun* (2001) **69**:1151–9. doi:10.1128/IAI.69.2.1151-1159.2001
24. McKee AS, Munks MW, MacLeod MK, Fleenor CJ, Van Rooijen N, Kappler JW, et al. Alum induces innate immune responses through macrophage and mast cell sensors, but these sensors are not required for alum to act as an adjuvant for specific immunity. *J Immunol* (2009) **183**:4403–14. doi:10.4049/jimmunol.0900164
25. Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminum adjuvants. *Nature* (2008) **453**:1122–6. doi:10.1038/nature06939
26. Li H, Willingham SB, Ting JP, Re F. Cutting edge. Inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *J Immunol* (2008) **181**:17–21. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02774.x
27. Franchi L, Nunez G. The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminum hydroxide-mediated IL-1 $\beta$  secretion but dispensable for adjuvant activity. *Eur J Immunol* (2008) **38**:2085–9. doi:10.1002/eji.200838549
28. Spreafico R, Ricciardi-Castagnoli P, Mortellaro A. The controversial relationship between NLRP3, alum, danger signals and the next generation adjuvants. *Eur J Immunol* (2010) **40**:638–42. doi:10.1002/eji.200940039
29. Kool M, Petrilli V, De Smedt T, Rolaz A, Hammad H, van Nimwegen M, et al. Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J Immunol* (2008) **181**:3755–9. doi:10.4049/jimmunol.181.6.3755
30. Marichal T, Ohata K, Bedoret D, Mesnil C, Sabatel C, Kobiyama K, et al. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nat Med* (2011) **17**:996–1002. doi:10.1038/nm.2403
31. Kuroda E, Ishii KJ, Uematsu S, Ohata K, Coban C, Akira S, et al. Silica crystals and aluminum salts regulate the production of prostaglandin in macrophages via NALP3 inflammasome-independent mechanisms. *Immunity* (2011) **34**(4):514–26. doi:10.1016/j.immuni.2011.03.019
32. Shi Y. To forge a solid immune recognition. *Protein Cell* (2012) **3**:564–70. doi:10.1007/s13238-012-2933-5
33. Flach TL, Ng G, Hari A, Desrosiers MD, Zhang P, Ward SM, et al. Alum interaction with dendritic cell membrane lipids is essential for its adjuvanticity. *Nat Med* (2011) **17**:479–87. doi:10.1038/nm.2306
34. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* (2008) **9**:847–56. doi:10.1038/ni.1631
35. Lima H Jr, Jacobson LS, Goldberg MF, Chandran K, Diaz-Griffero F, Lisanti MP, et al. Role of lysosome rupture in controlling Nlrp3 signaling and necrotic cell death. *Cell Cycle* (2013) **12**(12):1868–78. doi:10.4161/cc.24903
36. Trombetta ES, Ebersold M, Garrett W, Pypaert M, Mellman I. Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science* (2003) **299**:1400–3. doi:10.1126/science.1080106
37. Delamarre L, Couture R, Mellman I, Trombetta ES. Enhancing immunogenicity by limiting susceptibility to lysosomal proteolysis. *J Exp Med* (2006) **203**:2049–55. doi:10.1084/jem.20052442
38. Shin JS, Ebersold M, Pypaert M, Delamarre L, Hartley A, Mellman I. Surface expression of MHC class II in dendritic cells is controlled by regulated ubiquitination. *Nature* (2006) **444**:115–8. doi:10.1038/nature05261
39. Kang SJ, Locksley RM. The inflammasome and alum-mediated adjuvanticity. *F1000 Biol Rep* (2009) **1**:15. doi:10.3410/B1-15
