

Marcadores genéticos en el caballo

II. Grupos sanguíneos (G.S.)

Pablo Aguilar Sánchez *

Pedro-Pablo Rodríguez Gallardo **

RESUMEN

En anteriores trabajos publicados en esta revista se trató el primer gran grupo de marcadores genéticos del caballo, el polimorfismo bioquímico sanguíneo (P.B.). En la presente ocasión nos proponemos estudiar el segundo grupo de marcadores genéticos: los grupos sanguíneos (G.S.).

Se ha procedido a definir los grupos sanguíneos así como a revisar su nomenclatura y los conceptos de factor, sistema y fenogrupos.

Describimos la metodología de obtención de la batería de sueros reactivos para tipificación antigénica, hecho singular y complejo por no comercializarse dicha batería de reactivos. Se analizan las cuatro etapas fundamentales del proceso cuales son, isoimmunización de una pareja donante-receptora, estudio del suero inmune (S.I.), estudio del suero absorbido (S.A.) y titulación del suero reactivo.

Por último se expone el esquema de análisis de marcadores genéticos.

SUMMARY

In previous works published in this magazine, attention was given to the first main group of genetic markers in horses, biochemical polymorphism (B.P.) of the blood. On this occasion we propose to study the second group of genetic markers: blood groups (B.G.).

The blood groups were defined and their nomenclature reviewed, and the concepts of factor, system and phenogroup.

We describe the methodology for obtaining the battery of reactive serums for antigenic typing, an unusual and complex matter since these reactive bacteria are not commercialised. There is an analysis of the four basic stages of the process which are: isoimmunisation of a receptor/donor pair, study of the immune serum (I.S.), study of absorbed serum (A.S.), and naming of the reactive serum.

Lastly, the scheme for analysing genetic markers is explained.

INTRODUCCION

En anteriores trabajos publicados recientemente en esta misma revista, se realizó una revisión histórica de los grupos sanguíneos (G.S.) en el hombre y en los équidos domésticos y se estudió el polimorfismo bioquímico sanguíneo (P.B.) como marcador genético. En este artículo nos ocupamos del segundo grupo de marcadores genéticos cuales

son los grupos sanguíneos. Ambas determinaciones biológicas poseen un inestimable valor en el control de filiación e identidad individual como garantías de rigor y credibilidad de los Libros Genealógicos, condición indispensable para emprender tareas de mejora genética sobre bases ciertas científicamente contrastadas, amén de la resolución de casos de exclusión de paternidad.

Una vez revisados el polimorfismo bioquímico sanguíneo (P.B.) y los grupos sanguíneos (G.S.) como marcadores genéticos, en un próximo artículo, pretendemos analizar con detalle las aplicaciones de dichos marcadores, que hasta ahora sólo han sido citadas someramente.

DEFINICION Y NOMENCLATURA DE GRUPOS SANGUINEOS: FACTORES, SISTEMAS Y FENOGRUPOS

Los factores de G.S. constituyen sustancias químicas de la familia de las glucoproteínas, que se encuentran ancladas en el exterior de la membrana del eritrocito formando parte de su estructura.

Tienen todas las características de los marcadores genéticos, ya descritas en trabajos anteriores publicados por nosotros en esta misma revista. Es decir se trata de caracteres codificados en el DNA, que por tanto presentan las características inherentes al material

* Coronel Veterinario Diplomado en Genética y Reproducción

** Capitán Veterinario Diplomado en Genética y Reproducción

Laboratorio de Grupos Sanguíneos. Servicio de Diagnóstico de Hemotipos. Jefatura de Cría Caballar. Córdoba.

genético, o sea que son caracteres constantes, permanentes, indelebles, presentes en el organismo a lo largo de toda la vida, y que por consiguiente "marcan" al individuo. Pero además poseen una característica más muy valiosa, ésta es su marcado carácter antigénico. Por tanto, basándonos en el principio de especificidad inmunológica se les puede poner de manifiesto, mediante una reacción de antígeno-anticuerpo de aglutinación o de hemólisis.

