

Revisión

ESTUDIO CITOGENÉTICO Y CITOMOLECULAR DE LA VACUNA CONTRA LA PESTE PORCINA CLÁSICA

CYTOGENETIC AND CYTOMOLECULAR STUDY OF VACCINE AGAINST CLASSIC SWINE FEVER

ROSA GENGHINI¹, IVÁN TIRANTI¹ Y ENRIQUE ZAMORANO-PONCE²

¹Laboratorio de Citogenética, Departamento de Producción Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba-Argentina.

²GENETOX, Laboratorio de Genética Toxicológica, Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias, Universidad del Bío-Bío, Chile. Casilla 447, Chillán-Chile

Correspondencia: Dra. Rosa N. GENGHINI, Genética, Oficina 66, Planta Baja, Facultad de Agronomía y Veterinaria Universidad Nacional de Río Cuarto 5800, Río Cuarto, Pcia. Cba. Argentina. Fax: 0358-4680280 Tel.: 0358-4676192. e-mail: rgenghini@ayv.unrc.edu.ar

RESUMEN

La Peste Porcina Clásica (PPC) es la enfermedad vírica de los cerdos más importante por ser muy contagiosa y causar altas tasas de morbilidad y mortalidad. El virus causal puede inducir mutaciones cromosómicas en los animales enfermos, como así también en los inmunizados con vacunas a virus vivo atenuado. Éstas fueron durante mucho tiempo un medio eficaz para el control de la enfermedad; sin embargo, en 1990 la Unión Europea prohibió la vacunación debido a la imposibilidad de distinguir serológicamente a los cerdos enfermos de los vacunados. En los países que aún controlan la PPC mediante la inmunización, es relevante el estudio del potencial mutagénico de estas vacunas. Dado que en Argentina no existían antecedentes en dicha temática, iniciamos en 1997 una línea de investigación en tal sentido. Se realizaron 5 tipos de ensayos: I) Empleando cerdos experimentales del Servicio Nacional de Sanidad Animal, pertenecientes a las pruebas oficiales de inocuidad y potencia de vacunas. II) Utilizando cerdos criados a campo en las condiciones en que los productores de cerdos inmunizan habitualmente a sus animales. III) Ensayos in vitro con sangre de lechones no vacunados. IV) Ensayos in vitro para medir daño directo sobre el ADN. V) Efecto de la vacuna sobre la fertilidad de cerdas preñadas. Todos los ensayos efectuados permitieron determinar que el virus vacunal de la PPC conserva su potencial genotóxico cuando se encuentra atenuado, efecto que se manifiesta tanto a nivel citogenético como citomolecular y que es fuertemente dependiente de la dosis del inmunógeno utilizado.

PALABRAS CLAVES: Peste Porcina Clásica, vacunas, capacidad mutagénica, efecto clastogénico.

ABSTRACT

Classic Swine Fever (CSF) is the most serious viral pig disease as it is highly contagious and produces high rates of mortality and morbidity. The causal virus can induce chromosomal mutations in diseased animals as well as in those inoculated with attenuated live virus vaccines. This kind of vaccine was used for quite an extended period of time until 1990, when its use was forbidden in the European Union due to the impossibility of discriminating serologically diseased animals from immunized ones. Nevertheless, in those countries where vaccination is still in general use to control CSF, it is pertinent to study the mutagenic outcome of that type of vaccine. This is the case for Argentina where there is a lack of previous information about its effects. Therefore, in 1997 we began to study the matter. We performed five different trials: I) With experimental pigs of the National Service of Animal Health, which were subjected to the official tests of innocuousness and potency. II) Using swine of farms routinely immunized. III) In vitro blood analysis of non-vaccinated piglets. IV) In vitro tests to measure direct damage on DNA. V) Effect of the vaccine on the fertility of pregnant sows. Results of these trials indicate that the attenuated live virus vaccine against CSF keeps its

genotoxic potentiality, which can be detected at the cytological and cytomolecular levels. Its effects are strongly dependent on the inoculation doses.

KEYWORDS: Classic Swine Fever, Vaccines, Mutagenic Ability, Clastogenic Effect.

Recepción: 29/03/05. Revisión: 02/05/05. Aprobación: 29/06/05

I. INTRODUCCIÓN

La Peste Porcina Clásica (PPC), también conocida como Cólera Porcino, es una enfermedad viral de los cerdos altamente contagiosa y con gran impacto económico en las explotaciones donde se presenta, debido a que produce alta tasa de morbilidad y mortalidad.

La PPC es sin lugar a dudas la enfermedad de mayor impacto para el comercio internacional de porcinos y sus productos derivados, ya que impide la exportación de carne a los países y/o regiones libres de la enfermedad.

Asimismo, representa el mayor desafío para los Servicios de Sanidad Animal de América Latina, porque, de acuerdo a la OIE (2000), el 50% de la población porcina del continente mantiene la PPC en forma endémica, a través de programas de control (vacunación), constituyéndose en un serio riesgo para los países libres de PPC.

El origen geográfico de la PPC es discutido, sin embargo, de acuerdo a Hanson (1957), el primer registro de una enfermedad de los cerdos que se correspondería con lo que ahora conocemos como PPC habría sido en USA (Tennessee) en 1810, informándose brotes posteriormente en Ohio en 1833. En Europa, la enfermedad apareció por primera vez en Inglaterra en 1862 y, a partir de allí, se habría diseminado por el continente (Fuchs, 1968, citado por Van Oirschot, 1992). Sin embargo, otros autores documentaron en Francia en 1822 una epizootia con las características de la PPC (Cole *et al.*, 1962, citado por Edwards *et al.*, 2000). En cualquier caso, las evidencias in-

dicarían que la enfermedad pudo haber sido introducida en América a través de cerdos procedentes de Europa y su diseminación habría sido facilitada por el desarrollo de medios de comunicación, como los ferrocarriles a mediados del siglo XIX (Edwards *et al.*, 2000). En Sudamérica, fue descrita por primera vez en 1899.

Aunque en la actualidad la PPC está diseminada en muchas partes del mundo, la erradicación fue exitosa en países de América del Norte, Australasia y el norte de Europa. La situación, en cambio, es incierta en la mayor parte de África.

II. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LA ENFERMEDAD

A continuación se resume la distribución geográfica de la PPC en distintas áreas del mundo:

a) América y Caribe

Canadá está libre de PPC desde 1963 y en Estados Unidos, el programa de erradicación comenzó en 1961, habiéndose registrado el último caso en 1976 y considerado libre de la enfermedad desde 1984 (Wise, 1986). El hecho de que no hayan ocurrido más brotes de PPC en estos países, se debe a la rigurosa política de control sanitaria aplicada tanto en la importación de cerdos como en la elaboración de productos cárnicos.

México posee áreas epidemiológicamente bien delimitadas, la parte norte está libre de la enfermedad sin vacunación, la parte central es un área de erradicación, donde la

vacunación fue prohibida y la parte sur se considera área de control, con infección endémica y vacunación para el control (OIE, 1999).

En cuanto a los países de América Central, sólo Panamá se considera libre, estando el resto endémicamente infectado con control mediante vacunación. Con respecto a las islas del Caribe, en Cuba se produjeron grandes pérdidas económicas (Díaz de Arce *et al.*, 1999; Edwards *et al.*, 2000) entre 1993 y 1997 cuando se presentó una importante epizootia luego de 20 años de vacunar regularmente con una vacuna a virus vivo atenuado. A partir de ese momento no hubo nuevos casos. En Haití, la PPC es reciente, registrándose en 1996 el primer caso (Edwards *et al.*, 2000).

Según la OIE (1999), la PPC permanece como enzootia en la mayor parte de América del Sur, con la excepción de Uruguay y Chile. No se registra en Uruguay desde 1991 y el país está oficialmente libre. Chile erradicó la PPC en abril de 1998, después de 17 años de aplicar programas de control sanitario (Pinto y Urcelay, 2003) y se declaró libre sin vacunación, habiéndose registrado el último caso en agosto de 1996 y prohibiéndose la vacunación a partir de 1997.

De acuerdo con la OIE (2000) se están implementando programas de control de PPC en Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador y Paraguay. Las medidas adoptadas incluyen vacunación, control de laboratorio, aniquilación masal, cuarentena, control de tránsito y restricciones a la importación. Los países que integran el Mercosur están en proceso de levantar barreras comerciales, por lo que se espera que aumenten los esfuerzos conjuntos tendientes a erradicar la PPC (Edwards *et al.*, 2000).

b) Europa

Con respecto a los países de la Unión Europea (UE), aunque los planes de erradicación

de la PPC comenzaron en 1980, la enfermedad no pudo erradicarse completamente, ya que en los últimos años se produjeron focos en países que eran considerados libres de la enfermedad, tales como: Holanda, Bélgica, Italia y España (Terpstra y De Smit, 2000; De Smit *et al.*, 2000; Edwards *et al.*, 2000; Stegeman *et al.*, 2000; Biagetti *et al.*, 2001). Uno de principales factores que contribuye a que el virus de la PPC permanezca endémico, es la persistencia de la enfermedad en poblaciones de suinos salvajes que actúan como reservorios del virus (Laddomada, 2000).

La UE mantiene una política de no vacunación contra la PPC y los brotes de la enfermedad se controlan mediante el sacrificio de todos los cerdos enfermos (“stamping out”) y de aquellos sospechosos de estarlo, lo que lleva a grandes pérdidas económicas (Edwards, 2000).

En los países de Europa Central y Oriental, los intentos para controlar y erradicar la PPC varían considerablemente (Edwards *et al.*, 2000). Algunos, como República Checa y Hungría están adoptando los estándares requeridos por la Unión Europea, con miras a facilitar el comercio internacional, mientras que otros están muy lejos de este punto.

c) Japón y sudeste de Asia

En Japón, el primer brote de PPC se registró en 1888 (Kumagai *et al.*, 1958). Durante muchos años la enfermedad se controló mediante el empleo de vacunas inactivadas, pero debido a su baja potencia fueron reemplazadas a partir de 1969 por vacunas a virus vivo atenuado. En 1996 se inició un programa de erradicación de la PPC, sin que se hayan registrado nuevos focos (Edwards *et al.*, 2000).

En los países del sudeste asiático ocurren regularmente brotes de PPC, siendo Indonesia, Malasia, Filipinas, Taiwan y Vietnam los países más afectados (Edwards *et al.*, 2000).

Considerando que la PPC es un serio problema para el sector porcino por las devastadoras pérdidas económicas que ocasiona y por la epizootia que origina su mecanismo de diseminación, la Organización Internacional de Epizootias (OIE, 1998) definió los siguientes requerimientos para que un país pueda considerarse libre de PPC:

- Ausencia de la enfermedad al menos por dos años.
- Debe transcurrir un año después de haberse sacrificado al último animal afectado, en aquellos países que apliquen el sacrificio sanitario asociado a la vacunación.
- Deben transcurrir seis meses después del sacrificio del último animal afectado, en aquellos países que apliquen únicamente el sacrificio sanitario ante la presencia de focos de PPC.

III. AGENTE ETIOLÓGICO

La PPC es producida por un pequeño virus (12.284 nucleótidos) endoteliotrófico, miembro del género *Pestivirus* de la familia *Flaviviridae* (Wengler, 1991). La naturaleza viral de la PPC fue revelada a principios del siglo XX cuando Schweinitz y Dorset (1904) informaron que la enfermedad podía transmitirse a través de fluidos que habían sido extraídos del cuerpo de cerdos enfermos y filtrados a través de “finísimos filtros de porcelana”.

El genoma del virus de la PPC consiste de una única cadena de ARN de aproximadamente 12.5 kb y polaridad positiva, cuyos extremos 3' y 5' contienen regiones no codificantes de 373 y 228 bases, respectivamente (Meyers *et al.*, 1989, Moormann *et al.*, 1990). El genoma completo fue secuenciado y en varios laboratorios se produjo el ácido desoxiribonucleico complementario infeccioso (ADNc) (Meyers y Thiel, 1996; Moormann *et al.*, 1996; Björklund *et al.*,

1998; Liu *et al.*, 1998, Wong *et al.*, 1998; Díaz de Arce *et al.*, 1999; Paton *et al.*, 2000).

Las partículas virales tienen de 40 a 60 nm de diámetro, son esféricas, están envueltas por una cubierta glicoproteica y contienen una estructura central electrónicamente densa con un diámetro de 30 nm (Moennig, 2000).

El genoma viral actúa como ARN mensajero con una fase de lectura abierta que codifica una poliproteína de 3898 aminoácidos, la que es procesada co y postraducionalmente y clivada por una combinación de proteasas virales y celulares, originando 4 proteínas estructurales y 7 no estructurales (Meyers y Thiel, 1996). Hacia el extremo N-terminal de la poliproteína, se encuentra una proteasa (N^{pro}) con actividad autoproteolítica, no encontrada en otros flavivirus, seguida por las proteínas estructurales del “core” (C) y tres glicoproteínas de la envoltura (proteínas E): E1, E2 y E^{ms}. En los dos tercios C-terminal de la poliproteína, altamente conservado en los *Pestivirus*, se localizan las proteínas no estructurales: p54, p80, p10, p30, p58 y p75.

El Laboratorio de Referencia de la Unión Europea desarrolló una base de datos computarizada con toda la información genómica disponible concerniente a las cepas del virus de la PPC aisladas en distintos países del mundo (Greiser-Wilke *et al.*, 2000). Dicha base cuenta con más de 600 entradas, incluidas tres cepas aisladas en Argentina, las que constituyen una poderosa herramienta epidemiológica para establecer relaciones entre secuencias genómicas del virus de la PPC aislados de brotes ocurridos en distintos puntos del mundo.

Aunque no se conoce en forma detallada el ciclo de replicación del virus de la PPC, la secuencia general de replicación de los *Pestivirus* puede resumirse como sigue (Leyssen *et al.*, 2000): primeramente el virus interactúa con la célula para unirse con alta afinidad y especificidad a receptores desconocidos. En-

tonces, se produce la endocitosis celular, donde los cambios de pH endosomales producen la fusión entre la envoltura viral y la membrana endosomal, provocando la liberación al citoplasma de la nucleocápside y permitiendo que el genoma viral se dirija hacia los ribosomas, donde es traducido en un precursor poliproteico que es procesado y postraduccionalmente, originando proteínas individuales y funcionales. Entre las proteínas no estructurales sintetizadas se encuentra la ARN polimerasa dependiente de ARN, que cataliza la síntesis de ARN(-) que sirve de molde para la síntesis de nuevas cadenas de ARN(+). Después de la replicación, el genoma viral es encapsulado y se dirige al retículo endoplasmático, lugar en el que las partículas virales son premunidas de una cubierta fosfolipídica, antes de pasar a la vía secretoria de la célula huésped y liberarse al espacio intercelular.

El virus de la PPC puede sobrevivir durante períodos prolongados en condiciones ambientales favorables. Es relativamente estable en la mayoría de productos de carne fresca, jamones y salames, siendo la carne congelada el sistema más estable de conservación pudiendo sobrevivir más de 4 años. Se inactiva rápidamente con calor, solventes orgánicos, detergentes, proteasas y desinfectantes comunes (Edwards, 2000). Al igual que otros *Flavivirus*, es inactivado rápidamente a pH bajo (menor que 3), siendo relativamente estable en el rango de pH neutro a ligeramente alcalino (Edwards, 2000).

IV. EPIDEMIOLOGÍA

Los únicos huéspedes naturales del virus de la PPC son los miembros de la familia *Suidae*, es decir el cerdo doméstico y el jabalí (Wensvoort *et al.*, 1986; Moennig, 2000). Esta característica epizootiológica facilita el control de la enfermedad, ya que la lucha debe dirigirse únicamente a los suinos.

Uno de los factores más importantes en contribuir a la difusión de la enfermedad es la diferencia en el grado de virulencia entre las distintas cepas del virus, adquiriendo gran importancia en las cepas de alta virulencia los vectores mecánicos, biológicos y no biológicos, puesto que se requieren menos dosis infectivas (Liess, 1987). Para cepas de baja virulencia la principal vía de transmisión es el ingreso de cerdos infectados en la piara, dado que por el mayor período de incubación el riesgo de transmitir la enfermedad es mayor mediante el movimiento de animales vivos infectados y sin sintomatología clínica aparente (San Martín y Vidal, 1998).

Los cerdos infectados con cepas virulentas pueden eliminar grandes cantidades de virus durante 10-20 días, mientras que las infecciones postnatales con cepas de baja virulencia se caracterizan por períodos cortos de excreción del virus. Consecuentemente, las cepas virulentas se diseminan rápidamente en un criadero e inducen mayor morbilidad y mortalidad que las menos virulentas. Los cerdos infectados crónicamente eliminan virus hasta su muerte en forma continua o intermitente.

Bajo condiciones naturales la ruta más frecuente por la cual el virus de la PPC entra al huésped es la oronasal (Moennig, 2000) en tanto que las heridas en la piel pueden ser una importante vía de contagio posnatal (Dunne *et al.*, 1959). Una vía de infección de importancia para la hembra es el contacto genital con machos infectados, pudiendo producirse infección directa del producto de la concepción o infección transplacentaria del feto (Trautwein, 1988).

El transporte del virus de la PPC puede realizarse también a través de vectores biológicos, como tábanos que son capaces de transmitir la enfermedad en las dos horas siguientes a la picadura del animal infectado y moscas que pueden llevar el virus al menos 72 horas (Tidwell *et al.*, 1972; Morgan y Miller, 1976).

Hasta la fecha, existe poca información referida a la situación epidemiológica de la PPC en América. Sin embargo, análisis filogenéticos de cepas del virus aisladas de brotes ocurridos en Sud y Centroamérica, permiten especular que en el continente Americano, el virus de la PPC apareció independientemente en varias regiones y su diseminación habría sido un efecto secundario (Paredes *et al.*, 2005).

V. SIGNOS CLÍNICOS Y PATOLOGÍA

El cuadro clínico de la PPC es altamente variable dependiendo de la edad y/o raza de los animales afectados y de la virulencia de la cepa viral (Moennig y Plagemann, 1992; Sierra *et al.*, 1998; Van Oirschot, 1992, 1999), lo que hace que el diagnóstico basado en signos clínicos sea a menudo dificultoso.

Las lesiones macroscópicas e histopatológicas causadas por la cepa Sudamericana "Quillota" fueron caracterizadas en Chile por Quezada *et al.* (2000) y no difieren en la generalidad de los aspectos morfopatológicos descriptos para las cepas europeas.

Los síntomas dependen de la edad y condición sanitaria de los cerdos, como así también de la virulencia de la cepa viral infectante. Los cerdos adultos son igualmente susceptibles que los lechones, pero presentan generalmente signos de la enfermedad menos severos y tienen mayores probabilidades de sobrevivir. Otro factor que condiciona la expresión clínica de la enfermedad es el estado inmunitario de la población afectada. Así, la forma de curso clínico hiperagudo sólo se observa cuando el virus de la PPC se introduce en una población porcina no inmunizada.

Cuando se expone una cerda preñada al virus de la PPC, la infección pasa inadvertida inicialmente, pero el virus puede transmitirse al feto en el útero (Meyer *et al.*, 1980). Esta infección congénita resulta en: muerte

fetal, reducción del tamaño de camada, momificaciones, infertilidad y aumento de mortalidad perinatal de los lechones. Los que sobreviven son portadores del virus y fuente de diseminación de la enfermedad.

VI. INMUNOPATOLOGÍA

El sistema inmune resulta severamente comprometido durante la infección aguda con el virus de la PPC, siendo la consecuencia inmunopatológica más significativa la drástica disminución de linfocitos B, principalmente en el sistema circulatorio, pero también en los tejidos linfoides (Susa *et al.*, 1992; Narita *et al.*, 1996, 1999). En cambio, la disminución de linfocitos T es menos significativa (Susa *et al.*, 1992).

Al principio de la enfermedad la replicación viral ocurre en los centros germinales de los tejidos linfoides (tonsilas, bazo y nódulos linfáticos) y cuando ésta progresa se produce la desintegración morfológica de la estructura folicular. La disminución de linfocitos B sería una consecuencia de la destrucción de los centros germinales (Susa *et al.*, 1992), considerando dos alternativas: a) los linfocitos B podrían ser blanco directo del virus de la PPC en alguna fase de su maduración dentro del folículo: centroblastos, centrocitos e inmunoblastos llevando a un bloqueo en su maduración; b) los linfocitos podrían estar privados de citoquinas esenciales al producirse la infección de la red de soporte de células dendríticas foliculares. De cualquier modo, el bloqueo en la maduración de los linfocitos B por infección y destrucción de los centros germinales es el mayor evento en la patogénesis de la PPC aguda.

Contrariamente a lo observado por Susa *et al.* (1992), otros autores detectaron una disminución de linfocitos T, tan significativa como la de los B durante la infección con el virus de la PPC, probablemente porque usaron una cepa viral de mayor virulencia

(Summerfield *et al.*, 1998). Por otro lado, propusieron un mecanismo distinto para explicar la disminución linfocitaria ocasionada por el virus, atribuyéndolo a la inducción de apoptosis o muerte celular programada. Asimismo, obtuvieron evidencias experimentales de que la inducción de apoptosis sería una consecuencia indirecta de la infección viral, ya que observaron que el incremento de células apoptóticas ocurrió con anterioridad (1-3 dpi) a que se detectaran cantidades significativas de ARN viral en células hematopoyéticas de la médula ósea de los cerdos infectados (7 dpi) (Summerfield *et al.*, 2000, 2001), concluyendo que la inducción de apoptosis no se produce cuando el virus se inactiva por UV o se bloquea la infección con anticuerpos anti-E2 .

Sato *et al.* (2000) también observaron fragmentación del ADN en núcleos linfocitarios del timo, bazo y nódulos linfoides de lechones inoculados con el virus de la PPC a los 3, 5, 7 y 10 dpi, confirmando que la apoptosis está involucrada en la patología de la PPC, aunque sugieren que interleuquinas liberadas durante la infección serían mediadores potenciales de la apoptosis linfocitaria.

Por otro lado, se ha atribuido a la glicoproteína E^{rns} de la nucleocápside viral un efecto inmunosupresivo sobre los linfocitos *in vitro* y también se demostró su capacidad de inducir apoptosis linfocitaria, ya que luego de incubarlos con dicha proteína se observó un incremento significativo en la cantidad de mono y oligonucleosomas, evidencia de apoptosis celular (Bruschke *et al.*, 1997), que se produciría por secreción de la glicoproteína en la sangre de los animales infectados.

VII. LA PPC EN ARGENTINA

A pesar de que la situación zoonositaria de América Latina ha mejorado, la PPC es la

única enfermedad de la lista A del Código Zoonositario Internacional de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) que persiste en Argentina, lo que significa que está catalogada en el grupo de las enfermedades más severas y que pueden definirse de acuerdo a la OIE como: *Enfermedades transmisibles con gran poder de difusión y especial gravedad, que pueden extenderse más allá de las fronteras nacionales, cuyas consecuencias socioeconómicas y sanitarias pueden ser graves y cuya incidencia en el comercio internacional de animales y productos pecuarios es importante.*

La PPC constituye una barrera sanitaria infranqueable en el Mercosur, limitando las posibilidades comerciales y el desarrollo pleno del sector porcino (Mercosur, Res. N° 20/97). También influye negativamente en la rentabilidad de las explotaciones, aumentando los costos de producción.

Con respecto a la densidad porcina en las distintas regiones de Argentina, el Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA) considera dos zonas:

- a) Alta densidad porcina:
 - Provincia de Buenos Aires: zonas centro y norte
 - Provincia de Santa Fe: zonas centro y sur
 - Provincia de Córdoba: Marcos Juárez, Río Cuarto, Unión, Zona centro al sudeste.
- b) Baja densidad porcina: resto del país.

Con el propósito de controlar y erradicar la PPC en Argentina, el SENASA inició en 1998 el Plan Nacional de Control y Erradicación de la enfermedad (SENASA, Res. N° 392/98), el que se basó en la vacunación obligatoria, el monitoreo del virus de campo, en mataderos y en explotaciones a través de la técnica de inmunofluorescencia directa (IFD) sobre muestras de tonsilas.

VIII. EFECTO MUTAGÉNICO INDUCIDO POR VIRUS

Muchos virus poseen propiedades mutagénicas, principalmente de tipo clastogénicas y, en algunos casos, conservan dicha capacidad en las cepas atenuadas empleadas en la elaboración de vacunas a virus vivo (Stich y Yohn, 1970). Los primeros datos de daño cromosómico asociado a infección viral, provienen del virus del sarampión (Nichols *et al.*, 1962), del Herpes simplex (Stich *et al.* 1964a), del Adenovirus humano tipo 12 (Stich *et al.* 1964b) y del virus de la fiebre amarilla (Harnden, 1964).

En Argentina, los estudios de efecto citogenético asociado a virus, se limitan al virus Junín por su importancia regional como agente causal de la Fiebre Hemorrágica Argentina (Pistol de Rubel y Teyssie, 1970; Hasson *et al.* 1983, Dulout *et al.*, 1983, 1985).

Los primeros indicios de que el virus de la PPC puede inducir cambios citogenéticos fueron obtenidos por Gustafson y Pomerat (1957), cuando observaron cambios citológicos causados por el virus de nódulos linfoides embrionales de células porcinas.

El primer trabajo referido estrictamente al efecto citogenético del virus de la PPC se realizó en Rusia (Krut, 1974) en cerdos infectados experimentalmente con la cepa virulenta Dorset. El análisis de células de la médula ósea de cerdos infectados reveló que poseían el doble de células aneuploides y el cuádruple de poliploides que los controles. Además, había 5 veces más células con anomalías estructurales del tipo: disolución centromérica (33.7%), fracturas de cromátidas (31%), "stickiness" (20.4%), cromosomas en anillo (4%), múltiples anomalías (2.8%) y pulverizaciones (10%). También se observó que la infección viral producía una drástica disminución del índice mitótico. Posteriormente, Soldatovic *et al.*

(1981), encontraron las mismas alteraciones en cerdos infectados con la cepa PAV del virus de la PPC. Los animales fueron analizados citogenéticamente a los 7 días postinoculación (antes de que aparezcan los síntomas) y en los días 1, 3 y 5 después de la aparición de los síntomas, observándose que el índice mitótico disminuyó continuamente con el transcurso de la enfermedad, siendo esta disminución más pronunciada en el período de incubación. La frecuencia de células poliploides y heteroploides aumentó significativamente, aunque el mayor incremento se produjo en aberraciones cromosómicas, tales como, fracturas y fragmentaciones que alcanzaron un máximo de 13,5% que, que condujeron a la eliminación de algunas células de la población entre las 72 y 96 horas después de la manifestación de los síntomas de la enfermedad. Asimismo, en cerdas preñadas la vacuna contra la PPC tiene efecto teratogénico en la descendencia (Sautter *et al.*, 1953; Cowart y Morehouse, 1967; Johnson *et al.*, 1974; Baez Ruiz *et al.*, 1995).

El potencial mutagénico de las vacunas a virus vivo contra la PPC fue demostrado por primera vez por Lodja y Rubes (1977), quienes evaluaron la capacidad mutagénica del virus vacunal empleado para proteger los cerdos de la enfermedad en República Checa. En este estudio, se analizaron 30 cerdos de entre 30 y 40 kg de peso que fueron inmunizados con la vacuna utilizada en dicho país, empleándose como controles 30 cerdos no vacunados. Los resultados demostraron de manera contundente, que la vacuna a virus atenuado produce varias clases de cambios cromosómicos, habiéndose registrado casi 9 veces más cambios estructurales y 6 veces más poliploidías en los cerdos vacunados que en los controles. Los cambios estructurales observados fueron fracturas de cromátida y de cromosoma, los que a su vez originaron otros tipo más severos de daño. Este hallazgo, llevó a Gustavsson (1990) a considerar

una línea de investigación de particular importancia el estudio de la capacidad mutagénica del virus de la PPC atenuado en la vacuna, particularmente en aquellos países que continúan aplicando planes de vacunación para el control de la enfermedad. Sin embargo, esta temática no tuvo desarrollo posterior, probablemente porque la Unión Europea prohibió la vacunación como estrategia de control de la PPC a partir de 1990, atribuyendo la medida a la imposibilidad de discriminar serológicamente animales enfermos de los vacunados (EU, 1993). La política de control de la enfermedad seguida desde entonces, se basa en el sacrificio de todos los animales afectados o sospechosos de estarlo, causando severas pérdidas económicas en la industria porcina, particularmente en países con alta densidad porcina. Por ello, el “*Scientific Veterinary Committee*” (SVC, 1997) recomendó el desarrollo y control de “vacunas marcadas” o a subunidades, que podrían emplearse en el futuro como una herramienta adicional para el control de la enfermedad en situaciones emergencia en áreas de alta densidad porcina (Volker, K. y Langl, E. 2004; Uttenthal, A. *et al.*, 2001) .

La más avanzada y de la que se tienen más datos experimentales y posibilidad de utilizarse en un futuro cercano, es una vacuna formada exclusivamente por la proteína estructural E2 del virus, siendo la más inmunogénica y capaz de inducir altos títulos de anticuerpos neutralizantes (Moormann *et al.*, 2000; Maurer *et al.*, 2005).

En la actualidad, la Unión Europea implementa y financia un programa que incluye un gran número de ensayos realizados en distintos países europeos para evaluar la eficacia de dos marcas comerciales disponibles (*Porcilis Pesti*, de Bayer y *Bayovac*, de Intervet) y determinar la conveniencia o no de implementar nuevamente programas de control de la PPC basados en la inmunización con vacunas marcadas.

IX. VACUNA CONTRA LA PPC EMPLEADA EN ARGENTINA

Hasta mayo del año 2004 se utilizaron vacunas a virus vivo atenuado de la cepa “China”, también conocida como “Suvac”, “C” o “K” modificada en su virulencia por sucesivos pasajes en conejo. La inmunidad conferida por la vacuna comienza dentro de la primera semana posvacunación y se mantiene por 2-3 años, protegiendo contra la enfermedad al disminuir eficazmente la replicación viral de cepas virulentas frente a exposición al virus de la PPC.

La hembra vacunada provee de anticuerpos maternos (inmunidad pasiva) a los lechones a través del calostro, los que protegen durante 5-8 semanas contra la mortalidad por el virus de la PPC. Estos anticuerpos interfieren con la vacuna en el desarrollo de la inmunidad activa, por lo que es necesario que cada establecimiento establezca el momento de ausencia de anticuerpos maternos antes de realizar la vacunación.

El Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA) realizó los controles oficiales de autorización sobre el producto terminado, envasado y estampillado presentado por los laboratorios que producen la vacuna desde que se inició el plan de control hasta el 28 de mayo de 2004 (Resolución del SENASA N° 308/04) fecha en que se prohibió la vacunación.

X. POTENCIAL MUTAGÉNICO DE LA VACUNA CONTRA LA PPC EMPLEADA EN ARGENTINA

Considerando que en Argentina no existía ningún tipo de antecedente sobre si las vacunas que se utilizaron durante más de tres décadas poseían capacidad mutagénica, se inició en 1997 una línea de investigación en

tal sentido (Tiranti *et al.*, 1998; Genghini *et al.* 1998; 2000; 2001a, 2001b, 2002b, 2004a, 2004b, 2004c, Palacios *et al.*, 2003).

El plan de trabajo se ejecutó en cuatro etapas, que incluyeron; el análisis citogenético de cerdos vacunados, el efecto de la vacuna sobre el ADN linfocitario y el control de parámetros reproductivos de cerdas vacunadas.

El potencial mutagénico de las vacunas empleadas en Argentina fue demostrado por primera vez por Genghini *et al.*, 1998. El estudio se realizó en el marco de un conve-

nio de Cooperación entre la Universidad Nacional de Río Cuarto y el SENASA; determinándose, que tanto en cerdos inoculados con 1 como con 10 dosis, pertenecientes a las prueba de Potencia e Inocuidad de la vacuna respectivamente, se indujeron aberraciones cromosómicas; siendo la magnitud y el tipo predominante de daño cromosómico inducido muy diferente para ambos tratamientos. En cambio, en los cerdos controles los cromosomas linfocitarios se ajustaron al cariotipo estándar internacional para *Sus scrofa doméstica L.* (Fig. 1).

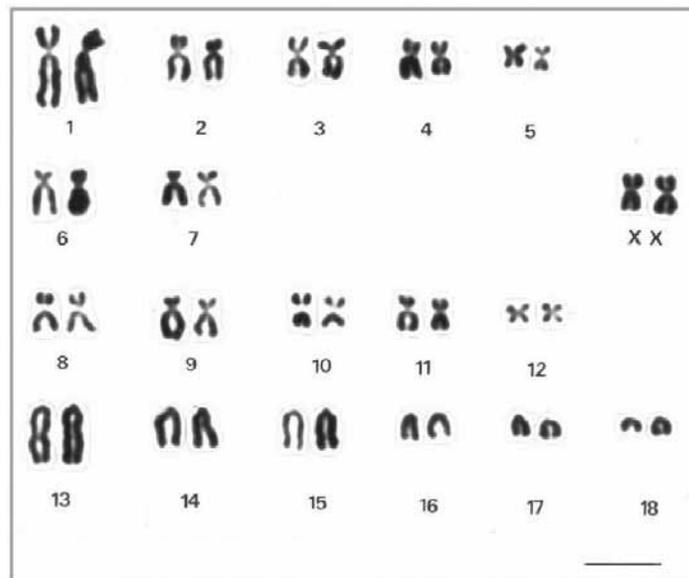


Figura 1. Cariotipo normal de una hembra ($2n=38$) representativo del observado en los animales controles. La barra indica $10 \mu\text{m}$.

Los tipos de alteraciones cromosómicas inducidos fueron: fracturas de monocromátida e isocromátida: B'+B'' (Fig.2), figuras trirradiales y cuadrirradiales: RB (Fig. 3),

múltiples anormalidades: Mu (Fig. 4), células poliploides: Po (Fig. 5) y pulverizaciones cromosómicas: Pu (Fig. 6).

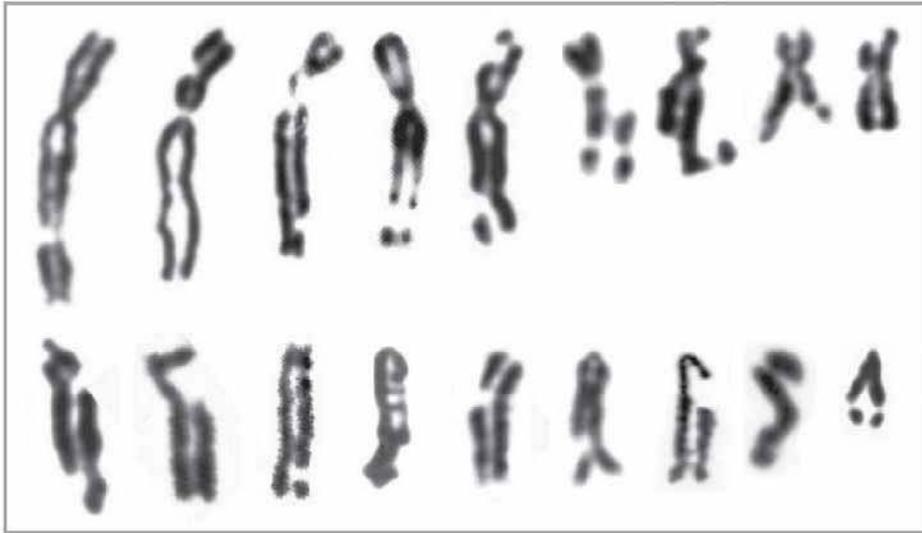


Figura 2. Cromosomas linfocitarios porcinos con fracturas (B'+B'') inducidas por la vacuna contra la PPC.



Figura 3. Intercambio de cromátidas (RB) inducidas por la vacuna contra la PPC. a- Trirradiales; b - Cuadrirradiales

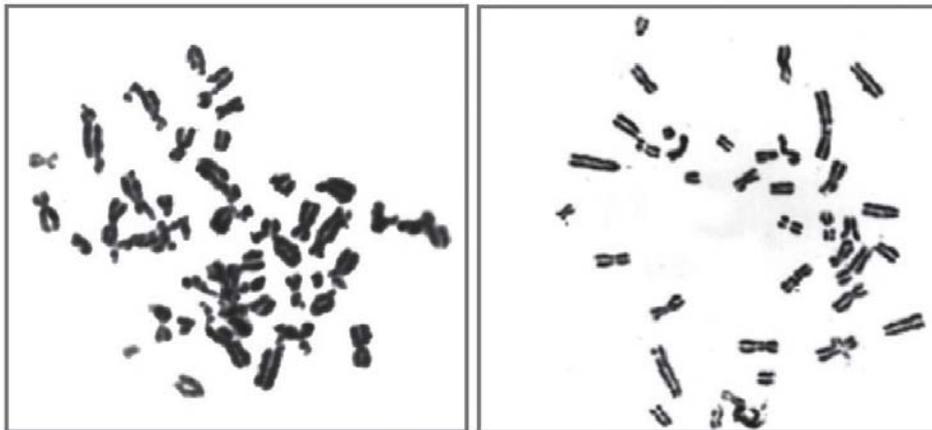


Figura 4. Células con múltiples anomalías (Mu) inducidas por la vacuna contra la PPC.

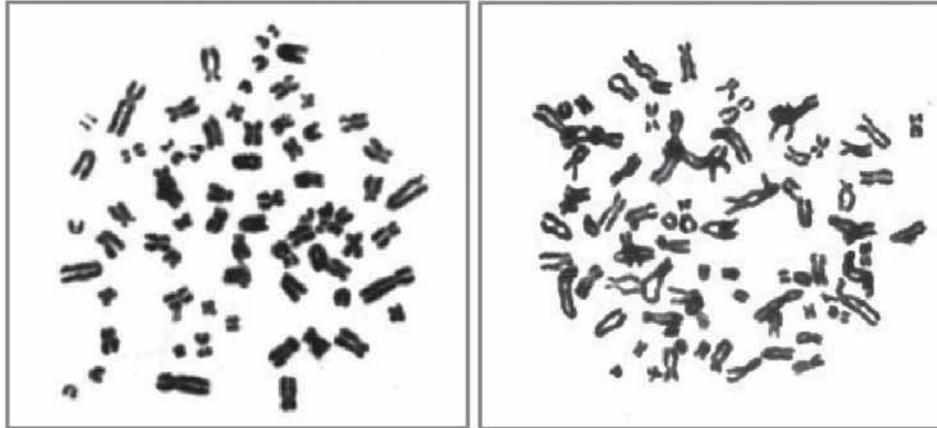


Figura 5. Células con número cromosómico superior al diploide (Po).

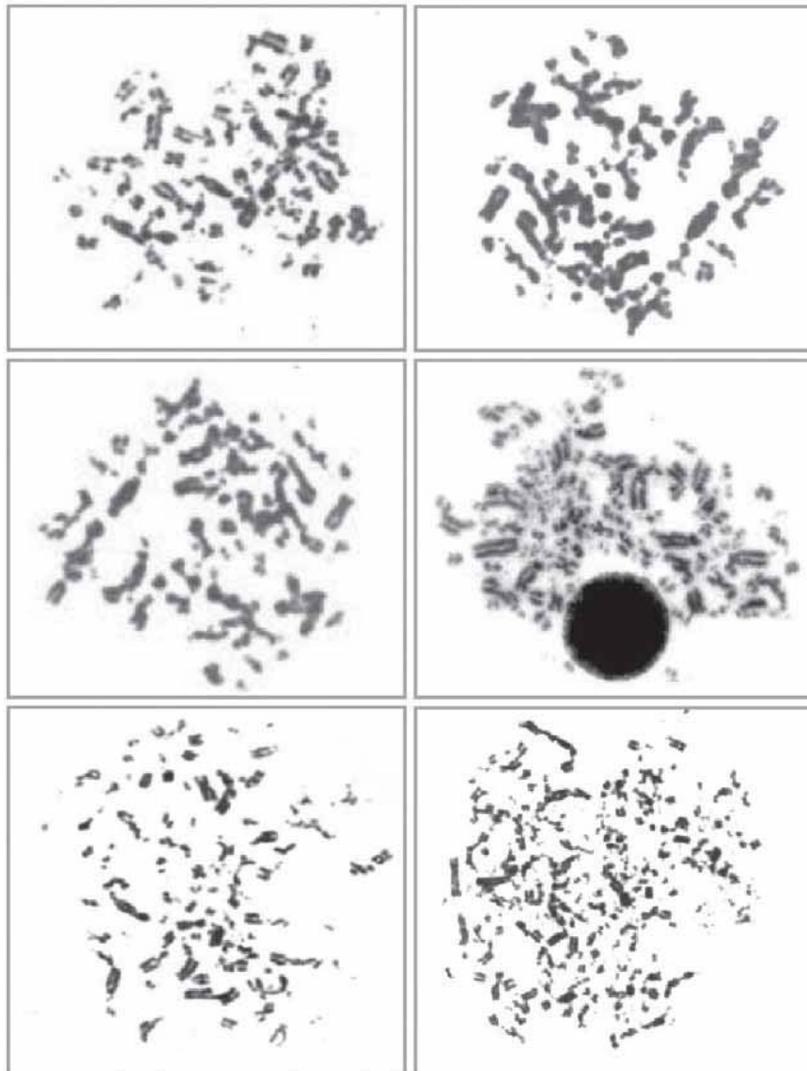


Figura 6. Diferentes grados de pulverizaciones cromosómicas.

El tipo de alteraciones observadas revela que el efecto primario del virus vacunal de la PPC consistió en originar fracturas cromosómicas, que posteriormente derivaron en diferentes tipos de aberraciones más severas. El tipo predominante fue claramente dependiente de la dosis, prevaleciendo a bajas dosis tipos menos severos como fracturas de mono e isocromátida y a dosis más elevadas las pulverizaciones. Dado que para que se produzca cualquiera de estas alteraciones se requiere de la ocurrencia previa de roturas cromosómicas, el virus de la PPC podría clasificarse como un agente clastogénico, término propuesto por Shaw (1970) para referir a distintos tipos de agentes físicos, químicos o biológicos que pueden producir rupturas cromosómicas visibles al microscopio óptico en células metafásicas.

También se observaron células con alteraciones cromosómicas numéricas, específicamente poliploidías, aunque su frecuencia no difirió estadísticamente de la registrada en los controles, indicando que no son inducidas por el virus vacunal.

Estos resultados permiten aseverar que la capacidad del virus de la PPC de inducir alteraciones cromosómicas, no se pierde en el proceso de atenuación de la cepa virulenta para obtener la cepa vacunal inmunogénica y que probablemente se asocia a su interacción con la maquinaria biosintética de la célula durante la estrategia de replicación que realiza en el huésped por un mecanismo molecular aún desconocido (Leysen *et al.*, 2000).

XI. EFECTO DE LA DOSIS VACUNAL SOBRE LA FRECUENCIA DE CÉLULAS CON ALTERACIONES CROMOSÓMICAS

El efecto de la dosis de vacuna sobre la inducción de alteraciones cromosómicas se evaluó *in vivo* (Genghini *et al.*, 1998, 2000) e *in vitro* (Genghini *et al.*, 2001a, b; 2004a,

b, c). Los resultados de ambos ensayos evidenciaron que el efecto citogenético inducido es marcadamente dosis-dependiente, indicando que al aumentar el inóculo viral se produce un efecto sinérgico en la capacidad del virus de interaccionar con los receptores de la célula huésped.

Las dos dosis extremas de vacuna utilizadas por el SENASA en las pruebas de Potencia e Inocuidad, es decir 1 y 10 dosis, respectivamente dieron diferencias altamente significativas en la capacidad de inducir alteraciones cromosómicas ($p < 0.01$). Así, con 10 dosis se registraron aproximadamente 20 veces más cambios cromosómicos que con 1 dosis. Las diferencias también fueron altamente significativas al comparar los tratamientos de 1 y 10 dosis con sus respectivos controles.

El marcado efecto de la dosis vacunal, fue mucho más evidente en los cerdos que fueron desafiados con 100.000 DL₅₀% de la cepa virulenta, ya que se produjo un elevado índice de citotoxicidad, que se tradujo en escasos linfocitos en proliferación (Genghini *et al.*, 1998). Esta observación coincide con la de Soldatovic *et al.* (1981), en el sentido de que el virus de la PPC produce en los animales infectados una drástica disminución del índice mitótico y disminución linfocitaria. Coincidentemente, Van Oirsch *et al.*, (1981, 1983) determinaron que el virus de la PPC disminuye la proliferación linfocitaria en respuesta a mitógenos. Susa *et al.* (1992) y Narita *et al.* (1996) mediante estudios histopatológicos, arribaron a la conclusión que la propiedad del virus de suprimir la división celular linfocitaria se debe a su capacidad de destruir los centros germinales de los nódulos linfoides, lo que consecuentemente lleva a una disminución linfocitaria en el sistema circulatorio.

Mediante ensayos *in vitro* realizados a partir de sangre de cerdos no vacunados y exponiendo los cultivos linfocitarios a la vacuna se pudo determinar que de las 3 dosis

probadas 5, 10 y 20 $\mu\text{l/ml}$, sólo con la menor de ellas (5 $\mu\text{l/ml}$) no hubo diferencias estadísticamente significativas con los controles no expuestos a la vacuna (Genghini *et al.*, 2002, 2004a, b, c).

La capacidad del virus de la PPC de inducir alteraciones cromosómicas en sistemas *in vitro* en los que no se empleó ningún tipo de activador metabólico, indica que su potencial mutagénico es directo, es decir que no depende de vías de activación metabólica microsomal y/o productos intermedios que se presentan en los sistemas *in vivo* y que conducen en muchas oportunidades a diferentes respuestas celulares (Evans y O'Riordan, 1975). La extrapolación de los datos obtenidos *in vitro* a las condiciones fisiológicas del animal requiere precaución; sin embargo, pueden utilizarse como "indicadores" para establecer, conjuntamente con el SENASA, si la mínima concentración viral que no produce efecto genotóxico *in vitro* (5 $\mu\text{l/ml}$) induce inmunidad en el animal. Disponer a la brevedad de esta información será de suma utilidad, ya que permitiría en caso de registrarse nuevos brotes de PPC en el país, aplicar la vacuna, sin inducir en los animales a efectos mutagénicos.

XII. CINÉTICA DE LAS ALTERACIONES CROMOSÓMICAS EN DIFERENTES PERÍODOS POSVACUNACIÓN

El daño cromosómico inducido es de naturaleza inestable (Genghini *et al.*, 2000), ya que la frecuencia de células con aberraciones cromosómicas varió en diferentes períodos posvacunación evaluados (días post-vacunación: dpv). La cinética en los distintos dpv se ajustó al siguiente patrón general: las células con alteraciones se incrementaron significativamente desde los 3 hasta los 10 dpv, fecha en la que alcanzaron la máxima frecuencia. A partir de entonces comenzaron a

disminuir, hasta alcanzar a los 22 dpv valores que no difirieron de los basales. El mismo patrón general descrito para 1 dosis se repitió con 10 dosis de vacuna, aunque presentó mayor dinámica en las distintas fechas. Así, el incremento en la frecuencia de anomalías cromosómicas fue muy abrupto entre los 3 y 5 dpv, alcanzándose antes la máxima frecuencia de linfocitos con alteraciones (7 dpv), para posteriormente disminuir hasta la última fecha evaluada (20 dpv) en la que todavía las alteraciones cromosómicas se encontraban significativamente incrementadas con respecto a los controles, cosa que no sucedió en los inoculados con 1 dosis. La comparación de la cinética de las alteraciones cromosómicas inducidas en los dos tratamientos evaluados, marca un claro efecto sinérgico entre el aumento de la dosis y la inducción de efecto citogénico, hecho que podría atribuirse a que al inocular un mayor número de partículas virales, estas alcanzarían más cantidad células linfocitarias en menor tiempo.

XIII. EFECTO DE DISTINTOS AMBIENTES SOBRE LA INDUCCIÓN DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS

Se trabajó con 4 ambientes distintos (Genghini *et al.* 1998, 2000, 2001a, b), uno correspondiente a las condiciones experimentales en que se mantienen los cerdos destinados a las pruebas nacionales oficiales de control de vacunas que se realizan en Buenos Aires (SENASA) y los tres restantes, fueron establecimientos de la región de Río Cuarto en los que los cerdos eran criados al aire libre e inmunizados de acuerdo a la reglamentación fijada en el Programa Nacional de erradicación de la Peste Porcina.

Previo a la vacunación (control del día 0) los cerdos de los 4 ambientes presentaban cariotipos normales, registrándose sólo el

daño cromosómico basal propio de cualquier cultivo linfocitario (Rubes, 1987; Rubes *et al.*, 1992; Genghini *et al.*, 1995, 1997); hecho que permite aseverar que al iniciarse los ensayos no había alteraciones cromosómicas en los cerdos pertenecientes a ninguno de los ambientes. Con posterioridad a la vacunación, no hubo diferencias significativas en la frecuencia media de células con alteraciones cromosómicas entre 2 de los criaderos (A y C) y el SENASA, considerando todas los períodos posvacunación en forma conjunta, indicando que estos tres ambientes no influyeron en la inducción de alteraciones. En cambio, el Criadero B se diferenció significativamente de los otros ambientes por tener mayor frecuencia de células con alteraciones cromosómicas, lo que podría atribuirse a un brote de pleuroneumonía (causado por *Actinobacillus pleuropneumoniae*) diagnosticado en el establecimiento a los 5 días de iniciado el ensayo (Ambrogi, 2002). Esta enfermedad, caracterizada por inicio súbito y evolución corta, es altamente contagiosa (Sebunya y Saunders, 1983) y podría haber aumentado la susceptibilidad de los cerdos a la inmunización con la vacuna a virus vivo por encontrarse inmunológicamente deprimidos (Genghini *et al.*, 2000).

La frecuencia máxima de células con alteraciones cromosómicas fue superior en los criaderos (6.76 ± 0.36 ; 10.4 ± 0.49 y 7.23 ± 0.31 para A, B, y C, respectivamente) que en los cerdos experimentales del SENASA (4.14 ± 0.05). Esta diferencia plantea el interrogante referente a por qué en las condiciones de campo en las que los porcicultores aplican regularmente las vacunas, la frecuencia máxima de células con alteraciones cromosómicas es mayor que la observada en cerdos experimentales criados en confinamiento. Un factor que probablemente habría contribuido a esta diferencia es que los cerdos utilizados en las pruebas oficiales de control de vacunas presentaban garantías de no haber entrado en contacto con antígenos

de la PPC, circunstancia que no puede garantizarse a campo y que de acuerdo a Evans y O’Riordan (1975) podría alterar el número de células con alteraciones cromosómicas. Además, para el caso del Criadero B la patología mencionada anteriormente podría explicar la mayor frecuencia de células con alteraciones.

XIV. ENSAYOS DE PROLIFICIDAD

Los resultados de los ensayos de prolificidad realizados por técnicos del SENASA a hembras que habían recibido distintas dosis de vacuna (Genghini *et al.*, 1998), como así también en cerdos pertenecientes a distintos criaderos (Genghini 2002, 2004 a y b), indicaron que la vacuna no disminuyó la aptitud reproductiva de hembras preñadas, ni produjo alteraciones en los distintos parámetros evaluados en los lechones nacidos de dichas madres. Estos resultados sugieren que el material hereditario de las células germinales no fue afectado por el virus vacunal. Estas evidencias apoyan la hipótesis que señala que el “blanco” de replicación del virus de la PPC son los nódulos linfoides, lo que consecuentemente se manifestaría en efecto clastogénico sólo a nivel de los linfocitos. Sin embargo, para corroborar esta hipótesis se requeriría realizar los estudios citogenéticos, directamente sobre células de los tejidos gonadales.

XVI. MECANISMO DE ACCIÓN DEL VIRUS VACUNAL

El “ensayo del cometa” resultó un método sensible para evaluar el efecto genotóxico de la vacuna y permitió progresar en el conocimiento del mecanismo por el cual el virus vacunal de la PPC ejerce su acción genotóxica.

La exposición de cultivos linfocitarios

porcinos a la vacuna *in vitro* indujo incrementos significativos de las dos variables indicadoras de daño de ADN sometidas a evaluación cuantitativa: "tail moment" (TM) y "tail length" (TL). El aumento fue marcadamente dependiente de la dosis, tal como ocurrió con las alteraciones cromosómicas ya que el valor medio de "TL" de los cultivos tratados con 20 µl/ml de vacuna fue 6 veces mayor que el de los controles; en tanto que en los tratados con 100 µl/ml el incremento fue 21 veces mayor. Haciendo la misma comparación para "TM" los incrementos fueron de 5 y 24 unidades, respectivamente. Considerando que "TM" resulta del producto de la longitud de la cola por la intensidad de ADN en la cola del cometa, se deduce que el aumento de "TM" con la dosis de vacuna se debe principalmente al incremento de la primera de las variables, dado que se registraron incrementos proporcionales de "TM" y "TL" en función de la dosis.

Si se comparan los resultados del ensayo citogenético *in vitro* con los del cometa, resulta evidente la mayor sensibilidad de este último en detectar la genotoxicidad de la vacuna, dado que la frecuencia de células con valores de "TM" indicadores de daño fue mayor que la frecuencia de células con alteraciones cromosómicas considerando una misma dosis de vacuna (20 µl/ml). Así, en el primer estudio la frecuencia media de células con daño cromosómico fue de 11%, mientras que los cometas con TM >2 (indicadores de daño), fueron el 67% de la población linfocitaria analizada. Estas diferencias podrían atribuirse a que los linfocitos en los cuales se midió el daño con el ensayo del cometa se encontraban en la fase G₀ del ciclo celular, dado que la técnica no requiere estimulación con mitógenos, en tanto que el análisis citogenético se realizó sobre células en proliferación, las que tienen mayor capacidad de reparar el daño del ADN (Kalweit *et al.*, 1988; Villarini *et al.*, 1998). Así, el daño inducido por el virus vacunal estaría sujeto

a un proceso de reparación más eficiente en la fase G₁ de los linfocitos estimulados, lo que se reflejaría en una menor frecuencia de células con alteraciones cromosómicas en comparación con la frecuencia de linfocitos que presentaron patrones de migración del ADN indicativo de fragmentación en el ensayo del cometa.

Los resultados obtenidos demuestran que el ensayo del cometa, ampliamente utilizado en genética toxicológica para detectar genotoxicidad inducida por diferentes agentes físicos y químicos (Zamorano-Ponce, 2004) también es útil para evaluar efecto genotóxico inducido por virus, siendo este estudio el primero en el cual el procedimiento se aplica a cultivos linfocitarios porcinos para evaluar la genotoxicidad de una vacuna.

Aunque el mecanismo molecular por el cual el virus interacciona con el ADN de la célula huésped para ejercer el efecto genotóxico no puede deducirse de este estudio, los resultados obtenidos en los distintos ensayos realizados respaldan la siguiente hipótesis: cuando el virus de la PPC, atenuado en la vacuna, llega a las células linfocitarias para replicarse, produciría fragmentación del ADN, daño que a nivel citogenético se visualiza como una serie gradual de fracturas cromosómicas que aumentan su severidad en los distintos períodos posvacunación para finalmente terminar en pulverizaciones cromosómicas que consecuentemente llevarían a la muerte celular, probablemente por apoptosis. Esta hipótesis sería respaldada por la conocida capacidad de la glicoproteína E^{ms} de los *Pestivirus* de fragmentar el ADN linfocitario produciendo mono y oligonucleosomas por apoptosis linfocitaria (Bruschke *et al.*, 1997), fenómeno reiteradamente asociado a la infección con el virus de la PPC (Susa *et al.*, 1992; Summerfield *et al.*, 1998, 2000, 2001; Sato *et al.*, 2000; Romanini, 2001).

Considerando que la completa atenuación del virus de la PPC requeriría del bloqueo de la actividad de la glicoproteína E^{ms}

viral (Meyers *et al.*, 1999), los resultados sugieren que en las vacunas contra la PPC empleadas en Argentina, dicha proteína estaría activa produciendo genotoxicidad, fenómeno que se manifestaría a nivel citogenético en la inducción de alteraciones cromosómicas y en el plano molecular en la fragmentación del ADN.

Futuras líneas de investigación que prueben mediante microscopía electrónica la presencia del virus dentro de los linfocitos, podrían resolver el controvertido tema de la patogenia de la enfermedad (trabajo en ejecución).

El vertiginoso avance de la biología molecular durante las dos últimas décadas, llevó a un significativo incremento en el conocimiento de la estructura y función de los genes y a disponer de nuevas tecnologías eficientes para estudiar secuencias genéticas muy pequeñas como las de los virus. Estos avances condujeron al desarrollo de una nueva subdisciplina de la Genética Toxicológica denominada "toxicogenómica", definida por Aardema y MacGregor (2002) como: "el estudio de la relación entre la estructura y actividad del genoma y los efectos biológicos adversos de agentes exógenos". Estas nuevas y poderosas herramientas, que ya han permitido avances significativos en la evaluación de las respuestas moleculares de diferentes células y tejidos dañados por agentes físicos y químicos, probablemente contribuirán en un futuro cercano a un mayor desarrollo en el campo de la genotoxicidad inducida por virus y podrían esclarecer cuál es el mecanismo de interacción entre el virus vacunal de la PPC y el ADN linfocitario que conduce al efecto genotóxico detectado.

XVII. AGRADECIMIENTOS

La parte experimental del este trabajo fue financiada por los siguientes proyectos: 1) PICTO, BID1201/OC-AR- Proy. 08-

114039 (Argentina) y 2) DIUBB-055109 3/R. (Chile).

XVIII. BIBLIOGRAFÍA

- AARDEMA, M.J.; MACGREGOR, J. 2002. Toxicology and genetic toxicology in the new era of "toxicogenomics": impact of "-omics" technologies. *Mutation Research* 499: 13-25.
- AMBROGI, A. 2002. Monitoreo de enfermedades pulmonares y su relación con parámetros productivos en cerdos criados al aire libre. Tesis para optar al grado de Magister en Salud y Producción Porcina. Fac. de Agron. y Vet. Universidad Nacional de Río Cuarto.
- BAEZ RUIZ, U.A.; AYALA, M.A.; ESCALERA, A.M.; CORREA GIRON, P.; ROSALES ORTEGA, C. 1995. Inocuidad del virus vacunal PAV-250 contra la fiebre porcina clásica (FPC) en cerdas en celo y gestantes, sin antecedentes de vacunación. *Técnica Pecuaria Mexicana* 33: 135-147.
- BIAGETTI, M.; GREISER-WILKE, I.; RUTILI, D. 2001. Molecular epidemiology of classical swine fever in Italy. *Veterinary Microbiology* 83: 205-215.
- BJÖRKLUND, H.V.; STADEJEK, T.; VILCEK, S.; BELÁK, S. 1998. Molecular characterization of the 3' noncoding region of Classical Swine Fever Virus vaccine strains. *Virus Genes* 16: 307-312.
- BRUSCHKE, C.J.; HULST, M.; MOORMANN, R.; VAN RIJN, P.; VAN OIRSCHOT, J. 1997. Glycoprotein E^{ms} of Pestivirus induces apoptosis in lymphocytes of several species. *Journal of Virology* 71: 6692-6696.
- COWART, W.O.; MOREHOUSE, L.G. 1967. Effects of attenuated Hog Cholera virus in pregnant swine at various stages of gestation. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 151: 1788.
- DE SMIT, A.J.; EBLE, P.L.; KLUIJVER, E.P.; BLOEMRAAD, M.; BOUMA, A. 2000. Laboratory experience during the classical swine fever virus epizootic in the Netherlands in 1997-1998. *Veterinary Microbiology* 73: 197-208.
- DIAZ DE ARCE, H.; NUÑEZ, J.L.; GANGES, I.; BARRERAS, M.; FRÍAS, M.T.; SOBRINO, F. 1999. Molecular epidemiology of classical swine fever in Cuba. *Virus Research* 64: 61-67.
- DULOUT, F. N.; CARBALLAR, G.; BIANCHI, N.O.; von GURADZE, H.N. 1983. Cytogenetics effect of two strains of Junín virus in the guinea pig. *Intervirology* 19: 44-46.