40. Bassez G, Authier FJ, Lechapt-Zalcman E, Delfau-Larue MH, Plonquet A, Coquet M, et al. Inflammatory myopathy with abundant macrophages (IMAM): a condition distinct from macrophagic myofasciitis, sharing similarities with cytophagic histiocytic panniculitis. *J Neuropathol Exp Neurol* (2003) **62**:464–74. 41. Maubec E, Pinquier L, Viguier M, Caux F, Amsler E, Aractingi S, et al. Vaccination-induced cutaneous pseudolymphoma. *J Am Acad Dermatol* (2005) **52**(4):623–9. doi:10.1016/j.jaad.2004.12.021
42. Madewell BR, Griffey SM, McEntee MC, Leppert VJ, Munn RJ. Feline vaccine-associated fibrosarcoma: an ultrastructural study of 20 tumors (1996–1999). *Vet Pathol* (2001) **38**(2):196–202. doi:10.1354/vp.38-2-196
43. Raganathan-Thangarajah N, Le Beller C, Boutouyrie P, Bassez G, Laurent S, Authier FJ. Distinctive clinical features in arthralgic patients with and without aluminum hydroxide-induced macrophagic myofasciitis: an exploratory study. *J Inorg Biochem* (2013) **128**:262–6. doi:10.1016/j.jinorgbio.2013.07.020
44. Papo T. Macrophagic myofasciitis: focal or systemic? *Joint Bone Spine* (2003) **70**:242–5. doi:10.1016/S1297-319X(03)00093-9

45. Cadusseau J, Ragunathan-Thangarajah N, Surenaud M, Hue S, Authier FJ, Gherardi RK. Selective elevation of circulating CCL2/MCP1 levels in patients with longstanding post-vaccinal macrophagic myofasciitis and ASIA. *Curr Med Chem* (2014) **21**:511–7. doi:10.2174/09298673113206660287
46. Gherardi RK, Authier FJ. Aluminum inclusion macrophagic myofasciitis: a recently identified condition. *Immunol Allergy Clin North Am* (2003) **23**:699–712. doi:10.1016/S0889-8561(03)00095-X
47. World Health Organization Vaccine Safety Advisory Committee. Macrophagic myofasciitis and aluminum-containing vaccines. *Wkly Epidemiol Rec* (1999) **74**:338–40.
48. Santiago T, Rebelo O, Negrão L, Matos A. Macrophagic myofasciitis and vaccination: consequence or coincidence? *Rheumatol Int* (2015) **35**(1):189–92. doi:10.1007/s00296-014-3065-4
49. Authier FJ, Sauvats S, Champey J, Drogou I, Coquet M, Gherardi R. Chronic fatigue syndrome in patients with macrophagic myofasciitis. *Arthritis Rheum* (2003) **48**:569–70. doi:10.1002/art.10740
50. Couette M, Boisse MF, Maisson P, Brugieres P, Cesaro P, Chevalier X, et al. Long-term persistence of vaccine-derived aluminum hydroxide is associated with chronic cognitive dysfunction. *J Inorg Biochem* (2009) **103**:1571–8. doi:10.1016/j.jinorgbio.2009.08.005
51. Passeri E, Villa C, Couette M, Itti E, Brugieres P, Cesaro P, et al. Long-term follow-up of cognitive dysfunction in patients with aluminum hydroxide induced macrophagic myofasciitis (MMF). *J Inorg Biochem* (2011) **105**:1457–63. doi:10.1016/j.jinorgbio.2011.08.006
52. Jason A, Benton C, Valentine L, Johnson A, Torres-Harding S. The economic impact of ME/CFS: individual and societal costs. *Dyn Med* (2007) **7**:6. doi:10.1186/1476-5918-7-6
53. Hickie I, Davenport T, Wakefield D, Vollmer-Conna U, Cameron B, Vernon SD, et al. Post-infective and chronic fatigue syndromes precipitated by viral and non-viral pathogens: prospective cohort study. *BMJ* (2006) **333**(7568):575. doi:10.1136/bmj.38933.585764.AE
54. Landay AL, Jessop C, Lennette ET, Levy JA. Chronic fatigue syndrome: clinical condition associated with immune activation. *Lancet* (1991) **338**:707–12. doi:10.1016/0140-6736(91)91440-6