El problema radica, como posteriormente veremos, en la obtención de la batería de antisueros reactivos específicos.

La capacidad antigénica de estas sustancias o lo que es igual la capacidad de creación de anticuerpos en un receptor varía mucho de unas a otras, mientras que hay factores muy activos, a la tercera semana de inoculación producen sueros con una titulación de 1/256 y más, hay otros cuya actividad es más lenta, necesitando a veces tres y cuatro reinmunizaciones, que con los periodos de descanso suponen 2 ó 3 años de trabajo.

La inoculación se puede realizar por diferentes vías siendo la más empleada la intravenosa en inyección semanal durante 4 a 6 semanas consecutivas.

El concepto de Factores y Sistemas en los comienzos del estudio de los grupos sanguíneos no era posible separarlo e incluso ambos conceptos se mezclaban con el de grupo sanguíneo. Así de esta manera en un principio, LANDOIS en 1875 y BORDET en 1898 sólo hayan las incompatibilidades de sangre por existir determinadas sustancias en el suero de un animal que actuaban aglutinando o hemolizando los glóbulos rojos de otro individuo.

LANDSTEINER (1901) estableció cuatro casos de diferencias hemáticas en la especie humana (A, B, AB, O) agrupando a los humanos en cuatro grupos, de aquí que en base a esta distribución se comience a acuñar el término **grupo sanguíneo**.

Más tarde en 1927, el mismo LANDSTEINER y LEVINE descubren otros dos "Sistemas" el MN y P en la especie humana comenzándose a emplear el concepto de Sistema.

Con posterioridad a estos trabajos, en 1961, STORMONTY al estudiar los antígenos equinos, 16 en total, de los que seis se correspondían con los 11 detectados por M. PODLIACHOUK en 1957 y la relación de parentesco existente entre los individuos que los poseían, llega a la conclusión de que dichos antígenos se agrupan en Sistemas y de este modo considera que se puede hablar de 8 Sistemas de grupos sanguíneos.

A partir de 1957-58, M. PODLIACHOUK, y en sus trabajos de investigación sobre los antígenos hemáticos del caballo, comienza a hablar de factores para designar a cada uno de estos antígenos, término que sigue empleándose hasta nuestros días.

Otra de las consecuencias que se sacaron de estos estudios parentales efectuados para ver la relación existente entre los distintos factores, fue el detectar que algunos de ellos se heredaban juntos por encontrarse formando parte del mismo gen, a este grupo de factores se los denominó Fenogrupo constituyendo los alelos correspondientes del Sistema a que pertenecen.

Como podemos ver por todo lo expuesto hoy se barajan unos términos que a veces no son bien interpretados con respecto al concepto que de ellos tenemos. Si bien se sigue hablando de "Grupos sanguíneos" como concepto genérico y amplio de todo lo que se refiere a una serie de características antigénicas de los glóbulos rojos de la

sangre, conviene precisar más con los términos de Sistemas o conjunto de factores ordenados por medio del análisis genérico de las poblaciones según manifiesta el Prof. Dr. WEBER en su trabajo "Grupos sanguíneos en el caballo de Friburgo" (1972).

En la década de los 70, de gran trascendencia para los estudios y trabajos de investigación en el caballo se hicieron varias revisiones con respecto a nomenclatura de factores y sistemas. Así mismo se detectaron la presencia de diferentes alelos en los distintos sistemas y se consolidaron estos en número de siete: A - C - D - K - P - Q y U.

Otra importantísima etapa, y ésta podemos denominarla como la fase aplicativa de la anterior, se constituye a partir de los comienzos del 80 en que Laboratorios de diferentes países del mundo comienzan a ofrecer un servicio a la ganadería equina para estudiar sus individuos y controlar su filiación dado que los grupos sanguíneos correspondientes a un individuo son heredados en base a los principios de las Leyes de Mendel.