- DULOUT, F.N.; PANISSE, H.E.; CARBALLAL, G.; von GURADZE, H.N.; DE LUCA, J.C.; OUBIÑA, J.R.; VIDELA, C. 1985. Junín virus-induced chromosomal aberrations in the guinea pig. *Intervirology* 24: 193-198.
- DUNNE, H.W.; HOKANSON, J.F.; LUEDKE, A.K. 1959. The pathogenesis of hog cholera. I. Route of entrance of the virus into the animal body. *American Journal of Veterinary Research* 20: 615-618.
- EDWARDS, S. 2000. Survival and inactivation of classical swine fever virus. *Veterinary Microbiology* 73: 175-181.
- EDWARDS, S.; FUKUSHO, A.; LEFEVRE, P.; LIPOWSKI, A.; PEJSAK, Z.; ROEHE, P.; WESTERGAARD, J. 2000. Classical swine fever: the global situation. *Veterinary Microbiology* 73: 103-119.
- EVANS, H.J.; O'RIORDAN, M.L. 1975. Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. *Mutation Research* 31: 135-148.
- GENGHINI, R.N.; WITTOUCK, P.; TIRANTI, I.; BONVILLANI, A. 1994. Procedimientos y resultados de un estudio citogenético de cerdos con problemas reproductivos. *Revista UNRC* 14:79-90.
- GENGHINI, R.N.; TIRANTI, I. 1995. Estudios cromosómicos en el cerdo. *Theoria* 3: 59-75.
- GENGHINI, R.N.; TIRANTI, I.; WITTOUCK, P.; DE LUCA, J.C.; DULOUT, F. 1997. Chromosomal damage in pigs from a farm of Central Argentina. *Cytologia* 62: 361-367.
- GENGHINI, R.; TIRANTI, I.; SEGADÉ, G.; AMADO, J.; WITTOUCK, P.; MIAN, L. 1998. In vivo effect on pig chromosomes of high dosage vaccine against classic swine fever. *Mutation Research* 422: 357-365.
- GENGHINI, R.; TIRANTI, I.; WITTOUCK, P.; CARBÓ, L. 2000. Genotoxicity of vaccine against classical swine fever in pig farms of Argentina. En: *Proceedings of the 14 th European Colloquium on Cytogenetics of Domestic Animals*. pp 13. República Checa, Brno, 27-30/6/00.
- GENGHINI, R.; TIRANTI, I.; WITTOUCK, P.; REYNOSO, R.. 2001a. Genotoxicidad de la vacuna contra la Peste Porcina Clásica. I. Ensayo in vivo. *BAG (Basic & Applied Genetics) Vol. XIV, Pág. 52*
- GENGHINI, R. TIRANTI, I.; BRESSÁN, E.; ZAMORANO, E.; FERNÁNDEZ, J.; DULOUT, F. 2001b. Genotoxicidad de la vacuna contra la Peste Porcina Clásica. II. Ensayos in vitro. *BAG (Basic & Applied Genetics) Vol. XIV, pág. 52*
- GENGHINI, R.; TIRANTI, I.; WITTOUCK, P. 2002. Pig chromosome aberrations after vaccination against classical swine fever. *Vaccine* 20: 23-24: 2873-2877.
- GENGHINI, R.; TIRANTI, I.; TROLLIET, J.; WITTOUCK, P.; CARREÑO, G.; CAMPOS, L.; BOSCO, H. 2004a. Análisis del efecto genotóxico de la vacuna contra la Peste Porcina Clásica en cerdas preñadas. *BAG (Basic & Applied Genetics) Vol. XV. (Supplement 2), pág. 56*.
- GENGHINI, R.; TIRANTI, I.; WITTOUCK, P.; BOSCO, H.; CAMPOS, L.; CARREÑO, G. 2004b. Título: Chromosomal anomalies in pigs vaccinated against classic swine fever. *BIOCELL* 28(3): 366.
- GENGHINI, R.; TIRANTI, I.; BRESSÁN, E.; ZAMORANO-PONCE, E.; FERNÁNDEZ, J.; DULOUT, F. 2004c. Determination of genotoxicity of classical swine fever vaccine *in vitro* by cytogenetic and comet tests. *Mutagénesis (ENVIADO corregido)*.
- GREISER-WILKE, I.; ZIMMERMANN, B.; FRITXEMEIER, J.; FLOEGEL, G.; MOENNIG, V. 2000. Structure and presentation of a World Wide Web database of CSF virus isolates held at the EU Reference Laboratory. *Veterinary Microbiology* 73: 131-136.
- GUSTAFSON, D.P.; POMERAT, C.H. 1957. Cytopathogenic effects of hog cholera virus on embryonic swine tissues in vitro. *Am. J. Vet. Res.* 18: 473.
- GUSTAVSSON, I. 1990. Chromosomes of the pig. En: *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine. Domestic Animal Cytogenetics* 34: 73-107.
- HANSON, R.P. 1957 Origin of Hog Cholera. *Journal of American Veterinary Medical Association* 131: 211-218.
- HARNDEN, D.G. 1964. Cytogenetic studies on patients with virus infections and subjects vaccinated against yellow fever. *American Journal of Human Genetics*. 16: 204-213.
- HASSON, E.; BIANCHI, M.S.; BIANCHI, N.O. 1983. Análisis de aberraciones cromosómicas e intercambios de cromátidas hermanas en cultivos de linfocitos humanos infectados con virus Junín (cepa XJ-clon 3). *Medicina* 43: 735-736.
- JOHNSON, K.; FERGUSON, L.C. BYINGTON, D.P.; REDMAN, D.R. 1974 Multiple fetal malformations due to persistent viral infection. I. Abortion, intrauterine death and gross abnormalities in fetal swine infected with Hog Cholera vaccine virus. *Laboratory Investigation* 30: 608.
- JULIO PINTO, C; URCELAY, S. 2003. Biosecurity

- practices on intensive pig production systems in Chile. *Preventive Veterinary Medicine* 59(3):139-145, 2003.
- KALWEIT, S.; VASUDEY, V.; OBE, G. 1988. Liquid-holding experiments with human lymphocytes; III experiments with G0 and G1 cells. *Mutation Research* 207: 41-44.
- KRUT, N. 1974. Chromosome anomalies induced by swine fever virus. *VIEV, Moscow Zh-472*.
- KUMAGAI, T.; SHIMIZU, T.; MATUMOTO, M. 1958. Detection of hog cholera virus by its effects on Newcastle disease virus in swine tissue culture. *Science* 128: 336-342.
- LADDOMADA, A. 2000. Incidence and control of classical swine fever in European wild boar. *Veterinary Microbiology* 73: 121-130.
- LEYSEN, P.; CLERCQ, E.; NEYTS, J. 2000. Perspectives for the treatment of infections with Flaviviridae. *Clinical Microbiology Reviews* 13: 67-82.
- LISS, B. 1987. Pathogenesis and epidemiology of hog cholera. *Annales Recherche Veterinaire*. 18: 139-145.
- LIU, J.J.; WONG, M.L.; CHEN, P.F.; CHANG, T.J. 1998. Cloning, expression and sequence analysis of the classical swine fever virus nucleocapsid protein. *Virus Genes* 16: 225-234.
- LODJA, L.; RUBES, J. 1977. Chromosome aberrations in pigs after vaccination with living vaccine against swine fever. *Annales de Génétique et Sélection Animale* 9: 539-540.
- MAURER, R.; STETTIER, P.; RUGGLI, N.; HOFMANN, M.; TRATSCHIN, J. D. 2005. Oronasal vaccination with CSF virus (CSFV) replicon particles with either partial or complete deletion of the E2 gene induces partial protection against lethal challenge with highly virulent CSFV. *Vaccine* 23(25): 3318-3328.
- MEYER, H.; LISS, B.; HERMANN, W.; TRAUTWEIN, G. 1980. Diaplazentare infektion von Schweinefeten mit dem virus der Europäischen Schweinepest (ESP). *Virologische und serologische untersuchungen in der postnatalen phase. Fortschritte der Veterinärmedizin. Supplement Zentralblatt Veterinärmedizin*. 30: 140-144.
- MEYERS, G.; RUMENAPF, T.; THIEL, H.J. 1989. Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology* 171: 555-567.
- MEYERS, G.; THIEL, H.J. 1996. Molecular characterization of pestiviruses. *Advances in Virus Research* 47: 53-118.
- MEYERS, G.; SAALMULLER, A.; BUTTNER, M. 1999. Mutations abrogating the Rnase activity in Glycoprotein E^{ms} of the Pestivirus Classical Swine Fever Virus lead to virus attenuation. *Journal of Virology* 73(12): 10224-10235.
- MOENNIG, V. 2000. Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy. *Veterinary Microbiology* 73: 93-102.
- MOENNIG, V.; PLAGEMANN, G.W. 1992. The pestiviruses. *Advances in Virus Research* 41: 53-98.
- MOORMANN, R.J.; WARMERDAN, P.A.; van der MEER, B.; SCHAAPER, W.M.; WENSOVOORT; HULST, M.M. 1990. Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain Brescia and mapping of the genomic region encoding envelope protein E1. *Virology* 177: 184-198.
- MOORMANN, R.J.; van GENNIP, H.G.; MIEDEMA, G.K.; HULST, M.M.; VAN RIJN, P.N. 1996. Infectious RNA transcribed from an engineered full-length cDNA template of the genome of a pestivirus. *Journal of Virology* 70: 763-770.
- MOORMANN, R.J.; BOUMA, A.; KRAMPS, J.A.; TERPSTRA, C.; DE SMIT, H.J. 2000. Development of a classical swine fever subunit marker vaccine and companion diagnostic test. *Veterinary Microbiology* 73: 209-219.
- MORGAN, N.O.; MILLER, L.D. 1976. Muscidae (Diptera): Experimental vectors of hog cholera. *Journal Medical Entomology* 5: 78-81.
- NARITA, M.; KAWASHIMA, K.; SHIMIZU, M. 1996. Viral antigen and B and T lymphocytes in lymphoid tissue of gnotobiotic piglets infected with hog cholera virus. *Journal of Comparative Pathology*. 114: 257-263.
- NARITA, M.; KIMURA, K.; TANIMURA, N.; OZAKI, H. 1999. Immunohistochemical detection of hog cholera virus antigen in paraffin wax-embedded tissues from naturally infected pigs. *Journal of Comparative Pathology* 121: 283-286.
- NICHOLS, W.; LEVAN, A.; HALL, B.; OSTERGREN, G. 1962. Measles-associated chromosome breakage. *Preliminary Communication. Hereditas* 48: 367-370.
- OFFICE INTERNATIONAL ÉPIZOOTIES (O.I.E.) 1998. *International Animal Health Code*. Paris: 147-154.
- OFFICE INTERNATIONAL ÉPIZOOTIES (O.I.E.) 1999. *World Animal Health 1998, vol. 2*. Paris: 374-375.
- OFFICE INTERNATIONAL ÉPIZOOTIES (O.I.E.) 2000. *World Animal Health 1999, vol. 2*. Paris: 545-551.
- PALACIOS, S.; GENGHINI, R.; TIRANTI, I.

- 2003: Evaluación del efecto genotóxico de una nueva vacuna contra la Peste Porcina Clásica. BAG (Basic & Applied Genetics) Vol. XV. (Supplement 2), pág. 56.
- PATON, D.J.; MCGOLDRICK, A.; GREISER-WILKE, I.; PARCHARIYANON, S.; SONG, J.Y.; LIOU, P.P.; STADEJK, T.; LOWINGS, J.P.; BJÖRKLUND, H.; BELAK, S. 2000. Genetic typing of classical swine fever virus. *Veterinary Microbiology* 73: 137-157.
- PEREDA, A.J.; GREISER-WILKE, I.; SCHMITT, B.; RINCON, M.; MOGOLLON, J.D., SABOGAL, Z.Y.; LORA, A.M.; SANGUINETTI, H., PICCONE, M.E. 2005. Phylogenetic analysis of classical swine fever virus (CSFV) field isolates from outbreaks in South and Central America. *Virus Res.* 110(1-2): 111-118.
- PISTOL DE RUBEL, D.; TEYSSIE, A. 1970. Alteraciones cromosómicas producidas por el virus Junín en un cultivo mixto. *Medicina* 30: 62-66.
- QUEZADA, M.; CAYO, L.; CARRASCO, L.; ISLAS, A.; LECOCQ, C.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J.C.; SIERRA, M.A. 2000. Characterization of lesions caused by a South American virulent isolate ('Quillota') of the Hog Cholera Virus. *Journal of Veterinary Medicine* 47: 411-422.
- ROMANINI, S. 2001. Respuesta inmune celular en la mucosa digestiva en la Peste Porcina Clásica. Tesis de Doctorado en Veterinaria. Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, España.
- RUBES, J. 1987. Chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges in swine. *Mutation Research* 191: 105-109.
- RUBES, J.; BORKOVEC, L.; HORINOVA, Z.; URBANOVA, J.; PROROKOVÁ, I.; KULIKOVA, L. 1992. Cytogenetic monitoring of farm animals under conditions of environmental pollution. *Mutation Research* 283: 199-210.
- SAN MARTIN, J.; VIDAL, A. 1998. Epizootiología de la peste porcina clásica. *Porci* 47: 15-24.
- SATO, M.; MIKAMI, O.; KOBAYASHI, M.; NAKAJIMA, Y. 2000. Apoptosis in the lymphatic organs of piglets inoculated with classical swine fever virus. *Veterinary Microbiology* 75: 1-9.
- SAUTTER, J.H.; YOUNG, G.A.; LUEDKE, A.J.; KITCHELL, R.L. 1953. Experimental production of malformations and other abnormalities in fetal pigs by means of attenuated Hog cholera Virus. In. *Proceeding 90th Annual Meeting American Veterinary Medical Association* 146-150.
- SCHWEINITZ, E.A.; DORSET, M. 1904. New facts concerning the etiology of hog cholera. U.S. Department of Agriculture, 20th Annual Report of the Bureau of Animal Industry: 157-162.
- SEBUNYA, T.N.; SAUNDERS, J.R. 1983. Hemophilus pleuropneumoniae infection in swine: a review. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 182: 1331-1337.
- SHAW, M.W. 1970. Human chromosome damage by chemical agents. *Annual Review Medicine* 21: 409-432.
- SIERRA, M.; MARTIN de las MULAS, J.; SANCHEZ, C.; QUESADA, M. 1998. La peste porcina clásica: características clínicas y anatomopatológicas. *Porci* 47: 37-49.
- SOLDATOVIC, B.; ZIMONIJC, D.; HAIDARY, M., CVETKOVIC, M. 1981. Chromosomal set changes in domestic swine caused by swine fever virus. *Acta Veterinaria, Yugoslavia* 31:1, 27-33.
- STEGEMAN, A.; ELBERS, A.; SMIT, H.; MOSER, H.; SAMK, J.; PLUIMERS, F. 2000. The 1997-1998 epidemic of classical swine fever in the Netherlands. *Veterinary Microbiology* 73: 183-196.
- STICH, H.F.; HSU, T.C.; RAPP, F. 1964a. Viruses and mammalian chromosomes. 1. Localization of chromosome aberrations after infection with Herpes Simplex Virus. *Virology* 22: 439-445.
- STICH, H.F.; VAN HOOSIER, G.L.; TRENTIN, J.J. 1964b. Viruses and mammalian chromosomes. Chromosome aberrations by human adenovirus type 12. *Experimental Cell Research* 34: 400-403.
- STICH, H.F.; YOHAN, D.S. 1970. Viruses and chromosomes. *Progress in Medicine and Virology* 12: 78-127. Karper, Switzerland.
- SUMMERFIELD, A.; KNÖTIG, S.; McCULLOUGH, K. 1998. Lymphocyte apoptosis during Classical Swine Fever: Implication of Activation-Induced cell death. *Journal of Virology* 72: 1853-1861.
- SUMMERFIELD, A.; KNÖTIG, S.; TSCHUDIN, R.; McCULLOUGH, K. 2000. Pathogenesis of granulocytopenia and bone marrow atrophy during Classical Swine Fever involves apoptosis and necrosis of uninfected cells. *Virology* 272: 50-60.
- SUMMERFIELD, A.; ZINGLE, K.; INUMARU, S.; McCULLOUGH, C. 2001. Induction of apoptosis in bone marrow neutrophil-lineage cells by classical swine fever virus. *Journal of General Virology* 82: 1309-1318.

- SUSA, M.; KÖNIG, M.; SAALMULLER, A.; REDDEHASE, M.J.; THIEL, H.-J. 1992. Pathogenesis of classical swine fever: B-lymphocyte deficiency caused by hog cholera virus. *Journal of Virology* 66: 1171-1175.
- SVC, 1997. Report on the Scientific Veterinary Committee. The use of marker vaccines in the control of infectious diseases in particular classical swine fever. Brussels, VI/8119/97. Commission of the European Community, Brussels, Belgium, pp. 1-14.
- TERPSTRA, C.; DE SMIT, A.J. 2000. The 1997-1998 epizootic of swine fever in the Netherlands: control strategies under a non-vaccination regimen. *Veterinary Microbiology* 77: 3-15.
- TIDWELL, M.A.; DEAN, W.D.; COMBS, G.P.; ANDERSON, D.W.; COWART, W.O.; AXTELL, R.C. 1972. Transmission of hog cholera virus by horse flies (Tabanidae: Diptera). *American Journal of Veterinary Research* 33: 615-622.
- TIRANTI, I.; GENGHINI, R.; WITTOUCK, P.; ZUBELDÍA, D. 1998b. Análisis de imágenes de pulverizaciones cromosómicas inducidas por el virus de la peste porcina clásica. *Mendeliana* 13: 3-11.
- TRAUTWEIN, G. 1988. Pathology and pathogenesis of the disease. En: *Classical swine fever and related viral infections*. Ed. B. Liess, Martinus Nijhoff Publishing, Boston.
- UTTENTHAL, A.; LE POTIER, M.; ROMERO, L.; DE MIA, G.; FLOEGEL-NIESMANN, G. 2001. Classical swine fever (CSF) marker vaccine. Trial I. Challenge studies in weaner pigs. *Veterinary Microbiology* 83: 85-106.
- VAN OIRSCHOT, J.T.; DE JONG, D.; HUFFELS, N.D. 1981. Effect of infections with swine fever virus on immune functions. I. Response of lymphocytes from blood and lymphoid organs from infected and normal pigs to anti-immunoglobulin serum and protein A. *Veterinary Microbiology* 6: 41-57.
- VAN OIRSCHOT, J.T.; DE JONG, D.; HUFFELS, N.D. 1983. Effect of infections with swine fever virus on immune functions II. Lymphocyte response to mitogens and enumeration of lymphocyte subpopulations. *Veterinary Microbiology* 8: 81-95.
- VAN OIRSCHOT, J.T. 1992. Hog cholera. En: Leman *et al.*, Ed. *Diseases of swine*. 7th ed. Iowa State University Press, USA.
- VAN OIRSCHOT, J.T. 1999. Hog cholera. En: *Diseases of Swine*. Iowa State University Press, USA.
- VILLARINI, M.; MORETTI, M.; PASQUINI, R.; SCASELLATI-SFORSOLINI, G.; FATIGONI, C.; MARCARELLI, M.; MONARCA, S.; RODRIGUEZ, A. 1998. In vitro genotoxic effects of the insecticide deltamethrin in human peripheral blood leukocytes: DNA damage (comet assay) in relation to the induction of sister-chromatid exchanges and micronuclei. *Toxicology* 130: 129-139.
- VOLKER, K.; LANGL, E. 2004. Development of maternal antibodies after oral vaccination of young female wild boar against classical swine fever. *Veterinary Microbiology* 103(1-2): 115-119.
- WENGLER, G. 1991. Family Flaviviridae. En R.I. B. Francki, C.M. Fauquet, D.L. Knudson, and F. Brown. Ed. *Classification and nomenclature of viruses*. Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Berlin: Springer Verlag: 223-233.
- WENSVOORT, G.; TERPSTRA, C.; BOONSTRA, J.; BLOEMRAAD, M.; VAN ZAANE, D. 1986. Production of monoclonal antibodies against swine fever virus and their use in laboratory diagnosis. *Veterinary Microbiology* 12: 101-108.
- WISE, G.H. 1986. Eradication of hog cholera from the United States. En: Woods, G.T. Ed. *Practices in Veterinary Public Health and preventive medicine in the United State*. Iowa State University press. USA.
- WONG, M.L., LIU, J.J., HUANG, C.; CHEN, J.W.; CHANG, T.J. 1998. Molecular cloning and nucleotide sequence of 3'-terminal region of Classical Swine Fever Virus LPC vaccine strain. *Virus Genes* 17: 213-218
- ZAMORANO-PONCE, E.; FERNANDEZ, J.; VARGAS, G.; RIVERA, P.; CARBALLO, M.A. 2004. Antimutagénesis: Extracto acuoso de cedrón Vs Cisplatino. *Basic and Applied Genetics* Vol. XVI: 29.