55. Chang CM, Warren JL, Engels EA. Chronic fatigue syndrome and subsequent risk of cancer among elderly US adults. *Cancer* (2012) **118**(23):5929–36. doi:10.1002/cncr.27612
56. Tomljenovic L. Aluminum and Alzheimer's disease: after a century of controversy, is there a plausible link? *J Alzheimer Dis* (2011) **23**:567–98. doi:10.3233/JAD-2010-101494
57. Rosenblum H, Shoenfeld Y, Amital H. The common immunogenic etiology of chronic fatigue syndrome: from infections to vaccines via adjuvants to the ASIA syndrome. *Infect Dis Clin North Am* (2011) **25**(4):851–63. doi:10.1016/j.idc.2011.07.012
58. Lee SH. Detection of human papillomavirus (HPV) L1 gene DNA possibly bound to particulate aluminum adjuvant in the HPV vaccine Gardasil. *J Inorg Biochem* (2012) **117**:85–92. doi:10.1016/j.jinorgbio.2012.08.015
59. Offit PA, Jew RK. Addressing parents' concerns: do vaccines contain harmful preservatives, adjuvants, additives, or residuals? *Pediatrics* (2003) **112**(6):1394–7. doi:10.1542/peds.112.6.1394
60. Rinaldi M, Perricone R, Blank M, Perricone C, Shoenfeld Y. Anti-*Saccharomyces cerevisiae* autoantibodies in autoimmune diseases: from bread baking to autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol* (2013) **45**(2):152–61. doi:10.1007/s12016-012-8344-9
61. Lopez S, Pelaez A, Navarro LA, Montesinos E, Morales C, Carda C. Aluminum allergy in patients hyposensitized with aluminum-precipitated antigen extracts. *Contact Dermatitis* (1994) **31**:37–40. doi:10.1111/j.1600-0536.1994.tb01903.x
62. Bergfors E, Björkelund C, Trollfors B. Nineteen cases of persistent pruritic nodules and contact allergy to aluminum after injection of commonly used aluminum-adsorbed vaccines. *Eur J Pediatr* (2005) **164**(11):691–7. doi:10.1007/s00431-005-1704-1
63. Falta MT, Pinilla C, Mack DG, Tinega AN, Crawford F, Giulianotti M, et al. Identification of beryllium-dependent peptides recognized by CD4+ T cells in chronic beryllium disease. *J Exp Med* (2013) **210**(7):1403–18. doi:10.1084/jem.20122426
64. Wen GY, Wisniewski HM. Histochemical localization of aluminum in the rabbit CNS. *Acta Neuropathol* (1985) **68**:175–84. doi:10.1007/BF00690191
65. Redhead K, Quinlan GJ, Das RG, Gutteridge JM. Aluminum-adjuvanted vaccines transiently increase aluminum levels in murine brain tissue. *Pharmacol Toxicol* (1992) **70**:278–80. doi:10.1111/j.1600-0773.1992.tb00471.x
66. Sahin G, Varol I, Temizer A, Benli K, Demirdamar R, Duru S. Determination of aluminum levels in the kidney, liver, and brain of mice treated with aluminum hydroxide. *Biol Trace Elem Res* (1994) **41**:129–35. doi:10.1007/BF02917223
67. Wang XY, Yao X, Wan YM, Wang B, Xu JQ, Wen YM. Responses to multiple injections with alum alone compared to injections with alum adsorbed to proteins in mice. *Immunol Lett* (2012) **149**:88–92. doi:10.1016/j.imlet.2012.11.005
68. Drevets DA, Dillon MJ, Schawang JS, Van Rooijen N, Ehrchen J, Sunderkotter C, et al. The Ly-6C<sup>high</sup> monocyte subpopulation transports *Listeria monocytogenes* into the brain during systemic infection of mice. *J Immunol* (2004) **172**:4418–24. doi:10.4049/jimmunol.172.7.4418