Con las investigaciones realizadas al estudiar diferentes familias se comprobó que determinados factores pertenecientes a un mismo Sistema se heredaban juntos, constituyendo de este modo lo que se ha dado en llamar fenogrupos, los cuales están controlados por alelos.

El primer alelo descrito fue el Af (PODLIACHOUK, 1957); más tarde, en 1964, STORMONT y SUZUKI, describen una serie de alelos de los sistemas A, P y Q.

El sistema D ha sido analizado por SANDBERG (1973-74), encontrando en el mismo seis factores que forman ocho alelos.

PODLIACHOUK (1975) asigna al sistema A siete alelos y al D ocho.

En 1979, PODLIACHOUK y MERIAUX aportan al Congreso de Leningrado un trabajo sobre "Dos nuevos factores en

NOMENCLARUTA DE GS PUBLICADA POR ISABR PARA EL TEST DE COMPARACION 1987

Sistema	Factores	Alelos Reconocidos
A	Aa Ab Ac Ad Ae Af Ag	A ^a A ^{adf} A ^{adg} A ^b A ^{bc} A ^{bce} A ^c A ^{cd} A ^{ce} A ^e A ⁻
C	Ca	C ^a C ⁻
D	Da Db Dc Dd De Df Dg Dh Di Dk Dl Dm Dn Do Dp	D ^{adi} D ^{adin} D ^{bcm} D ^{cefgm} D ^{ceginm} D ^{cf} D ^{cgm} D ^{cgmp} D ^{cfgkm} D ^{del} D ^{delo} D ^{dfkl} D ^{dghm} D ^{dki} D ^{dln} D ⁻
K	Ka	K ^a K ⁻
P	Pa Pb Pc Pd	p ^a p ^{ac} p ^{acd} p ^{a d} p ^b p ^{bd} p ^d p ⁻
Q	Qa Qb Qc	Q ^{abc} Q ^{ac} Q ^b Q ^c Q ⁻
U	Ua	U ^a U ⁻

Tabla I

DISTRIBUCION DE FACTORES, FENOGRUPOS Y GENOTIPO

SISTEMA A	Aa	Ab	Ac	Ad	Ae	Af	Ag
	+	+	+	+	+	+	-
	FENOTIPO						
	FENOGRUPOS	A^{adf} A^{bce}		GENOTIPO → adf/bce			

Tabla II

el sistema D de los grupos sanguíneos en el caballo" y en él consideran que los alelos de dicho sistema alcanzan un número de doce.

Según la última nomenclatura publicada por la Asociación Internacional para la Investigación de Grupos Sanguíneos Animales (ISABR), correspondiente a 1987 (Tabla I), se reconocen 7 sistemas de grupos sanguíneos que agrupan a 32 factores, aglutinantes y hemolíticos, controlados por un total de 46 alelos.

Cada sistema está gobernado por un gen en un locus constituyendo una serie multialélica de genes dominantes. Cada gen (alelo) codifica a un grupo de factores denominado fenogrupo, ya que los factores de GS, aunque se determinan fenotípicamente individualmente, mediante la batería de sueros reactivos, la interpretación genotípica es su herencia en bloque (alelos), concretamente dos por individuo, obedeciendo al principio genético de que el genoma procede la mitad de un progenitor y la otra mitad del otro, en virtud de la dotación haploide de los gametos que en la anfimixis, reconstituye el número diploide de la especie.

En la Tabla II se puede observar cómo un fenotipo determinado para el sistema A, se ajusta a dos fenogrupos reconocidos, conformando el genotipo del individuo para el sistema A.

Como se puede deducir de lo expuesto, la labor de investigación va paralela a la del Servicio de Diagnóstico dado que de un año para otro hay nuevos aportes de factores y alelos en los diferentes sistemas.

En la Conferencia Internacional correspondiente al Comparison Test (1986) celebrada en Helsinki (Finlandia), nuestra Sección de investigación presentó un trabajo acerca de la presencia de un nuevo alelo en el sistema D, el $D^{i^{gsm}}$, contrastado con el caballo de Pura Raza Española y no determinado hasta el día de la fecha en las restantes razas del mundo estudiadas.

METODOLOGIA DE LA OBTENCION DE UN SUERO REACTIVO (SR)

Aquí radica el principal problema de la detección de los GS ya que, al contrario de lo que ocurre en los humanos, el caballo no tiene isoaglutininas naturales o si las presenta es a muy bajo título. Por tanto en el hombre resulta bastante fácil la obtención de SR.

Al no contar en el caballo con esta posibilidad y no comercializarse la batería de SR, cada laboratorio ha de preparar sus propios sueros y aquí

estriba la dificultad más importante como exponemos a continuación.

La metodología se compone de varias etapas:

1. Isoinmunización de una pareja donante-receptor

a) Inoculación intravenosa semanal de 10 ml. de sangre del donante en el receptor durante seis semanas. Como podemos observar en la Tabla III, se espera que el receptor produzca anticuerpos anti-Ca, puesto que el donante posee antígeno Ca que no posee el receptor.

b) Valoración de la respuesta inmune del receptor mediante titulación con el donante para comprobar la existencia de los anticuerpos esperados.

Pauta a seguir según la calidad de la respuesta inmune:

— Negativa: descanso de la pareja durante seis meses y reemprender una nueva serie de inmunizaciones. En nuestro laboratorio hemos sometido a muchas parejas a seis u ocho tandas de inmunizaciones (3-4 años de espera).

— Positiva: sangría del receptor para obtención de suero inmune (SI) y proceder a su estudio.

Lógicamente cuantas más parejas haya implicadas en la obtención de un

antisuero antes se conseguirá. De aquí la necesidad de disponer de un amplio número de caballos en estas tareas.

2. Estudio del suero inmune (SI). Fases.

2.1. Test de glóbulos rojos

Tiene por objeto valorar la "potencia" del SI y establecer una aproximación sobre la presencia de otros anticuerpos presentes en el suero aparte de los esperados. Para esta prueba se necesitan eritrocitos de una veintena de caballos.

2.2. Tabla cruzada: absorciones para purificación

También empleamos eritrocitos de 20-30 caballos para elegir aquel individuo, que mediante sus antígenos eritrocitarios puestos en contacto con el SI (absorción), neutralicen en dicho SI todos los anticuerpos menos el deseado, obteniéndose un suero absorbido (SA).

3. Estudio del suero absorbido (SA): Test de pureza

Permite asegurarnos que en el SA únicamente permanecen los anticuerpos esperados, confiriéndosele a ese suero absorbido aptitud de suero reac-

ELECCION PAREJA DONANTE-RECEPTOR

Fórmulas Grupos Sanguíneos													
CAPRICHOSO (donante)		Ca	Dd	Dk	DI	Df	Pa	Qc					
HONRADO (receptor)	Ab	↓	Dc	Dd	Dk	DI	De	Df	Dg	Dm	Pa	Qc	Ua

Tabla III

tivo (SR) para el factor en concreto que vamos buscando.

4. Titulación del SR

Mediante esta prueba calibramos la actividad del suero reactivo y su riqueza en el anticuerpo deseado.

De todo ello se deduce que la obtención de SR es una labor muy tediosa y bastante larga en el tiempo. Las técnicas son complejas necesitando en todas ellas gran cantidad de sangre de un número abundante de caballos. De aquí la importancia de que este tipo de laboratorios dispongan lo más próximo posible un colectivo numeroso de caballos que para el caso del nuestro es el 7º Depósito de Sementales del Estado, cuya colaboración es importantísima, agradeciendo desde aquí su inestimable colaboración.

ANALISIS DE GS

Preparación de la muestra y determinaciones con arreglo al esquema de la figura 1:

En cada pocillo de una placa de "microtiter" se deposita una gota de SR anti-cada-factor. Como hay 32 factores disponemos de una línea de 32 pocillos. A continuación añadimos una gota de glóbulos rojos lavados y diluidos del caballo a diagnosticar. Según los factores sean aglutinantes o hemolíticos, se observa si hubo reacción antígeno-anticuerpo positiva (presencia del factor) o negativa (ausencia del factor).

En la fotografía se observa un caso de aglutinación positiva y cinco de hemólisis positiva. (Figura 2)

ANALISIS DE G.S.: PREPARACION DE LA MUESTRA Y DETERMINACIONES

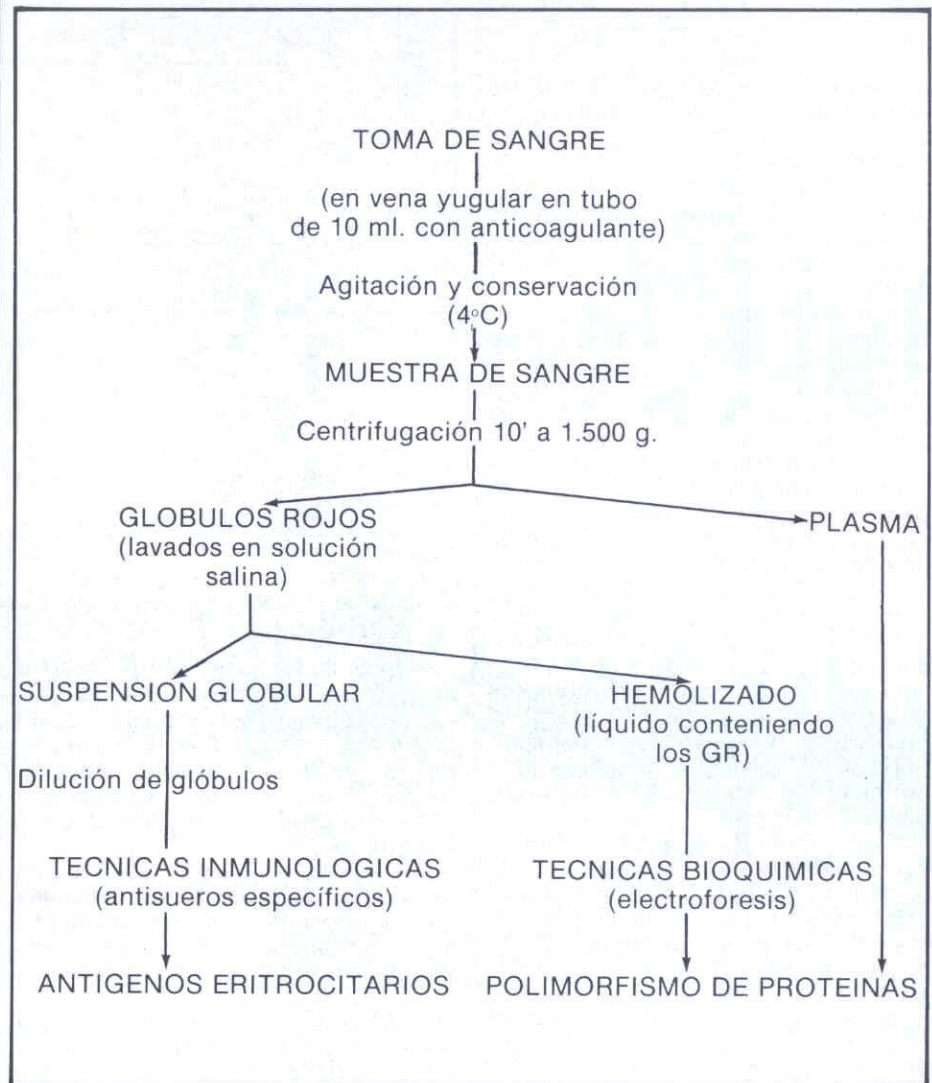


Figura 1

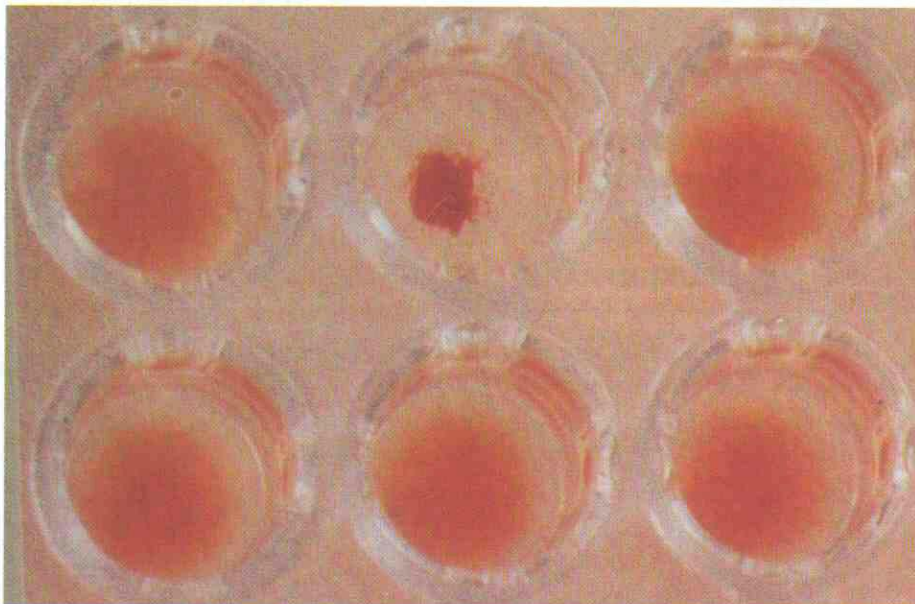


Figura 2: Reacciones de hemaglutinación y hemólisis.

BIBLIOGRAFIA

- 1.— BORDET, J. "Sur l'agglutination et la dissolution des globules rouges par le sérum d'animaux injectés de sang défibriné". Ann. Inst. Pasteur. 12, pags. 688-695. 1898.
- 2.— LANDSTEINER, K. "Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes". Wien. Klin. Wochschr., 14, pags. 1.132-1.134. 1901.
- 3.— LANDSTEINER, K. and P. LEVINE. "A new agglutinable factor differentiating individual human bloods". Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 24, pags. 600-602. 1927.
- 4.— PODLIACHOUK, L. "Les antigènes de groupes sanguins des équides et leur transmission héréditaire". Thèse. Fac. Sc. Paris. 1957.
- 5.— PODLIACHOUK, L. "Marqueurs génétiques sanguins chez les chevaux de course". Ann. Génét. Sel. Anim. 7 (4), pags. 339-355. 1975.
- 6.— PODLIACHOUK, L. et J.C. MERIAUX. "Two new factors of the D blood group system in the horse". Proc. 16 th Conf. Anim. Blood Groups Biochem. Polymorphism. Leningrado, 4, pags. 117-123. 1979.
- 7.— SANDBERG, K. "The D blood group system of the horse". Anim. Blood Groups Biochem. Genet., 4, pags. 194-205. 1973.
- 8.— SANDBERG, K. "Blood Typing of Horses: current status and application to identification problems". Proc. I Congrès Mondial de Génétique appliqué à l'Élevage. Madrid, t. I Sessions Plénières, pags. 253-265. 1974.
- 9.— STORMONT, C. Citado por AGUILAR, P. "Grupos sanguíneos en el caballo español". 1984. Tesis Doctoral. Univ. Córdoba. 1961.
- 10.— STORMONT, C. and Y. SUZUKI. "Genetic systems of blood groups in horses". Reprint from Genetics, 50, pags. 915-929. 1964.
- 11.— WEBER, W. "Blutgruppen beim Freiburger Pferd". 1972.