69. Eugenin EA, Osiecki K, Lopez L, Goldstein H, Calderon TM, Berman JW. CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 mediates enhanced transmigration of human immunodeficiency virus (HIV)-infected leukocytes across the blood-brain barrier: a potential mechanism of HIV-CNS invasion and NeuroAIDS. *J Neurosci* (2006) **26**:1098–106. doi:10.1523/JNEUROSCI.3863-05.2006
70. Petrik MS, Wong MC, Tabata RC, Garry RF, Shaw CA. Aluminum adjuvant linked to Gulf war illness induces motor neuron death in mice. *Neuromolecular Med* (2007) **9**(1):83–100. doi:10.1385/NMM:9:1:83
71. Shaw CA, Petrik MS. Aluminum hydroxide injections lead to motor deficits and motor neuron degeneration. *J Inorg Biochem* (2009) **103**:1555–62. doi:10.1016/j.jinorgbio.2009.05.019
72. Shaw CA, Li Y, Tomljenovic L. Administration of aluminum to neonatal mice in vaccine-relevant amounts is associated with adverse long term neurological outcomes. *J Inorg Biochem* (2013) **128**:237–44. doi:10.1016/j.jinorgbio.2013.07.022
73. Tomljenovic L, Shaw CA. Aluminum vaccine adjuvants: are they safe? *Curr Med Chem* (2011) **18**:2630–7. doi:10.2174/092986711795933740
74. van Rensburg SJ, Potocnik FC, Kiss T, Hugo F, van Zijl P, Mansvelt E, et al. Serum concentrations of some metals and steroids in patients with chronic fatigue syndrome with reference to neurological and cognitive abnormalities. *Brain Res Bull* (2001) **55**(2):319–25. doi:10.1016/S0361-9230(01)00478-6
75. Exley C, Mamutse G, Korchazhkina O, Pye E, Strekopytov S, Polwart A, et al. Elevated urinary excretion of aluminum and iron in multiple sclerosis. *Mult Scler* (2006) **12**(5):533–40. doi:10.1177/1352458506071323
76. Hernán MA, Jick SS, Olek MJ, Jick H. Recombinant hepatitis B vaccine and the risk of multiple sclerosis: a prospective study. *Neurology* (2004) **63**(5):838–42. doi:10.1212/01.WNL.0000138433.61870.82
77. Mikaeloff Y, Caridade G, Suissa S, Tardieu M. Hepatitis B vaccine and the risk of CNS inflammatory demyelination in childhood. *Neurology* (2009) **72**(10):873–80. doi:10.1212/01.wnl.0000335762.42177.07
78. Authier FJ, Cherin P, Creange A, Bonnotte B, Ferrer X, Abdelmoumni A, et al. Central nervous system disease in patients with macrophagic myofasciitis. *Brain* (2001) **124**(5):974–83. doi:10.1093/brain/124.5.974
79. Shoenfeld Y, Agmon-Levin N. 'ASIA' – autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants. *J Autoimmun* (2011) **36**(1):4–8. doi:10.1016/j.jaut.2010.07.003
80. Hotopf M, David A, Hull L, Ismail K, Unwin C, Wessely S. Role of vaccinations as risk factors for ill health in veterans of the Gulf war: cross sectional study. *BMJ* (2000) **320**:1363–7. doi:10.1136/bmj.320.7246.1363
81. Cherry N, Creed F, Silman A, Dunn G, Baxter D, Smedley J, et al. Health and exposures of United Kingdom Gulf war veterans. Part II: the relation of



- health to exposure. *Occup Environ Med* (2001) **58**:299–306. doi:10.1136/oem.58.5.299
82. Theeler BJ, Simper NB, Ney JP. Polyglandular autoimmunity with macrophagic myofasciitis. *Clin Rheumatol* (2008) **27**(5):667–9. doi:10.1007/s10067-007-0793-9
83. Asa PB, Cao Y, Garry RF. Antibodies to squalene in Gulf war syndrome. *Exp Mol Pathol* (2000) **68**(1):55–64. doi:10.1006/exmp.1999.2295
84. Gherardi RK. Lessons from macrophagic myofasciitis: towards definition of a vaccine adjuvant-related syndrome. *Rev Neurol (Paris)* (2003) **159**(2):162–4.
85. Miyoshi K, Miyamura T, Kobayashi Y, Itakura T, Nishijo K. Hypergammaglobulinemia by prolonged adjuvanticity in man disorders developed after augmentation mammoplasty. *Jpn Med J* (1964) **2122**:9–14.
86. Shoaib BO, Patten BM. Human adjuvant disease: presentation as a 414 multiple sclerosis-like syndrome. *South Med J* (1996) **89**:179–88. doi:10.1097/00007611-199602000-00005
87. Luján L, Pérez M, Salazar E, Álvarez N, Gimeno M, Pinczowski P, et al. Autoimmune/autoinflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA syndrome) in commercial sheep. *Immunol Res* (2013) **56**(2–3):317–24. doi:10.1007/s12026-013-8404-0
88. Vasey FB, Zarabadi SA, Seleznick M, Ricca L. Where there's smoke there's fire: the silicone breast implant controversy continues to flicker: a new disease that needs to be defined. *J Rheumatol* (2003) **30**(10):2092–4.
89. Guis S, Pellissier JF, Nicoli F, Reviron D, Mattei JP, Gherardi RK, et al. HLA-DRB1\*01 and macrophagic myofasciitis. *Arthritis Rheum* (2002) **46**:2535–7. doi:10.1002/art.10465
90. Nyquist P, Zhang J, De Graba TJ. The -928 G/C and -362 G/C single-nucleotide polymorphisms in the promoter of MCP1: increased transcriptional activity and novel binding sites. *Cerebrovasc Dis* (2010) **29**:242–7. doi:10.1159/000267849
91. Sridhar S, Botbol Y, Macian F, Cuervo AM. Autophagy and disease: always two sides to a problem. *J Pathol* (2012) **226**:255–73. doi:10.1002/path.3025
92. Brest P, Lapaquette P, Souidi M, Lebrigand K, Cesaro A, Vouret-Craviari V, et al. A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nat Genet* (2011) **43**(3):242–5. doi:10.1038/ng.762
93. Stern ST, Adiseshaiah PP, Crist RM. Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. *Part Fibre Toxicol* (2012) **9**:20. doi:10.1186/1743-8977-9-20
94. Zheng YT, Shahnazari S, Brech A, Lamark T, Johansen T, Brumell JH. The adaptor protein p62/SQSTM1 targets invading bacteria to the autophagy pathway. *J Immunol* (2009) **183**(9):5909–16. doi:10.4049/jimmunol.0900441
95. Lee HS, Daniels BH, Salas E, Bollen AW, Debnath J, Maregeta M. Clinical utility of LC3 and p62 immunohistochemistry in diagnosis of drug-induced autophagic vacuolar myopathies: a case-control study. *PLoS One* (2012) **7**(4):e36221. doi:10.1371/journal.pone.0036221

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 27 August 2014; paper pending published: 07 October 2014; accepted: 08 January 2015; published online: 05 February 2015.

Citation: Gherardi RK, Eidi H, Crépeaux G, Authier FJ and Cadusseau J (2015) Biopersistence and brain translocation of aluminum adjuvants of vaccines. *Front. Neurol.* **6**:4. doi: 10.3389/fneur.2015.00004

This article was submitted to *Neurodegeneration*, a section of the journal *Frontiers in Neurology*.

Copyright © 2015 Gherardi, Eidi, Crépeaux, Authier and Cadusseau. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic