



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Variabilidad genética del Complejo Mayor de Histocompatibilidad equino y su importancia en la respuesta inmunitaria.

Genetic variability of the equine Major Histocompatibility Complex and its importance in the immune response.

Autor/es

Paula Sanz Sancho

Director/es

Sara Fuente Franco  
Mirta García Martínez

Facultad de Veterinaria

2023

---

## ÍNDICE

1. Resumen/Abstract .....	3
2. Introducción .....	5
2.1. Complejo Mayor de Histocompatibilidad.....	5
2.2. Respuesta inmunitaria.....	5
3. Justificación y objetivos.....	6
4. Metodología .....	7
5. Resultados y discusión.....	8
5.1. Variabilidad del Complejo Mayor de Histocompatibilidad.....	8
5.1.1. Análisis laboratorial del MHC equino mediante marcadores microsatélites .....	15
5.2. Respuesta inmunitaria.....	18
5.2.1. Medicina regenerativa.....	22
5.2.2. Resistencia y susceptibilidad a enfermedades .....	27
6. Conclusiones/ <i>Conclusions</i> .....	31
7. Valoración personal.....	33
7.1. Agradecimientos.....	33
8. Bibliografía.....	35

## 1. RESUMEN

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) es un conjunto de genes que codifican proteínas capaces de presentar antígenos a las células del sistema inmune. A través del serotipado se determinaron 19 serotipos del MHC equino, mientras que con el análisis de marcadores microsatélites se han encontrado un elevado número de haplotipos en las distintas razas estudiadas. La variabilidad del MHC difiere entre unas razas y otras, presentando algunas mayor cantidad de haplotipos distintos que otras, y está influenciada en gran medida por la estrategia reproductiva.

El sistema inmune es el encargado de proteger al organismo frente a agentes extraños a través de distintas respuestas y células inmunes. Las moléculas MHC presentan los antígenos a los linfocitos y se dividen en clase I y clase II. La clase de moléculas MHC que presenta los antígenos determina el tipo de respuesta y las células que se activan según el agente al que se exponen.

Aunque existen diferentes terapias regenerativas utilizadas para tratar lesiones musculoesqueléticas en caballos, las células madre mesenquimales (MSCs) son una de las más utilizadas tanto de forma autóloga como alogénica. El tratamiento alogénico puede presentar más beneficios terapéuticos, sin embargo, a pesar de que las MSCs cuenta con cierta capacidad inmunomoduladora, este tipo de administración puede desencadenar una respuesta humoral y celular en el paciente si su MHC no es compatible con el del donante, produciendo un fracaso del tratamiento. Por eso, para evitar el rechazo es interesante determinar los haplotipos tanto de donantes como de receptores.

También se han realizado diversos estudios sobre la relación entre la resistencia o susceptibilidad a enfermedades y el MHC equino en los que se ha podido determinar la asociación de ciertos haplotipos y alelos con mayor resistencia o susceptibilidad a enfermedades concretas, pero sigue siendo necesaria más investigación sobre este tema.

## 1. ABSTRACT

The Major Histocompatibility Complex (MHC) is a group of genes encoding proteins capable of presenting antigens to immune system cells. Using serotyping, 19 equine MHC serotypes were determined, on the other hand, using microsatellite marker analysis a large number of haplotypes have been found in the different breeds studied. MHC variability differs between breeds, with some having more different haplotypes than others, and it is largely influenced by the reproductive strategy.

The immune system is responsible for protecting the body against foreign agents through different responses and immune cells. MHC molecules present antigens to the lymphocytes and they are divided into class I and class II. The class of MHC molecules that presents the antigens determines the type of response and the cells that are activated according to the agent to which they are exposed.

Although there are different regenerative therapies to treat musculoskeletal injuries in horses, mesenchymal stem cells (MSCs) are one of the most commonly used both autologously and allogeneically. The allogeneic treatment could have more therapeutic benefits, however, even though MSCs have some immunomodulatory capacity, this type of administration can trigger a humoral and cellular response in the patient if the patient's MHC is not compatible with that of the donor, resulting in treatment failure. Therefore, in order to avoid rejection, it is interesting to determine the haplotypes of both donors and recipients.

There have also been several studies on the relationship between disease resistance or susceptibility and the equine MHC that have determined the association of certain haplotypes and alleles with increased resistance or susceptibility to specific diseases, but more research on this subject is still needed.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Complejo Mayor de Histocompatibilidad

Se denomina Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés *Mayor Histocompatibility Complex*) al conjunto de genes que codifican proteínas de la superficie celular encargadas de la presentación antigénica durante la respuesta inmunitaria (Hughes y Nei, 1992).

Los genes del MHC, también llamado en los caballos sistema ELA (*Equine Leukocyte Antigen*), presentan un polimorfismo significativo (Alexander, Bailey y Woodward, 1987) y están divididos en tres regiones denominadas clase I, clase II y clase III (Gustafson *et al.*, 2003).

Se conocen 19 serotipos del sistema ELA (Lazary *et al.*, 1988), sin embargo, el serotipado es un método que presenta ciertas limitaciones además de ser costoso por lo que se han desarrollado nuevas técnicas como el análisis de marcadores microsatélites para el estudio del sistema ELA. Los microsatélites son fragmentos de ADN que se repiten y su análisis consiste en la amplificación de dichos fragmentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) y la valoración de su tamaño mediante electroforesis capilar para determinar los alelos para cada microsatélite (Tseng *et al.*, 2010).

El conjunto de los alelos para cada microsatélite de un individuo conforma el haplotipo del MHC de ese individuo. Identificar los haplotipos del MHC de los caballos no solo permite conocer la variabilidad dentro de la especie, sino también entre distintas razas (Tseng *et al.*, 2010; Sadeghi *et al.*, 2018).

### 2.2. Respuesta inmunitaria

El sistema inmune es el encargado de proteger al organismo frente a agentes externos como virus, bacterias y hongos, pero también frente a agentes internos como células cancerosas. Por desgracia, el sistema inmune también provoca reacciones alérgicas, rechazo de trasplantes y desarrollo de enfermedades autoinmunes (Kafrawy, 2002).

La respuesta inmunitaria está dividida en la respuesta innata, que actúa de forma general, y la respuesta adaptativa, que es más específica. Ambas respuestas están interrelacionadas y actúan en conjunto frente a los agentes extraños (Mak y Saunders, 2005).

Así mismo se puede dividir la respuesta inmunitaria en respuesta humoral y respuesta mediada por células. El principal objetivo de la respuesta humoral es producir anticuerpos contra antígenos extraños, mientras que la respuesta mediada por células se centra en la destrucción de células propias infectadas o de células ajenas (Kafrawy, 2002).

Uno de los componentes importantes tanto en la respuesta humoral como en la celular son las moléculas MHC que se encuentran en las superficies de las células. Estas moléculas son las encargadas de presentar los antígenos a las células del sistema inmune para desencadenar una respuesta inmunitaria (Kafrawy, 2002; Mak y Saunders, 2005).

La implicación del MHC con la respuesta inmunitaria es importante a la hora de valorar las terapias regenerativas alogénicas. El objetivo de la medicina regenerativa es reparar y restaurar los tejidos dañados (Dahlgren, 2018) y está dividida en dos grandes grupos. Uno de ellos está formado por las terapias que utilizan factores de crecimiento y productos hemoderivados autólogos siendo el plasma rico en plaquetas (PRP) uno de los más utilizados en caballos (Smith, Garvican y Fortier, 2014; Dahlgren, 2018; Ribitsch, Oreff y Jenner, 2021) y el otro grupo está compuesto por las terapias regenerativas basadas en el uso de células madre. Las más utilizadas en medicina equina son las células madre mesenquimales (MSCs por sus siglas en inglés *Mesenchymal Stem Cells*), sobre todo para el tratamiento de lesiones del aparato locomotor (Smith, Garvican y Fortier, 2014).

En los caballos los PRPs y las MSCs se utilizan para el tratamiento de lesiones del sistema musculoesquelético, principalmente desmopatías y tendinopatías, debido a que las lesiones en tendones y ligamentos son las más comunes en estos animales. Así mismo, la similitud de estas estructuras y sus lesiones con las de los humanos, permite extrapolar los hallazgos en medicina equina a medicina human y viceversa (Spaas, Guest y Van De Walle, 2012; Smith, Garvican y Fortier, 2014).

Las MSCs pueden utilizarse tanto de forma autóloga como alogénica. El uso de MSCs alogénicas es más conveniente por su posible uso inmediato, pero pueden dar lugar a reacciones de rechazo por el sistema inmune del paciente si las MSCs del donante no son compatibles para el MHC del receptor (Schnabel *et al.*, 2014; Pezzanite *et al.*, 2015).

### 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Hoy en día, conocer la variabilidad genética del MHC equino tiene gran importancia para evaluar la diversidad genética existente y la aptitud inmunológica de una población.

Entre otras aplicaciones, la determinación de los haplotipos del MHC permite conocer la compatibilidad donante-receptor. Esta compatibilidad es imprescindible a la hora de llevar a cabo terapias regenerativas alogénicas con productos ortobiológicos, para evitar rechazos y maximizar la eficacia del tratamiento. La utilización de estas terapias regenerativas en el

tratamiento de patologías comunes, como por ejemplo las tendinitis, desmitis u osteoartritis, ha tenido un desarrollo exponencial en los últimos años en el mundo equino.

Por otro lado, la asociación del MHC con la resistencia o susceptibilidad a enfermedades permite relacionar ciertas patologías con determinados genotipos del MHC, por lo que conociendo los haplotipos del MHC se podría predecir la resistencia o susceptibilidad de un individuo a dichas patologías.

El objetivo principal de este trabajo fin de grado es realizar una revisión bibliográfica sobre la variabilidad genética del MHC en la especie equina, centrándose en la determinación de los haplotipos del MHC equino y su relación con la respuesta inmunitaria.

Así mismo, se plantean como objetivos secundarios el participar en el análisis laboratorial y determinación del haplotipo para el MHC equino y revisar la bibliografía publicada sobre la influencia del MHC como factor genético asociado a la resistencia o susceptibilidad a ciertas patologías equinas.

#### 4. METODOLOGÍA

Para alcanzar el objetivo principal, se realizó una búsqueda de la literatura científica disponible sobre la variabilidad genética del MHC equino en artículos científicos, libros especializados y trabajos académicos, utilizando las bases de datos PubMed, Web of Science, Google Scholar y Alcorce. Se incluyeron las palabras claves “*major histocompatibility complex*”, “MHC”, “*equine*”, “*microsatellites*”, “*haplotypes*”, “*immune response*”, “*immune system*”, “*regenerative medicine*”, “*mesenchymal stem cell*” y “MSC” así como sus combinaciones booleanas. Se centró la búsqueda en los artículos y material científico en inglés y español más recientes, desde enero de 2010 hasta julio de 2023, aunque se incluyó bibliografía más antigua dada su relevancia. Las referencias bibliográficas se han gestionado con el programa Mendeley usando el estilo bibliográfico Harvard BUZ.

Para la identificación de los haplotipos para el MHC equino, como objetivo secundario, se realizó la determinación según el protocolo y los resultados obtenidos de la revisión bibliográfica sobre la determinación del MHC, combinando las técnicas de PCR convencional y electroforesis capilar.

Así mismo, se revisó la bibliografía publicada sobre la influencia del MHC como factor genético asociado a la resistencia o susceptibilidad a ciertas patologías equinas, que se iban encontrando

en la bibliografía consultada anteriormente sobre el MHC equino y estaban relacionadas con enfermedades equinas.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. VARIABILIDAD DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD

El MCH es un conjunto de genes que codifican glicoproteínas localizadas en la superficie de las células. Estas glicoproteínas son capaces de unir péptidos extraños, provenientes de la degradación intracelular de patógenos, y presentarlos a los linfocitos T, formando parte de la respuesta inmunitaria específica. Por otro lado, también participan en la respuesta inmunitaria innata actuando sobre los receptores de la células *natural killer* (NK) (Hughes y Nei, 1992; Tallmadge *et al.*, 2010).

En los caballos el MHC se conoce como sistema ELA y presenta por lo menos 19 serotipos diferentes (Lazary *et al.*, 1988). Para determinar estos serotipos se realizaron 5 Talleres Internacionales sobre los aloantígenos linfocitarios del caballo. En estos talleres se llevaron a cabo distintos ensayos para evaluar la reacción de múltiples antisueros, obtenidos y repartidos en distintos laboratorios de varios países, con muestras de linfocitos de caballos de distintas razas. En el primer taller se designaron seis especificidades del sistema ELA, denominadas ELA-W1, W2, W3, W4, W5 y W6. Ya que ninguno caballo presentaba más de dos de estas especificidades se pensó que podían ser alelos de un mismo locus (Bull, 1983).

En el segundo taller se confirmaron las 6 especificidades anteriores y se añadieron 4 nuevos productos alélicos del locus ELA: ELA-W7, W8, W9 y W10. Y una especificidad de un locus independiente de ELA, denominado ELY-2.1 (Bailey *et al.*, 1984).

En el tercer taller se reconoció un nuevo alelo (ELA-W11) del locus ELA y un nuevo antígeno (ELY-1.1) no relacionado con el sistema ELA. Además, se confirmó que la frecuencia de aparición de los 11 alelos en distintas razas de caballos era diferente (Antczak *et al.*, 1986).

En el cuarto taller, los 10 primeras especificidades encontradas del sistema ELA, pasaron a denominarse A1-A10, ya que se aceptaron como antígenos del locus A. Se encontraron 10 nuevas especificidades (W12-W21) y se observó que ELA-W14, W15 y W19 estaban incluidas en ELA-W11. También se descubrió una nueva especificidad (ELY-1.2) independiente del sistema ELA, que se comportaba como un alelo codominante junto con ELY-1.2 del locus ELY-1. (Bernoco *et al.*, 1987)



En el quinto taller las especificidades ELA-W14, W15 y W19 se aceptaron como productos del ELA-A locus y pasan a denominarse ELA-A14, A15 y A19. También se identificaron dos nuevas especificidades W22 y W23. En total se aceptaron 13 antígenos como parte del ELA-A locus, sabiendo que quedan muchos alelos de este locus por identificar. Además, se definieron tres aloantígenos (W13, W22 y W23) como productos génicos de un segundo locus o loci dentro de la región ELA (Lazary *et al.*, 1988).

Los genes del MHC están separados en tres regiones, clase I, clase II y clase III, siendo las principales la clase I y clase II (Gustafson *et al.*, 2003) (Figura 1). En la especie equina se determinó, mediante hibridación *in situ* con una sonda de ADNc de clase I humano, la localización del MHC en el cromosoma 20 (Makinen *et al.*, 1989). Alexander y colaboradores (1987) demostraron que el MHC equino contiene más de 20 genes de clase I, de los cuales más de la mitad presentaban un significativo polimorfismo. Tanto para los loci clase I como para los de clase II, el polimorfismo observado aumentaba entre animales de diferentes serotipos ELA y disminuía entre caballos con serotipo ELA idéntico. Lo que les sugería que los genes de clase I y clase II estaban estrechamente ligados (Alexander, Bailey y Woodward, 1987).

El estudio serológico del sistema ELA es costoso y limitado, principalmente por la cantidad y variedad de reactivos de anticuerpos disponibles (Tseng *et al.*, 2010; Sadeghi *et al.*, 2018). Los antisueros utilizados deben ser específicos para cada serotipo ELA y para conseguirlos es necesario recogerlos de yeguas primíparas justo después del parto o de caballos inmunizados previamente. Además, la reactividad de los reactivos, sobre todos los antisueros, puede variar entre laboratorios debido a los distintos métodos de análisis (Lazary *et al.*, 1988). Todo ello llevó al desarrollo de nuevas técnicas para el análisis del sistema ELA.

Una de estas técnicas consiste en el uso de marcadores microsatélites, regiones de repetición dentro del genoma, para identificar los haplotipos del MHC equino. Esta técnica se basa en el desequilibrio de ligamiento dentro del MHC (Tseng *et al.*, 2010). Los haplotipos pueden ser definidos mediante caballos homocigóticos que presentan dos alelos iguales para cada microsatélite, por lo que no hay problema en determinar qué alelos pertenecen al haplotipo materno y cuales al paterno porque son el mismo haplotipo o mediante caballos emparentados, grupos de padres-hijos o medio hermanos, que permiten valorar la transmisión de los alelos para cada microsatélite y determinar los haplotipos de los hijos, aunque no de los padres. En caballos heterocigotos si se puede identificar un haplotipo ya definido con los alelos observados, se puede considerar el otro haplotipo como provisional hasta su confirmación por los métodos anteriores. (Tseng *et al.*, 2010; Sadeghi *et al.*, 2018).

A lo largo de los años se han llevado a cabo distintos estudios para buscar marcadores microsatélites del MHC equino. Tseng y colaboradores (2010) estudiaron el genoma equino y localizaron múltiples microsatélites, pero eligieron tan solo 5 por su polimorfismo, estabilidad y rendimiento general para realizar su estudio, dos de ellos previamente descritos (UMN-JH34-2 y UMO11) y el resto nuevos (COR112, COR113 y COR114). Con este panel de 5 microsatélites definieron un total de 50 haplotipos en caballos de distintas razas. Al comparar estos haplotipos con los determinados por técnicas serológicas relacionaron 23 de ellos con 12 serotipos ELA (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A15 y A19). En algunos casos un mismo serotipo ELA se relacionaba con varios haplotipos del MHC determinados por marcadores microsatélites, observando sobre todo variaciones en los alelos de los microsatélites localizados en el MHC de clase II. Esto puede ser debido a que los antisueros utilizados para determinar los serotipos ELA se dirigen principalmente contra antígenos MHC de clase I. Los otros 27 haplotipos no los pudieron relacionar con serotipos ELA y los denominaron correlativamente desde el COR1 al COR27 (Tseng *et al.*, 2010).

Más tarde en 2013 Brinkmeyer-Langford y colaboradores identificaron 37 marcadores microsatélites, 31 nuevos y 6 previamente identificados por estudios anteriores, y realizaron un análisis del desequilibrio de ligamiento de estos microsatélites para valorar la capacidad que tenían de aportar información sobre el sistema ELA. Además, añadieron en el estudio el análisis del desequilibrio de ligamiento de otro método de análisis de variaciones del genoma, los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs por sus siglas en inglés, *Single Nucleotide Polymorphisms*) utilizando un chip de SNPs para ELA diseñado por otros investigadores (McCue *et al.*, 2012). Brinkmeyer-Langford y colaboradores (2013) determinaron que los microsatélites utilizados solos o junto con SNPs revelaban un desequilibrio de ligamiento significativo e identificaron conjuntos de marcadores de microsatélites que definían haplotipos ELA ya que se encontraban en un desequilibrio de ligamiento completo.

En la mayoría de los estudios realizados para analizar el sistema ELA se vio que la frecuencia de los distintos haplotipos del MHC equino variaba según la raza (Lazary *et al.*, 1988; Tseng *et al.*, 2010). Por ello se han ido estudiando los haplotipos de las distintas razas por separado, para valorar cuales son los haplotipos que aparecen en una raza determinada y cuál es la frecuencia de estos.

A pesar de que en el estudio de Tseng y colaboradores (2010) se incluían caballos de distintas razas, más del 60% eran Pura Sangre Inglés (PSI) y Standardbred (SB). En su estudio observaron que la mayoría de los caballos de estas razas presentaban un reducido número de haplotipos,

representado los haplotipos ELA A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A15 y A19 el 90% de los haplotipos identificados en los PSI y el 97% en los SB. El resto de los haplotipos pertenecían al grupo de los haplotipos “COR” no asociados con serotipos ELA.

Otras razas en la que se han estudiado los haplotipos y su variabilidad son los caballos árabes persas (Sadeghi *et al.*, 2018), los caballos islandeses (Holmes *et al.*, 2019) y los caballos Konik Polski y caballos de tiro polacos (Jaworska *et al.*, 2020). Los marcadores microsatélites utilizados para analizar los haplotipos del MHC equino fueron prácticamente los mismos en todos los estudios, lo que permitió comparar unas razas con otras. Sadeghi y colaboradores (2018) diseñaron un panel de 10 microsatélites basado en los 5 marcadores del panel diseñado por Tseng y colaboradores (2010) al que añadieron 5 microsatélites identificados por Brinkmeyer-Langford y colaboradores (2013) (UMNjH-38, ABGe9019, UMNe65, ABGe9030 y EQMHC1). En el estudio sobre caballos islandeses se utilizó este mismo panel de 10 microsatélites, aunque posteriormente se añadieron 2 marcadores más (TAMU 305-93 y CZM002) formando un panel de 12 microsatélites en total (Holmes *et al.*, 2019) (Figura 1). Por último, en 2020 Jaworska y colaboradores utilizaron un panel de 11 microsatélites para el estudio de haplotipos en caballos Konik Polski y caballos de tiro polacos.

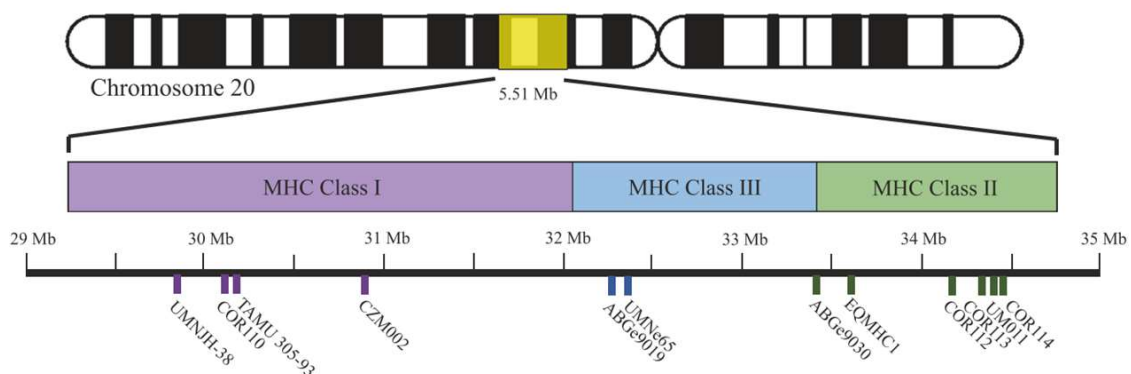


Figura 1 Localización de las tres clases del MHC equino dentro del cromosoma 20 del caballo y de los microsatélites utilizados para la determinación del haplotipo del MHC (Holmes *et al.*, 2019).

En cada uno de los estudios de las distintas razas se fueron detectando nuevos haplotipos que no habían aparecido hasta ese momento. Sadeghi y colaboradores (2018) identificaron 82 haplotipos del MHC equino en caballos árabes persas, 78 de ellos nuevos y 4 (A10c, A19, COR3 y COR8) que ya habían sido descritos previamente. Los nuevos haplotipos se denominaron correlativamente del COR28 al COR104 siguiendo la nomenclatura establecida en estudios anteriores. 31 de los 78 nuevos haplotipos fueron clasificados como provisionales ya que se determinaron a partir de caballos heterocigotos. En los caballos islandeses estudiados, Holmes y colaboradores (2020) identificaron 78 haplotipos y ninguno de ellos se había descrito

previamente. Así mismo, Jaworska y colaboradores (2020) identificaron 199 haplotipos en los caballos Konik Polski y de tiro polacos que no se habían observado en otros estudios. Ni siquiera entre ambas razas polacas había haplotipos iguales, 111 haplotipos se identificaron en los caballos de tiro y 88 en los Konik Polski. Además, la mayoría de los haplotipos de las dos poblaciones de caballos Konik Polski, una asilvestrada y otra estabulada, eran distintos, tan solo encontraron 4 haplotipos en común.

La cantidad de haplotipos distintos encontrados en las diferentes razas es un indicativo del alto grado de polimorfismo que presenta el MHC equino. Sin embargo, también puede ser debido a la reducida cantidad de razas en las que se han analizado los haplotipos del MHC y a lo separadas que están estas razas entre sí (Jaworska *et al.*, 2020). Así mismo, hay que tener en cuenta la pequeña cantidad de animales estudiados de cada raza. Por ello, podría ser posible que al estudiar más razas y más animales se lleguen a encontrar más haplotipos que aparezcan en distintas razas.

En los tres estudios se observaron eventos de recombinación en la descendencia de los grupos familiares estudiados. Tanto en el estudio sobre caballos árabes persas como en el de caballos islandeses se detectó un único evento de recombinación que ocurrió en ambos casos entre el microsatélite UMNe65 en la región del MHC de clase III y el microsatélite ABGe9030 en la región del MHC de clase II (Figura 2). Sadeghi y colaboradores (2018) denominaron al nuevo haplotipo COR45/COR55 ya que estaba formado por una recombinación de estos dos haplotipos, mientras que Holmes y colaboradores (2019) denominaron a su nuevo haplotipo COR183, formado a partir de la recombinación de COR105 y COR106 (Tabla 1).

**Tabla 1.** Nuevos haplotipos formados por recombinación a partir de dos haplotipos preexistentes. ArP: árabe persa e Is: islandés.

Haplotipo	UMN38	UMN2/COR110	TAMU305-93	CZM002	ABGe9019	UMNe65	ABGe9030	EQMHC1	COR112	COR113	UMO11	COR114	RAZA	FUENTE
COR54/COR55	156	205			318	257	215	190	248	270	172	236	ArP	Sadeghi <i>et al.</i> 2018
COR54	156	205			318	257	212	190	262	268	174	234	ArP	Sadeghi <i>et al.</i> 2018
COR55	156	219			305	259	215	190	248	270	172	236	ArP	Sadeghi <i>et al.</i> 2018
COR183	163	197	345	232	301	265	205	192	248	270	184	245	Is	Holmes <i>et al.</i> 2019
COR105	163	197	345	232	301	265	219	190	254	270	172	249	Is	Holmes <i>et al.</i> 2019
COR106	165	225	345	230	303	259	205	192	248	270	184	245	Is	Holmes <i>et al.</i> 2019

Utilizando este punto de recombinación entre la región de MHC de clase III y la de clase II, Sadeghi y colaboradores (2018) dividieron los microsatélites en dos grupos para formar dos hemihaplotipos. El primer hemihaplotipo comprendía los microsatélites situados en las regiones

del MHC de clase I y III (UMNJH-38, CPR110, ABGe9019 y UMNe65), y el segundo hemihaplotipo los situados en la región del MHC de clase II (ABGe9030, EQMHC1, COR112, COR113, UMO11 y COR114) (Figura 2). Separados de esta forma determinaron 53 hemihaplotipos clase I-III y 60 hemihaplotipos clase II y observaron que algunos de los hemihaplotipos clase I-III estaban asociados con varios hemihaplotipos clase II y viceversa. Análogamente, Holmes y colaboradores (2019) determinaron 59 hemihaplotipos clase I-III y 50 hemihaplotipos clase II y observaron también las relaciones entre las combinaciones de hemihaplotipos lo que les sugirió que habían existido numerosas recombinaciones anteriores en ese punto del MHC.

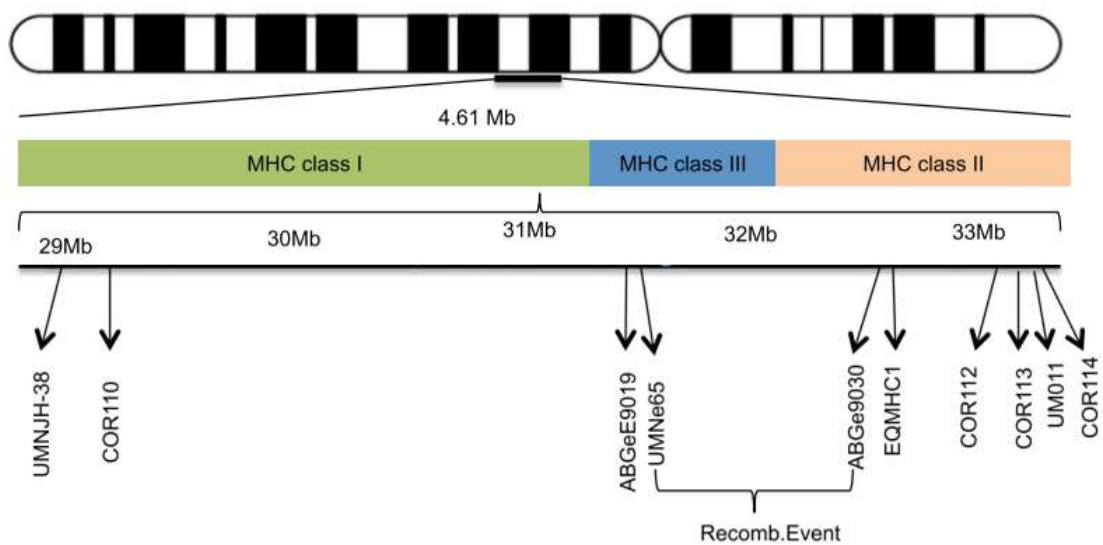


Figura 2. Localización del punto de recombinación entre los microsatélites UMNe65 y ABGe9030 (Sadeghi *et al.*, 2018).

Jaworska y colaboradores (2020) detectaron en su estudio 15 eventos de recombinación, los cuales fueron observados con mayor frecuencia en los caballos Konik asilvestrados que en las otras dos poblaciones estudiadas, los caballos Konik Polski estabulados y los caballos de tiro polacos. Aunque la mayoría de las recombinaciones se localizaron en la región de clase III o entre las regiones de clase III y II, detectaron recombinaciones en las tres regiones del MHC equino. Por lo que, además del punto de recombinación identificado por Sadeghi y colaboradores (2018), sugirieron un nuevo punto de recombinación en la región del MHC de clase II (Jaworska *et al.*, 2020).

Los eventos de recombinación son un importante mecanismo de variación genética ya que suponen la aparición de nuevos haplotipos. Holmes y colaboradores (2019) estimaron la posibilidad de que pudieran aparecer de forma natural 2000 haplotipos nuevos cada 100 años en la población de caballos islandeses estudiada. Sin embargo, es difícil determinar el número real debido a la acción humana que reduce la aparición de nuevos haplotipos. Por ejemplo, muchos caballos no llegan a la edad adulta porque son destinados a carne o peletería. Por otro

lado, es común que muchos machos no lleguen nunca a ser elegidos como reproductores y aunque un número de hembras considerable es destinado a la reproducción, estas no tienen tanta descendencia como los machos (Holmes *et al.*, 2019).

A parte de la recombinación hay otros eventos genéticos que aportan variabilidad al MHC equino. Jaworska y colaboradores (2020) detectaron tres eventos de conversión genética en su estudio. En la población asilvestrada de caballos Konik Polski detectaron dos conversiones, una en una potra que presentaba en 6 microsatélites dos alelos procedentes del padre y ninguno de la madre y una segunda potra que presentaba en un microsatélite dos alelos de la madre. También localizaron una conversión genética en una potra de la población de caballos de tiro polacos que presentaba en dos microsatélites dos alelos de la madre. Además, detectaron distintas mutaciones (inserciones y deleciones) en las 3 poblaciones. Junto con las recombinaciones, las conversiones genéticas y las mutaciones supusieron la aparición de 29 haplotipos nuevos (Jaworska *et al.*, 2020). No obstante, dado el elevado número de eventos genéticos encontrados en este estudio en comparación con estudios anteriores, incluidas conversiones genéticas que no habían sido descritas hasta ese momento en la región del MHC equino, podría realizarse una secuenciación de esos caballos para corroborar los hallazgos encontrados por Jaworska y colaboradores (2020).

Los estudios sobre los haplotipos del MHC equino en distintas razas demuestran la gran variabilidad que existe dentro el MHC, así como, que dicha variabilidad depende en gran medida de la raza. Algunas razas como el PSI o el SB presentan poca variabilidad de haplotipos del MHC, ya que muchos individuos tienen los mismos haplotipos (Tseng *et al.*, 2010). Por el contrario, en otras razas como los caballos islandeses se identificaron un gran número de haplotipos distintos en un número reducido de animales estudiados y algunos haplotipos se observaron en un único individuo, lo que demuestra la gran diversidad genética que presentan los caballos islandeses. La diferencia de variabilidad genética entre unas razas y otras puede ser debido a la estrategia reproductiva. Las razas como el PSI y SB presentan un alto grado de endogamia y selección artificial mientras que en las otras razas como los caballos árabes persas o los islandeses interviene también la selección natural y se intenta evitar en la manera de lo posible la endogamia (Holmes *et al.*, 2019).

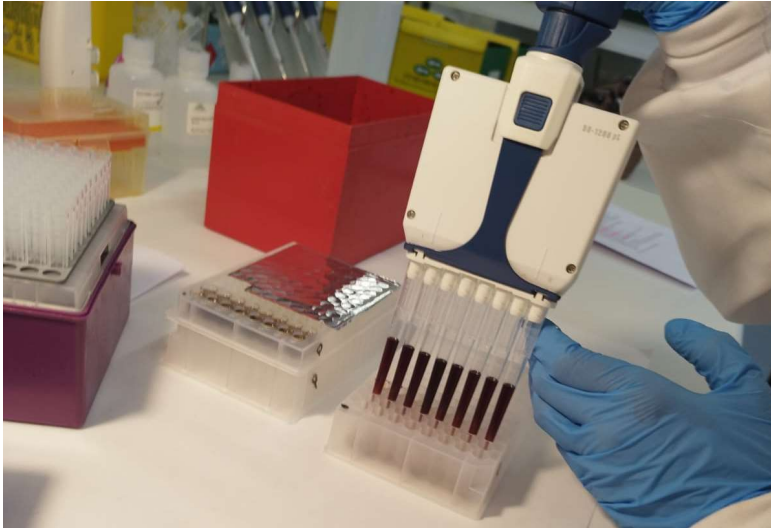
Dado que la estrategia reproductiva puede ser un factor clave en la variabilidad del MHC, cabría esperar que los caballos de tiro polacos, que tienen un libro genealógico abierto y permiten el cruzamiento con otras razas, presentaran mayor variabilidad genética que los caballos Konik Polski que tienen un libro genealógico cerrado desde hace años. Sin embargo, el estudio de

Jaworska y colaboradores (2020) demuestra lo contrario ya que los caballos Konik asilvestrados presentaron un mayor número de eventos de recombinación y conversión, y por tanto un mayor número de nuevos haplotipos en la descendencia. Esto puede ser debido a que, aunque en los caballos de tiro polacos está permitido el cruce con otras razas, se suelen elegir como reproductores aquellos que presentan las características fenotípicas deseadas de la raza de tiro polaca. Mientras que los caballos Konik Polski o bien son seleccionados cuidadosamente para la reproducción cuando están estabulados o bien se reproducen libremente cuando viven de forma asilvestrada. También es posible que los factores ambientales y las condiciones de vida silvestre puedan influir en la diversidad del MHC ya que, a pesar de ser la misma raza, los caballos Konik Polski asilvestrados presentan mayor variabilidad genética que los caballos estabulados (Jaworska *et al.*, 2020).

#### 5.1.1. Análisis laboratorial del MHC equino mediante marcadores microsatélites

La determinación laboratorial de los haplotipos del MHC equino a través del análisis de marcadores microsatélites se divide en 3 procedimientos: la extracción de ADN, la amplificación de los fragmentos de microsatélites mediante la PCR y la realización de una electroforesis capilar para separar y valorar el tamaño de los fragmentos amplificados (Tseng *et al.*, 2010; Sadeghi *et al.*, 2018; Jaworska *et al.*, 2020).

El ADN se extrae de los linfocitos presentes en la sangre venosa periférica obtenida por venocentesis de la vena yugular externa. Inicialmente se aislaban los linfocitos de la sangre antes de proceder a la extracción de ADN (Tseng *et al.*, 2010). No obstante, en el trabajo realizado en el laboratorio se extrajo el ADN directamente a partir de sangre entera heparinizada utilizando el kit comercial *Quick-DNA™ 96 kit* (Zymo Research; Orange, CA, USA). Primero se añadió a las muestras de sangre una solución de lisis (*Genomic Buffer Lysis*) con el objetivo de romper las membranas celulares y liberar el ADN, se dejó reposar 5 minutos y se centrifugó 15 minutos para facilitar el proceso. Después se traspasaron las muestras a una placa de silicona (Figura 3) para realizar el prelavado (*DNA Pre-wash buffer*) y el lavado (*g-DNA Wash Buffer*) centrifugando 15 minutos entre ambos y después del lavado con la finalidad de retirar los restos de membranas. Por último, se añadió la solución de elución (*DNA Buffer Elution*) a 65°C, la cual tras una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente y una centrifugación de 10 minutos produce la precipitación del ADN.



*Figura 3.* Traspaso a la placa de silicona de las muestras de sangre mezcladas con la solución de lisis tras la centrifugación de 15 minutos y antes de la adición de la solución de prelavado.

Para la PCR es necesario añadir a la muestra de ADN los desoxidonucleótidos (dATP, dCTP, dTTP y dGTP) y la Taq ADN polimerasa necesarios para la formación de nuevo ADN, así como los cebadores directo e inverso marcados fluorescentemente que señalan el inicio y el final de cada microsatélite y por tanto de los fragmentos a ampliar por la ADN polimerasa. Posteriormente se incubaba una serie de ciclos con unas determinadas condiciones que permiten la amplificación de los fragmentos de microsatélites. Primero uno ciclo de alta temperatura (95°C - 96°C) durante unos 5 minutos, seguido de 30-35 ciclos a 95°C durante 30 segundos – 1 minuto, 58°C – 60°C durante 30 segundos – 1 minuto y 72°C durante 30 segundos – 1 minuto y por último un ciclo a 72°C durante 10 – 20 minutos para la extensión final (Tseng *et al.*, 2010; Sadeghi *et al.*, 2018; Jaworska *et al.*, 2020).

En el análisis laboratorial en el que se participó se diseñó un panel de 10 marcadores microsatélites ya descritos para la determinación de haplotipos del MHC equino (Tseng *et al.*, 2010; Sadeghi *et al.*, 2018) dividiéndolos en dos multiplex, el ELA1 (COR110, COR112, COR114, UMO11 y COR113) y el ELA2 (UMNJH-38, ABGe9019, UMNe65, ABGe9030 y EQMHC1). En ambos casos, se utilizó el kit comercial *QIAGEN® Multiplex PCR kit* (Qiagen; Hilden, Germany) y se añadió a cada pocillo de la placa de PCR 1 µl de gADN, 0,5 µl de la mezcla que incluye los cebadores para dichos marcadores (Tabla 2) y 3 µl de *Master Mix*, 0,6 µl de *Q-solution* y 0,9 µl de agua bidestilada proporcionados por el kit comercial.



**Tabla 2.** Secuencias de los cebadores de los marcadores microsatélites utilizados en el análisis laboratorial de los haplotipos del MHC equino y el rango de pares de bases (bp) de los alelos para cada marcador.

	Microsatélites	Fluorocromo	Secuencia de cebadores	Rango alelos (bp)	Fuente
MHC I	UMNJH-38	F' FAM	TGTGTGTGCACCTGTCCTTT	140-165	Sadeghi <i>et al.</i> , 2017
		R'	GATGGGAGGGAATGAGGAAT		
	COR110	F'	TTTGGTCTTTGCAGGTATGG	194-225	Tseng <i>et al.</i> , 2010
		R' VIC	TCTCCCTTCCTCTTTGTTC		
MHC III	ABGe9019	F' FAM	CTGAGAGAGACAGCATTTGTGG	297-320	Sadeghi <i>et al.</i> , 2017
		R'	GAAAGGTGTCTCCATTCTTGCT		
	UNMe65	F' AT550 (NED)	TCGCAAAACCCACAGACTAC	247-269	Sadeghi <i>et al.</i> , 2017
		R'	TTCTCCTTTCCTTCCACTCC		
MHC II	ABGe9030	F' AT565 (PET)	CCAGCAGACCTGCAAGAGTA	205-221	Sadeghi <i>et al.</i> , 2017
		R'	AGCATGAGAGCCATGAAGGT		
	EQMHC1	F' AT532 (VIC)	ATGCATACCGGAAAGACAG	180-199	Sadeghi <i>et al.</i> , 2017
		R'	AGAGACTTCAGTCTGTGGTG		
	COR112	F'	TTACTGTTATTGGTTATTGG	237-270	Tseng <i>et al.</i> , 2010
		R' NED	TCACCACTAAATCTCAAATCC		
	COR113	F'	TCAGACTCCTGGCTCCCTTA	260-280	Tseng <i>et al.</i> , 2010
		R' FAM	GTCTTTCTGCAGCCTGCCT		
	UM011	F'	TGAAAGTAGAAAGGGATGTGG	165-184	Tseng <i>et al.</i> , 2010
		R' FAM	TCTCAGAGCAGAAGTCCCTG		
	COR114	F'	TCAAAATCCACTCCCTTC	234-259	Tseng <i>et al.</i> , 2010
		R' PET	TCCATAAGAGTGGGACTG		

Una vez pipeteado todos los elementos en cada uno de los pocillo de la placa PCR se incubó con las siguientes condiciones: 1 ciclo a 95°C durante 15 minutos; 30 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 58°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto; 1 ciclo a 72°C durante 30 minutos para la elongación final; por último, se mantuvo a 4°C hasta que se retiró y se procedió a realizar el último paso (Figura 4).



**Figura 4.** Condiciones de la PCR llevada a cabo en el análisis laboratorial de haplotipos del MHC equino.

Para finalizar el análisis laboratorial de marcadores microsatélites es necesario llevar a cabo una electroforesis capilar con el fin de poder analizar los fragmentos amplificados en la PCR. A cada una de las muestras se le añade el marcador de talla comercial para poder valorar el tamaño de los fragmentos y formamida altamente desionizada que es desnaturalizante e impide que los fragmentos se vuelvan a juntar durante la electroforesis (Tseng *et al.*, 2010; Sadeghi *et al.*, 2018; Jaworska *et al.*, 2020). Para la electroforesis llevada a cabo en el trabajo laboratorial realizado se diluyó primero la muestra 1:40 para evitar que se sobrepasase el rango de fluorescencia que puede leer el equipo y se utilizó una mezcla de formamida y el marcador de talla comercial *GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard* (Applied Biosystems; Woolston, Warrington, UK) que contenía por cada muestra 12 µl de formamida y 0,3 µl de marcador. En cada pocillo de la placa para el analizador se añadieron 2 µl de producto de la PCR y 12 µl de mezcla de formamida y marcador de talla, se incubaron 5 minutos a 95°C para desnaturalizar el ADN y se introdujo en el equipo (*SeqStudio Genetic Analyzer*) para la realización de la electroforesis capilar. Los resultados se analizaron con el programa *GeneMapper Software 6*.

El análisis de microsatélites solo estudia la longitud de ciertos fragmentos, por lo que únicamente engloba una parte de la región del MHC. Actualmente se están desarrollando nuevos métodos de genotipado completo de esta región que permitirán valorar mejor la variabilidad genética del MHC. Vasoya y colaboradores (2023) han diseñado una plataforma de secuenciación de las regiones del MHC equino de clase I y de clase II y con ella han determinado 33 haplotipos para el MHC de clase I y 41 para el de clase II, en caballos PSI, islandeses y Fjord.

### 5.2. RESPUESTA INMUNITARIA

El sistema inmune está compuesto por un grupo de células, tejidos y sus productos encargados de luchar contra los agentes extraños que atacan el organismo y eliminarlos. Estos agentes son principalmente microorganismos como bacterias, virus y parásitos, pero también pueden tratarse de agentes internos como células cancerígenas (Mak y Saunders, 2005).

El organismo cuenta con dos líneas de defensa que actúan coordinadamente y que se diferencian en la especificidad de sus mecanismos de acción. Estas dos líneas son la respuesta innata y la respuesta adquirida (Mak y Saunders, 2005). Así mismo, la respuesta inmunitaria se puede dividir en la respuesta humoral encargada de la producción de anticuerpos contra los antígenos de agentes extraños y la respuesta mediada por células que produce la destrucción de células infectadas con patógenos intracelulares o alteradas y células ajenas (Kafrawy, 2002).

La primera respuesta en activarse es la innata cuyas dos herramientas principales son la presencia de barreras físicas, químicas y moleculares que impiden la entrada de agentes extraños y la existencia de células capaces de reconocer patrones moleculares presentes en diversos patógenos. Este reconocimiento es mínimamente específico, lo que significa que la respuesta producida ante diferentes agentes es la misma, así como tras varias exposiciones consecutivas al mismo patógeno. La respuesta innata en la mayoría de los casos no es capaz de neutralizar por sí sola a los agentes extraños, por lo que, las células encargadas de la respuesta innata producen mensajeros químicos denominados citoquinas que activan la respuesta adaptativa (Mak y Saunders, 2005).

La función de la respuesta adaptativa es desencadenar una reacción específica frente a los antígenos de los agentes extraños para acabar destruyéndolos. Los antígenos son sustancias que desencadenan la producción de anticuerpos por los linfocitos B y la activación de los linfocitos T al unirse específicamente a ellos. Las células de la respuesta adaptativa se activan y actúan de forma específica a los antígenos que han desencadenado la respuesta inmunitaria. Adicionalmente, ante una segunda exposición al mismo antígeno, la respuesta adaptativa será mayor y más rápida que en la primera exposición (Mak y Saunders, 2005).

Las células que participan en la respuesta inmunitaria se denominan leucocitos o glóbulos blancos. Los neutrófilos son los principales leucocitos en la respuesta innata, ya que fagocitan y destruyen patógenos, principalmente bacterias. Otras células que participan en la respuesta innata son las NK encargadas de la lisis de células tumorales o infectadas por virus. Los macrófagos podrían considerarse como los leucocitos que comunican la respuesta innata con la adaptativa, debido a que fagocitan patógenos y presentan sus antígenos a las principales células de la respuesta adaptativa, que son los linfocitos B y los linfocitos T. Los linfocitos T se dividen en linfocitos T *helpers* (Th), linfocitos T citotóxicos (Tc) y linfocitos T reguladores (Tr) (Mak y Saunders, 2005).

El principal objetivo de la respuesta humoral es la producción de anticuerpos contra los antígenos externos. Los linfocitos B son los encargados de reconocer los antígenos solubles sin necesidad de que sean procesados previamente y de producir anticuerpos específicos contra ellos. Según el mecanismo de elaboración de anticuerpos existen dos tipos de antígenos: los T-independientes y los T-dependientes. Los linfocitos B son capaces de activarse tras reconocer y unirse a antígenos T-independientes sin necesidad de la intervención de otras células. Sin embargo, si los linfocitos B se unen a antígenos T-dependientes requieren de la ayuda de los

linfocitos Th. La liberación de citoquinas denominadas interleuquinas por los linfocitos Th al reconocer el antígeno activan a los linfocitos B (Kafrawy, 2002; Mak y Saunders, 2005).

Una vez activados los linfocitos B se multiplican y se transforman en células plasmáticas o en linfocitos B de memoria. La función de las células plasmáticas es producir anticuerpos específicos contra el antígeno que han reconocido, mientras que la función de los linfocitos B de memoria es mantener una reserva de linfocitos B ya sensibilizados para actuar de forma más rápida y potente la próxima vez que se produzca una exposición al mismo antígeno. Los linfocitos B pueden transformarse por sí mismos en células plasmáticas una vez activados, pero para que se transformen en linfocitos B de memoria es necesario la ayuda de los linfocitos Th. La unión de la molécula CD40L de la superficie de membrana del linfocito Th con la molécula CD40 del linfocito B produce una señal que bloquea la transformación a célula plasmática y permite que el linfocito B pase a ser un linfocitos B de memoria (Mak y Saunders, 2005).

Las células que llevan a cabo la respuesta inmunitaria mediada por células son los linfocitos T. Existen tres tipos principales de linfocitos T. Los linfocitos Th liberan citoquinas que actúan como mensajeros sobre otras células del sistema inmune, mientras que los linfocitos Tc producen lisis celular. Por el contrario, los linfocitos Tr se encargan de controlar la respuesta inmunitaria mediante la tolerancia periférica, inhiben los linfocitos T activados y secretan citoquinas inmunosupresoras (Mak y Saunders, 2005).

Los linfocitos T después de 2-3 días tras realizar su función en la respuesta inmune sufren lo que se conoce como muerte celular programada o agotamiento. Solo una pequeña cantidad de linfocitos T sobreviven convirtiéndose en linfocitos T de memoria que, al igual que los linfocitos B de memoria, su función es actuar como linfocitos ya sensibilizados para desencadenar una respuesta más rápida y potente ante una nueva exposición (Mak y Saunders, 2005).

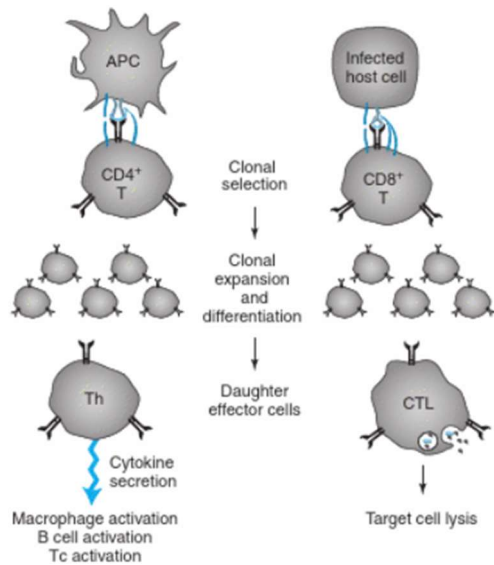
Al contrario que los linfocitos B, los linfocitos T no son capaces de reconocer y unir antígenos solubles, sino que necesitan que otras células se los presenten. Estas células digieren los antígenos en péptidos que son los que presentan en su superficie de membrana a través de las moléculas MHC. Los linfocitos T solo pueden activarse al reconocer el complejo formado por el péptido y la molécula MHC. Existen dos tipos de moléculas MHC, las moléculas MHC de clase I (MHC I) y las moléculas MHC de clase II (MHC II). Las moléculas MHC I se encuentran en la mayoría de las células nucleadas, mientras que las MHC II se encuentran solo en células presentadoras de antígenos específicas (APCs por sus siglas en inglés *Antigen-Presenting Cells*) como macrófagos o linfocitos B (Kafrawy, 2002; Mak y Saunders, 2005).

Dada la función de las moléculas MHC I y II como presentadoras de antígenos para desencadenar una respuesta inmunitaria contra peligros externos e internos, el polimorfismo de los genes del MHC es un importante mecanismo para la supervivencia de una especie (Alexander, Bailey y Woodward, 1987; Mak y Saunders, 2005). Desde el punto de vista individual, la existencia de distintos genes que codifican las moléculas MHC y la codominancia con la que se expresan los alelos parentales para cada loci, permite que cada molécula MHC de un individuo sea capaz de presentar distintos antígenos, aunque no simultáneamente. Si también se tiene en cuenta el elevado número de moléculas MHC en la superficie de cada célula, la cantidad de antígenos que pueden ser presentados a la vez es considerable, lo que favorece el reconocimiento por parte de los linfocitos T. Desde el punto de vista de la especie, el polimorfismo permite que haya múltiples alelos diferentes repartidos por todos los individuos de una población, por lo que hay más posibilidades de que parte de la población pueda desencadenar una reacción inmunitaria satisfactoria frente a un patógeno concreto, permitiendo la supervivencia de la especie, aunque no necesariamente la de todos los individuos (Mak y Saunders, 2005).

Según el tipo y procedencia del antígeno, tras su metabolización por la célula, el péptido es presentado en una u otra clase de molécula MHC lo que supone el reconocimiento por linfocitos T diferentes y por tanto una respuesta inmunitaria distinta (Figura 5). Los péptidos expuestos por moléculas MHC I solo pueden ser reconocidos por linfocitos T que presenten moléculas CD8 en su superficie, mientras que los péptidos presentados por moléculas MHC II solo pueden ser reconocidos por linfocitos T que contengan moléculas CD4 superficiales (Kafrawy, 2002; Mak y Saunders, 2005).

Tanto en el caso de células infectadas por virus u otros patógenos intracelulares como en el caso de células cancerígenas, los antígenos se encuentran en el interior de la célula y tras ser metabolizados en péptidos se exponen en moléculas MHC I. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> reconocen estos péptidos, se activan a linfocitos T<sub>c</sub> y provocan la lisis de las células con la que interactúan (Kafrawy, 2002; Mak y Saunders, 2005).

Los antígenos exógenos procedente por ejemplo de toxinas bacterianas o restos celulares son fagocitados y metabolizados en péptidos por las APCs que exponen los péptidos resultantes en moléculas MHC II. En este caso son los linfocitos T CD4<sup>+</sup> los que reconocen en estos péptidos, se activan a linfocitos T<sub>h</sub> y liberan citoquinas para activar a linfocitos B, macrófago y linfocitos T<sub>c</sub> (Kafrawy, 2002; Mak y Saunders, 2005).



*Figura 5.* Los linfocitos T CD4+ reconocen péptidos presentados por las APCs a través de moléculas MHC II y al activarse liberan citoquinas para activar linfocitos B y Tc. Los linfocitos T CD8+ reconocen péptidos presentados por células infectadas a través de moléculas MHC I y al activarse producen la lisis de estas células (Mak y Saunders, 2005).

En el caso de células o tejidos trasplantados las moléculas MHC I y MHC II extrañas, que no coinciden con las del propio organismo, son reconocidas por los linfocitos T. Los linfocitos T CD4+ reconocen las moléculas MHC II extrañas, se activan y liberan citoquinas. Los linfocitos T CD8+ al reconocer las moléculas MHC I extrañas junto con la presencia de citoquinas producidas por los linfocitos T CD4+ se activan y producen la destrucción de las células y tejidos que presentan moléculas MHC extrañas (Kafrawy, 2002).

La respuesta inmune inducida por el reconocimiento de moléculas MHC extrañas procedente de células y tejidos trasplantados tiene gran importancia en las terapias alogénicas de la medicina regenerativa, ya que puede suponer el rechazo de los productos biológicos administrados y por tanto la falta de eficacia del tratamiento (Berglund y Schnabel, 2017).

### 5.2.1. Medicina regenerativa

La medicina regenerativa engloba al conjunto de terapias que tienen como objetivo favorecer la reparación, sustitución, restauración y regeneración de células, tejidos y órganos que se han perdido o han sido dañados por lesiones, enfermedades o el paso del tiempo (Spaas, Guest y Van De Walle, 2012; Dahlgren, 2018).

Las terapias regenerativas se pueden dividir en dos grandes grupos según si se basan en el uso de células madre o no (Smith, Garvican y Fortier, 2014). El segundo grupo está formado

principalmente por terapias que utilizan factores de crecimiento y productos hemoderivados autólogos (Smith, Garvican y Fortier, 2014; Dahlgren, 2018; Ribitsch, Oreff y Jenner, 2021).

Los factores de crecimiento como el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1 por sus siglas en inglés *Insulin-like Growth Factor-1*) o el factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$  por sus siglas en inglés *Transforming Growth Factor- $\beta$* ) se utilizan en medicina regenerativa para favorecer la formación y crecimiento de los tendones, pero su eficacia no está del todo clara (Smith, Garvican y Fortier, 2014).

Los hemoderivados autólogos son productos a base de plasma o suero obtenidos de la propia sangre del paciente tras una mínima manipulación. Estos hemoderivados son el PRP, el suero autólogo condicionado (ACS de sus siglas en inglés *Autologous Conditioned Serum*) y la solución proteica autóloga. Todos ellos reducen la inflamación, protegen el tejido, reclutan células prorregenerativas como células madre y macrófagos y favorecen la neovascularización a través de factores de crecimiento, citoquinas y nutrientes (Ribitsch, Oreff y Jenner, 2021). El PRP es una de las terapias regenerativas más utilizada en caballos (Smith, Garvican y Fortier, 2014). Se elabora a partir de la sangre anticoagulada del paciente, centrifugada o filtrada para eliminar los glóbulos rojos y obtener un producto con una alta concentración de plaquetas (Smith, Garvican y Fortier, 2014; Dahlgren, 2018). El PRP favorece la neovascularización y mejora la fuerza tensil y elasticidad (Smith, Garvican y Fortier, 2014) gracias al aporte de fibrina del plasma (Dahlgren, 2018) y factores de crecimiento y citoquinas liberados por las plaquetas (Ribitsch, Oreff y Jenner, 2021). La principal diferencia entre el PRP y el ACS es que el ACS se elabora tras la coagulación de la sangre, por lo que no presenta células ni factores de coagulación como protrombina o fibrinógeno, pero sí contiene globulinas y albúmina. Su efecto se debe principalmente a la presencia de citoquinas y factores de crecimiento (Ribitsch, Oreff y Jenner, 2021).

Por otro lado, dentro del grupo de terapias regenerativas basadas en el uso de células madre existen distintos tipos de células madre, las MSCs, las células madre embrionarias (ESCs por sus siglas en inglés *Embryo-driven Stem Cells*) y las células madre pluripotenciales inducidas (iPSCs por sus siglas en inglés *induced Pluripotent Stem Cells*). Las ESCs se obtienen de células de embriones de 7 días lo que presenta un problema práctico y ético, las iPSCs no tienen ese problema ético y tienen la capacidad de diferenciarse en cualquier tipo celular. Sin embargo, las células madre más utilizadas en medicina regenerativa son las MSCs (Smith, Garvican y Fortier, 2014). Las MSCs son células plásticas adherentes que se renuevan continuamente y son capaces de diferenciarse *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condroblastos (Dominici *et al.*, 2006; Smith, Garvican y Fortier, 2014). Así mismo, las MSCs presentan en su superficie un panel de

marcadores específico que varía entre especies (Ranera *et al.*, 2011). Las MSCs humanas expresan CD105, CD73, CD90, CD44, CD106 y CD166 y no expresan CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y HLA-DR, mientras que las MSCs equinas expresan CD29, CD90, CD73, CD105, CD44, CD13, CD146, CD166, CD49d, CD106 y no expresan CD45 y CD31 (Dominici *et al.*, 2006; Ranera *et al.*, 2011). Esta expresión de moléculas de superficie también varía según el origen de las células madre (Ranera *et al.*, 2011). Las MSCs se obtiene principalmente de la médula ósea o del tejido adiposo, pero también pueden obtenerse de otras localizaciones como la sangre del cordón umbilical, la membrana amniótica y el líquido sinovial (Smith, Garvican y Fortier, 2014).

En los caballos, la medicina regenerativa se utiliza principalmente para tratar lesiones del sistema musculoesquelético (Smith, Garvican y Fortier, 2014) y está evolucionando muy rápidamente en los últimos años (Dahlgren, 2018). Los avances en este campo no solo favorecen la medicina equina, sino que pueden ser extrapolados a la medicina humana. A pesar de que se suelen utilizar como modelos animales especie de pequeño tamaño por temas económicos y restricciones legales y éticas, el caballo es uno de los mejores modelos para el estudio del sistema musculoesquelético. Los tejidos de este sistema de los caballos presentan una composición y estructura similar a los de los humanos, así como su comportamiento tras un trauma, por lo que las enfermedades y lesiones del aparato locomotor de los caballos son muy semejantes a las de los humanos, permitiendo que los hallazgos en medicina equina puedan servir de base para la medicina humana y viceversa (Smith, Garvican y Fortier, 2014).

Las lesiones en los tendones y ligamentos son uno de los problemas ortopédicos más comunes en los caballos (Spaas, Guest y Van De Walle, 2012). Las tendinopatías y desmopatías se han tratado tradicionalmente mediante reposo, aplicación de frío, vendajes compresivos y ejercicio progresivo y controlado con el objetivo de optimizar la reparación de las estructuras dañadas. Sin embargo, debido a la baja celularidad, vascularización y metabolización de los tendones y ligamentos de caballos adultos, las terapias conservadoras requieren tiempos de recuperación largos y en la mayoría de los casos la formación de cicatrices fibrosas no permite recuperar completamente las propiedades biomecánicas de estos tejidos (Spaas, Guest y Van De Walle, 2012; Ribitsch, Oreff y Jenner, 2021). Por el contrario, las terapias regenerativas, como su propio nombre indica, tienen como objetivo la regeneración de los tejidos dañados, en vez de simplemente su reparación, para conseguir una mejor recuperación de la funcionalidad de las estructuras (Ribitsch, Oreff y Jenner, 2021). Por eso, el uso de MSCs para el tratamiento de lesiones tendinosas y ligamentosas se ha convertido en una terapia común en los últimos años (Dahlgren, 2018). En un principio se pensaba que las MSCs actuaban diferenciándose e incorporándose al tejido dañado, sin embargo, actualmente se conoce que el principal mecanismo



de acción de estas células es paracrino, secretan mediadores químicos y factores que actúan sobre las células de alrededor (Smith, Garvican y Fortier, 2014). A través de este mecanismo las MSCs disminuyen la infiltración de células del sistema inmune y la concentración de citoquinas proinflamatorias y aumenta la perfusión, neovascularización y concentración de citoquinas antiinflamatorias. Las MSCs también pueden combinarse con los PRPs para mejorar la organización del colágeno además de la neovascularización. A parte de en las tendinopatías y desmopatías, las MSCs y PRPs pueden utilizarse en otros trastornos ortopédicos como la osteoartritis o la laminitis (Ribitsch, Oreff y Jenner, 2021).

A diferencia de los PRPs que son terapias autólogas, es decir, provienen del propio paciente, las MSCs pueden ser tanto autólogas como alogénicas, es decir, provenir de otro individuo de la misma especie. El problema con las terapias alogénicas es que pueden provocar una respuesta de rechazo (Spaas, Guest y Van De Walle, 2012; Ribitsch, Oreff y Jenner, 2021). Como inicialmente las MSCs se consideraban inmunoprivilegiadas, ya que por su capacidad inmunomoduladora y antiinflamatoria se pensaba que no eran reconocidas por el sistema inmune y pasaban desapercibidas, se creía que su uso alogénico era seguro. Sin embargo, ahora se conoce que sí que desencadenan una respuesta inmune por lo que se consideran inmunoevasivas (Ankrum, Ong y Karp, 2014). Dado que las terapias regenerativas son más eficaces si se administran lo antes posible tras una lesión, en la fase inflamatoria antes de la proliferación de fibroblastos y el desarrollo del tejido cicatricial (Spaas, Guest y Van De Walle, 2012), poder usar MSCs alogénicas ya preparadas en vez de tener que esperar a cultivar las MSCs autólogas sería de gran ventaja para mejorar la eficacia del tratamiento (Schnabel *et al.*, 2014). Además, las MSCs autólogas pueden ver afectada su calidad por la edad y estado de salud del paciente (Berglund *et al.*, 2021). Por todo ello en los últimos años se han realizado diferentes estudios para conocer la relación entre las MSCs y el sistema inmune.

Las MSCs interactúan con el sistema inmune principalmente a través de las moléculas expresadas en su superficie, sobre todo a través de las moléculas involucradas en la presentación antigénica (MHC I, MHC II, CD80, CD40, CD40L) (Remacha *et al.*, 2015). Las MSCs equinas presentan una expresión moderada de moléculas MHC I en su superficie, mientras que la expresión de moléculas MHC II es muy variable entre caballos de distintas razas y distintas edades e incluso MSCs obtenidas del mismo animal, pero de distintos tejidos y en momentos distintos pueden presentar una expresión de moléculas MHC II distinta (Schnabel *et al.*, 2014; Kamm *et al.*, 2019).

El sistema inmune del paciente puede reconocer las moléculas MHC extrañas de la superficie de las MSCs administradas. Esto supone la activación de los linfocitos T y B tanto *in vitro* como *in*

*vivo* (Schnabel *et al.*, 2014; Pezzanite *et al.*, 2015). La respuesta celular y humoral desencadenada por las MSCs alogénicas produce la destrucción de las MSCs antes de que puedan desempeñar su función de regeneración del tejido dañado, lo que reduce su eficacia terapéutica (Berglund y Schnabel, 2017). Rowland y colaboradores (2021) estudiaron el efecto que tiene la administración de MSCs autólogas y alogénicas con MHC compatible e incompatible sobre la respuesta inmunitaria. Con ninguno de los tipos de MSCs observaron signos clínicos de inflamación tras una primera administración, aunque sí que detectaron una activación de la respuesta innata y adaptativa con la administración de MSCs incompatibles, así como la formación de anticuerpos específicos que no hallaron tras la administración de MSCs compatibles o autólogas. También determinaron que la memoria inmunológica tiene un papel importante en el rechazo de las MSCs incompatibles, ya que ante una segunda administración sí observaron signos de inflamación local en los animales y además detectaron una mayor respuesta inmunitaria, que no se producía con las MSCs autólogas o compatibles. Por tanto, para eludir el rechazo de las MSCs alogénicas es necesario conocer los haplotipos del MHC de donante y receptor para comprobar que sean compatibles, de tal forma que los antígenos del MHC del donante sea lo más parecido a los del receptor evitando así el reconocimiento inmunológico (Schnabel *et al.*, 2014; Kamm *et al.*, 2019). No obstante, la capacidad de inmunomodulación de las MSCs les permite inhibir la proliferación de linfocitos T y evitar el reconocimiento alogénico en cierta medida (Berglund *et al.*, 2021).

Recientemente se han llevado a cabo distintos estudios para conocer mejor la inmunogenicidad de las MSCs, es decir, su capacidad para desencadenar una respuesta inmunitaria. Schnabel y colaboradores (2014) determinaron no solo que la expresión de moléculas del MHC II es muy variable de forma natural, sino que también puede modificarse según las condiciones a las que se expongan las MSCs. Tras un periodo de cultivo prolongado la expresión de MHC II suele disminuir, aunque en algunos casos las MSCs pueden seguir manteniendo una elevada expresión de estas moléculas (Schnabel *et al.*, 2014). Por otro lado, la exposición de las MSCs a factores proinflamatorios como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$  por sus siglas en inglés *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ) y el interferón  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) aumenta la expresión de moléculas MHC (Schnabel *et al.*, 2014; Barrachina *et al.*, 2016).

El aumento de la expresión de moléculas MHC supone un incremento de inmunogenicidad de las MSCs incompatibles y en consecuencia que sean más fácilmente detectadas y destruidas por el sistema inmune (Barrachina *et al.*, 2020; Cequier *et al.*, 2022a). Sin embargo, existe un equilibrio entre las propiedades inmunogénicas e inmunomoduladoras de las MSCs (Cequier *et al.*, 2022b), ya que la exposición a TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  también aumenta la capacidad

inmunomoduladora de las MSCs y mejorar sus efectos antiinflamatorios (Barrachina *et al.*, 2016).

Las MSCs modulan el sistema inmune a través del aumento de linfocitos Tr (Kamm *et al.*, 2021), lo que da lugar a una disminución de linfocitos T y B (Cequier *et al.*, 2022a). Sin embargo, la capacidad inmunomoduladora de las MSCs no es suficiente para evadir la respuesta inmunitaria (Rowland *et al.*, 2021), lo que ha llevado a la investigación de estrategias para potenciar la capacidad inmunoevasiva de las MSCs. Berglund y colaboradores (2017 y 2021) estudiaron la posibilidad de reducir la expresión de moléculas MHC de la superficie celular y demostraron *in vitro* que el tratamiento de MSCs con TGF- $\beta$ 2 reduce la expresión de MHC, así como la expresión de estas moléculas inducida por el INF- $\gamma$ , sin reducir su capacidad de secreción de citoquinas y factores inmunomoduladores.

Dado que aún queda mucho por descubrir sobre las MSCs y su relación con el sistema inmune, actualmente se considera que para evitar rechazos y maximizar la eficacia de las terapias regenerativas solo deberían utilizarse MSCs autólogas o alogénicas con MHC compatible entre donante y receptor (Rowland *et al.*, 2021). Por ello es tan importante el estudio de los haplotipos del MHC de los caballos, ya que facilita emparejar un paciente con un donante compatible.

### 5.2.2. Resistencia y susceptibilidad a enfermedades

A lo largo de los años estudiando la variabilidad del MHC se ha demostrado que existe una relación entre algunos haplotipos y alelos del MHC y la resistencia o susceptibilidad a ciertas enfermedades. Determinar estos haplotipos supondría una ventaja a la hora de identificar animales en riesgo para estas enfermedades (Hughes y Nei, 1992; Brinkmeyer-Langford *et al.*, 2013).

Una de las primeras enfermedades que se asoció con haplotipos del MHC en los caballos fue el sarcoide equino, uno de los tumores más frecuentes en esta especie. El sarcoide equino es una neoplasia cutánea fibroblástica no metastática, pero con un fuerte carácter invasivo cuyo agente etiológico es el Papilomavirus bovino (Lancaster, Theilen y Olson, 1970; Lazary *et al.*, 1985; Goodrich *et al.*, 1998). Aparece de forma asilada o múltiple en distintas localizaciones, a veces inoportunas como el párpado o la zona de la cincha o la cabezada, pero no suele comprometer la vida del animal. A pesar de que existen numerosos tratamientos para el sarcoide equino, uno de los principales es el tratamiento quirúrgico, aunque ser frecuente la recurrencia tras la cirugía (Lazary *et al.*, 1985; Goodrich *et al.*, 1998). La asociación de esta enfermedad con el MHC equino

se ha estudiado en distintas razas. El haplotipo ELA-A3, B1 se ha relacionado con mayor susceptibilidad a desarrollar sarcoides en caballos irlandeses, razas suizas, Silla Francés (Lazary *et al.*, 1985), PSI (Meredith *et al.*, 1986) y mestizos de razas suecas (Broström *et al.*, 1988).

Lazary y colaboradores (1985) determinaron que, junto al haplotipo ELA-A3, B1, los caballos de raza irlandesa con haplotipos ELA-W11 tienen 4 veces más posibilidades de desarrollar sarcoides, mientras que en los caballos de razas suizas y los de la raza Silla Francés, junto al ELA-A3, B1, es el ELA-A5 el haplotipo que se relaciona con una mayor susceptibilidad. Broström y colaboradores (1988) observaron que el haplotipo ELA-A3 en los caballos mestizos de razas suecas supone el doble de riesgo y el haplotipo ELA-W13 implica 3 veces más riesgo de desarrollar sarcoides. Por otro lado, el haplotipo ELA-A5 se ha asociado con un inicio temprano en la aparición de sarcoides y el ELA-W13 con un mayor riesgo de recurrencia después de la cirugía (Broström, 1995).

La rinoneumonitis equina también se ha estudiado para conocer su relación con la variabilidad del MHC. Esta enfermedad está causada por distintos tipos del herpesvirus equino (EHV), el EHV-4 se asocia principalmente con la clínica respiratoria, mientras que EHV-1 se asocia además con abortos, potros enfermos y clínica nerviosa (Ostlund, 1993). El EHV se transmite por el aire e infecta células epiteliales respiratorias y leucocitos mononucleares en linfonodos, dando lugar a una viremia asociada a leucocitos. El EHV-1 también infecta células endoteliales de arterias y capilares del sistema nervioso central, produciendo una vasculitis y en consecuencia una encefalomiелitis (Sasaki *et al.*, 2011a).

Tanto el EHV-1 como el EHV-4 utilizan las moléculas de superficie MHC I como receptores para su entrada en las células a las que infectan (Sasaki *et al.*, 2011a; Azab *et al.*, 2014). Sasaki y colaboradores (2011b) observaron que el aminoácido en la posición 173 del dominio  $\alpha 2$  de la cadena pesada de la molécula MHC I influía en la eficacia de entrada de EHV-1. Así mismo, Azab y colaboradores (2014) determinaron que las moléculas MHC I que no presentaban alanina en esa localización eran altamente resistentes a la entrada de EHV-1 y EHV-4. Sin embargo, la mayoría de moléculas MHC I presentan alanina en la posición 173 por lo que la mayoría de los haplotipos serían susceptibles a esta enfermedad. No obstante, aunque la presencia de alanina es necesaria no es suficiente por sí sola para desarrollar la enfermedad (Azab *et al.*, 2014).

También se ha estudiado la capacidad de las moléculas MHC para presentar antígenos del EHV a los linfocitos Tc y que se produzca una respuesta inmunitaria de lisis de la célula infectada, destruyendo así al virus. Kydd y colaboradores (2006) observaron que las moléculas MHC I de los caballos con haplotipo ELA-A3, B2 eran capaces de presentar los péptidos de la proteína inmediata temprana (proteína IE por sus siglas en inglés *Immediate Early protein*) del EHV y

desencadenar una respuesta celular. Por otro lado, si aparece de forma homocigota, el alelo B2 del haplotipo ELA-A3 se ha asociado también con la pérdida de gestación en yeguas infectadas con el EHV-1 (Kydd *et al.*, 2016). En 2014, Kydd y colaboradores determinaron que en los caballos PSI con haplotipo ELA-A2 las moléculas MHC I eran capaces de presentar los péptidos de la proteína IE y activar a los linfocitos Tc, pero las moléculas MHC I de los caballos PSI con haplotipos ELA-A5 no.

La susceptibilidad y resistencia de la hipersensibilidad a la picadura de insectos (IBH por sus siglas en inglés *Insect Bite Hypersensitivity*) también se ha asociado con haplotipos del MHC. La IBH es una enfermedad multifactorial en la que interactúan un amplio número de genes y distintos factores ambientales. Sin embargo, Andersson y colaboradores (2012) determinaron que los caballos islandeses y los ponis Exmoor presentaban mayor susceptibilidad a la IBH si eran homocigotos para los genes del MHC II. En concreto, el alelo 274 del microsatélite COR122 del MHC II está asociado con la susceptibilidad a la IBH. Por otro lado, el alelo 257 del microsatélite COR113 y el alelo 170 del UMO11 están relacionados con la resistencia a la IBH (Klumplerova *et al.*, 2013).

Otra enfermedad en la que se ha encontrado una relación entre haplotipos y una mayor susceptibilidad es la uveítis recurrente equina (ERU por sus siglas en inglés *Equine Recurrent Uveitis*). Deeg y colaboradores (2004) asociaron el haplotipo ELA-A9 para el MHC I con una mayor susceptibilidad a desarrollar ERU en caballos alemanes de sangre caliente. Posteriormente, Fritz y colaboradores (2014) determinaron en caballos Appaloosa que los alelos 224 y 227 del microsatélite 472-260 y los alelos 205 y 207 del microsatélite EqMCH1 están sobrerrepresentado en caballos con ERU.

McClure y colaboradores (1988) estudiaron la relación de distintas enfermedades con el MHC en caballos PSI y cuarto de milla y asociaron el haplotipo ELA-A9 con una mayor susceptibilidad a la condritis aritenoidea en PSI, pero no encontraron relación entre los haplotipos del MHC y la hemiplejía laríngea ni la criptorquidia. Aunque si encontraron una conexión entre los haplotipos ELA-A4 y A5 y la hernia umbilical, esta no era significativa para determinar que los caballos con dichos haplotipos eran más susceptibles a desarrollar una hernia umbilical.

La compatibilidad del MHC entre yeguas y sementales también se ha estudiado para valorar el efecto que tiene sobre la reproducción. Burger y colaboradores (2015) estudiaron el efecto sobre los niveles de testosterona, el número de espermatozoides eyaculados y la motilidad espermática de caballos expuesto a yeguas con MHC similar (al menos un antígeno MHC igual) o con MHC distinto (ningún antígeno igual). La motilidad espermática no se veía afectada por el

MHC de la yegua, pero los niveles de testosterona y número de espermatozoides sí. Los sementales expuestos a yeguas con MHC similar presentaban niveles de testosterona inferiores y menor número de espermatozoides que los expuestos a yeguas con MHC distinto. Burger y colaboradores (2017) también determinaron que era más probable que las yeguas expuestas a sementales con MHC distinto se quedaran preñadas que si se exponían a sementales con MHC similar.

Por otro lado, Jeannerat y colaboradores (2020) estudiaron el efecto de la compatibilidad del MHC sobre la supervivencia del embrión. La semejanza del MHC entre yeguas y sementales no influía sobre la calidad o el tamaño del embrión ni tampoco influía en la supervivencia del embrión durante los primeros 8 días de gestación a lo largo de su paso por el oviducto. Sin embargo, sí que la supervivencia durante los días 8 y 16, mientras tiene lugar el reconocimiento materno de la gestación hasta su implantación, puede estar afectada por la compatibilidad MHC. Las yeguas que presentan un MHC similar al semental al que son expuestas durante la cubrición tienen más posibilidades de pérdidas de gestación que si son expuestas a sementales con MHC distinto.

Como se ha demostrado en estos estudios la variabilidad del MHC equino puede influir tanto en la capacidad de un individuo para enfrentarse a una enfermedad como en la probabilidad de una yegua de quedarse preñada o llevar a término la gestación. A pesar de que se han determinado haplotipos y alelos concretos que presentan mayor resistencia o susceptibilidad a estas enfermedades, en mucho de los casos se han estudiado solo en razas concretas como el PSI, Silla Francés o Appaloosa entre otras. Por ello sería conveniente no solo estudiar la relación del MHC con otras enfermedades, sino también seguir estudiando su relación con estas mismas enfermedades en otras razas.

## 6. CONCLUSIONES .

- El análisis del MHC equino ha ido evolucionando a lo largo de los años desde el serotipado a la determinación mediante marcadores microsatélites y aunque actualmente están en desarrollo nuevos métodos de genotipado para esta región, la determinación de los haplotipos por marcadores microsatélites sigue siendo la mejor forma de valorar la variabilidad genética del MHC equino.
- Diversos estudios realizados han demostrado que la estrategia reproductiva es uno de los principales factores que afecta a la variabilidad del MHC equino, ya que ciertas razas con mayor control reproductivo, como puede ser el PSI, presentan menor número de haplotipos distintos en comparación con otras razas en la que la selección de reproductores es menos estricta.
- Teniendo en cuenta que el tipo de respuesta inmunitaria que se desencadena frente a un agente está determinado por la molécula MHC que presente el antígeno, la variabilidad del MHC puede influir en la capacidad de reacción de un individuo no solo frente a una agresión inicial, sino también frente a agresiones posteriores a través de la formación de linfocitos de memoria.
- En los caballos, la medicina regenerativa se utiliza principalmente para lesiones del sistema musculoesquelético, siendo los PRPs y las MSCs las terapias más utilizadas. Mientras los PRPs se utilizan solo de forma autóloga, las MSCs también pueden utilizarse de forma alogénica, presentando más ventajas siempre y cuando se compruebe la compatibilidad del MHC entre donante y receptor para evitar el rechazo de las MSCs y el fracaso del tratamiento.
- Se conoce que la resistencia o susceptibilidad a enfermedades está relacionada con el MHC equino y aunque en algunos estudios han podido vincularse claramente ciertos haplotipos y alelos del MHC con la susceptibilidad o resistencia a una enfermedad, en otros no ha podido demostrarse su relación, por lo que es necesario realizar más estudios en más razas y más enfermedades.

## 6. CONCLUSIONS

- Equine MHC analysis has been evolving over the years from serotyping to determination by microsatellite markers and although new genotyping methods for this region are currently under development, haplotyping by microsatellite markers remains the best way to assess the genetic variability of equine MHC.
- Several studies have shown that reproductive strategy is one of the main factors affecting the variability of equine MHC, since certain breeds with greater reproductive control, such as Thoroughbred, have a fewer number of different haplotypes compared to other breeds in which the selection of breeders is less strict.
- Considering that the type of immune response triggered against an agent is determined by the MHC molecule that presents the antigen, MHC variability may influence an individual's ability to react not only to an initial assault, but also to subsequent assaults through the formation of memory lymphocytes.
- In horses, regenerative medicine is mainly used for injuries of the musculoskeletal system, with PRPs and MSCs being the most commonly used therapies. While PRPs are used only autologously, MSCs can also be used allogeneically, presenting more advantages as long as MHC compatibility between donor and recipient is checked to avoid MSCs rejection and treatment failure.
- Disease resistance or susceptibility is known to be related to equine MHC and although in some studies certain MHC haplotypes and alleles have been clearly linked to a disease susceptibility or resistance, in others their relationship has not been demonstrated, and further studies are needed in more breeds and more diseases.



## 7. VALORACIÓN PERSONAL

Realizar este trabajo fin de grado (TFG), me ha permitido asentar mejor algunos conceptos de genética e inmunología, además de conocer mejor la función del MHC y las diferentes aplicaciones que conlleva su variabilidad. Pero la elaboración de este trabajo no solo me ha servido para ampliar mis conocimientos sobre este tema, sino que me ha aportado herramientas útiles para distintos ámbitos de mi futuro profesional. Por ejemplo, me ha ayudado a desarrollar habilidades de búsqueda y selección de información y bibliografía muy útiles para mantenerse al día en un oficio en el que se progresa y se descubren innovaciones continuamente. Otras dos competencias que he podido enriquecer gracias a este trabajo han sido la organización y la planificación, importantes no solo en veterinaria sino en cualquier ámbito tanto profesional como personal.

Además, a pesar de no ser un trabajo experimental, he tenido la oportunidad de participar en el análisis laboratorial de marcadores microsatélites para determinar los haplotipos del MHC equino. Participar en las tareas de laboratorio me ha permitido no solo comprender como se realizan los procedimientos para la determinación de dichos haplotipos como la extracción de ADN, la PCR o la electroforesis capilar, sino también conocer el material, los equipos y funcionamiento de un laboratorio de genética.

### 7.1. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia por haberme apoyado desde el principio. Desde el día que decidí estudiar veterinaria han estado siempre a mi lado y me han ayudado en lo que han podido, preguntándome razas de perro, gatos y vacas, resolviendo dudas de estadística, ayudándome con PowerPoints para estudiar fotos de citología y anatomía patológica, trayéndome la cena a la Facultad el día de Noche Vieja porque estaba de guardia o incluso adaptando sus vacaciones de verano para que pudiera terminar este TFG. Pero sobre todo me han apoyado en los momentos más difíciles, en los meses de exámenes, en esos momentos de estrés y ansiedad, me hacían ver que hay cosas más importantes en la vida que sacar un 9 en un examen.

También quiero dar las gracias a mis tutoras, Sara Fuente y Mirta García, por el apoyo y la ayuda que me ofrecieron cuando estaba perdida y no sabía cómo enforar el TFG, así como por resolver las dudas que me iban surgiendo. Igualmente siento gratitud por la oportunidad que me dieron de poder participar en el análisis laboratorial y conocer un poco más la rama de investigación de la Veterinaria.

Así mismo, quiero agradecer a otra profesora, Alina Cequier, tanto por su presentación en la que explicaba cómo enfrentarse al TFG y cuáles son los detalles más importantes como por su ayuda a la hora de crear un estilo bibliográfico en Mendeley que se pareciera lo máximo posible al que nos pedía la Facultad. De igual modo, aprecio en gran medida sus aclaraciones y las de Carmen Cons sobre los protocolos laboratoriales.

Por último, me gustaría dar las gracias a mis mejores amigas de la Facultad, Jara, Lucía, Carmen y Manuela por ser el mejor grupo de prácticas y estar ahí en los momentos buenos y no tan buenos, compartir nuestras frustraciones sobre el TFG y nuestras incertidumbre sobre nuestro futuro profesional.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Alexander, A.J., Bailey, E. y Woodward, J.G. (1987) "Analysis of the Equine Lymphocyte Antigen System by Southern Blot Hybridization". *Immunogenetics*, 25, pp. 47-54. DOI:10.1007/BF00768832.

Andersson, L.S., Swinbune, J.E., Meadows, J.R.S., Broström, H., Eriksson, S., Fikse, W.F., Frey, R., Sundquist, M., Tseng, C.T., Mikko, S. y Lindgren, G. (2012) "The same ELA class II risk factors confer equine insect bite hypersensitivity in two distinct populations". *Immunogenetics*, 64(3), pp. 201-208. DOI:10.1007/s00251-011-0573-1.

Ankrum, J.A., Ong, J.F. y Karp, J.M. (2014) "Mesenchymal stem cells: Immune evasive, not immune privileged". *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group, pp. 252-260. DOI:10.1038/nbt.2816.

Antczak, D.F., Bailey, E., Barger, B., Bell, T.K., Bernoco, D., Bull, R.W., Byrns, G., Guerin, G., Lazary, S., McClure, J., Mottironi, V.D., Symons, R., Templeton, J. y Varewyck, H. (1986) "Joint Report of the Third International Workshop on Lymphocyte Alloantigens of the Horse, Kennett Square, Pennsylvania, 25-27 April 1984". *Animal Genetics*, 17, pp. 363-373. DOI:10.1111/j.1365-2052.1986.tb00730.x.

Azab, W., Harman, R., Miller, D., Tallmadge, R., Frampton, A.R., Antczak, D.F. y Osterrieder, N. (2014) "Equid herpesvirus type 4 uses a restricted set of equine major histocompatibility complex class I proteins as entry receptors". *Journal of General Virology*, 95(PART 7), pp. 1554-1563. DOI:10.1099/vir.0.066407-0.

Bailey, E., Antczak, D.F., Bernoco, D., Bull, R.W., Fister, R., Guerin, G., Lazary, S., Matthews, S., McClure, J., Meyer, J., Mottironi, V.D. y Templeton, J. (1984) "Joint Report of the Second International Workshop on Lymphocyte Alloantigens of the Horse, held 3-8 October 1982". *Animal Blood Groups and Biochemical Genetics*, pp. 123-132. DOI:10.1111/j.1365-2052.1984.tb01107.x.

Barrachina, L., Remacha, A.R., Romero, A., Vázquez, F.J., Albareda, J., Prades, M., Ranera, B., Zaragoza, P., Martín-Burriel, I. y Rodellar, C. (2016) "Effect of inflammatory environment on equine bone marrow derived mesenchymal stem cells immunogenicity and immunomodulatory properties". *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 171, pp. 57-65. DOI:10.1016/j.vetimm.2016.02.007.

Barrachina, L., Cequier, A., Romero, A., Vitoria, A., Zaragoza, P., Vázquez, F.J. y Rodellar, C. (2020) "Allo-antibody production after intraarticular administration of mesenchymal stem cells (MSCs) in an equine osteoarthritis model: effect of repeated administration, MSC inflammatory stimulation, and equine leukocyte antigen (ELA) compatibility". *Stem Cell Research and Therapy*, 11(1), p. 52. DOI:10.1186/s13287-020-1571-8.

Berglund, A.K., Long, J.M., Robertson, J.B. y Schnabel, L. V. (2021) "TGF- $\beta$ 2 reduces the cell-mediated immunogenicity of equine MHC-mismatched bone marrow-derived mesenchymal stem cells without altering immunomodulatory properties". *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. DOI:10.3389/fcell.2021.628382.

Berglund, A.K. y Schnabel, L. V. (2017) "Allogeneic major histocompatibility complex-mismatched equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells are targeted for death by cytotoxic anti-

major histocompatibility complex antibodies". *Equine Veterinary Journal*, 49(4), pp. 539-544. DOI:10.1111/evj.12647.

Bernoco, D., Antczak, D.F., Bailey, E., Bell, K., Bull, R.W., Byrns, G., Guerin, G., Lazay, G., McClure, J., Templeton, J. y Varewyck, H. (1987) "Joint Report of the Fourth International Workshop on Lymphocyte Alloantigens of the Horse, Lexington, Kentucky, 12-22 October 1985". *Animal Genetics*, 18, pp. 81-94. DOI:10.1111/j.1365-2052.1987.tb00747.x.

Brinkmeyer-Langford, C.L., Cai, J.J., Gill, C.A. y Skow, L.C. (2013) "Microsatellite variation in the equine MHC". *Animal Genetics*, 44(3), pp. 267-275. DOI:10.1111/age.12003.

Broström, H., Fahlbrink, E., Dubath, M.L. y Lazary, S. (1988) "Association between equine leucocyte antigens (ELA) and equine sarcoid tumors in the population of Swedish halfbreds and some of their families". *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 19(3-4), pp. 215-223. DOI:10.1016/0165-2427(88)90109-2.

Broström, H. (1995) "Equine sarcoids. A clinical and epidemiological study in relation to equine leucocyte antigens (ELA)". *Acta veterinaria Scandinavica*, 36(2), pp. 223-236. DOI:10.1186/BF03547691.

Bull, R.W. (Ed. ) (1983) "Joint report of the First International Workshop on Lymphocyte Alloantigens of the Horse held 24-29 October 1981". *Animal Blood Groups and Biochemical Genetics*, 14, pp. 119-137. DOI:10.1111/j.1365-2052.1983.tb01067.x.

Burger, D., Dolivo, G., Marti, E., Sieme, H. y Wedekind, C. (2015) "Female major histocompatibility complex type affects male testosterone levels and sperm number in the horse (*Equus caballus*)". *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1807). DOI:10.1098/rspb.2015.0407.

Burger, D., Thomas, S., Aepli, H., Dreyer, M., Fabre, G., Marti, E., Sieme, H., Robinson, M.R. y Wedekind, C. (2017) "Major histocompatibility complex-linked social signalling affects female fertility". *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1868). DOI:10.1098/rspb.2017.1824.

Cequier, A., Romero, A., Vázquez, F.J., Vitoria, A., Bernad, E., Fuente, S., Zaragoza, P., Rodellar, C. y Barrachina, L. (2022a) "Equine mesenchymal stem cells influence the proliferative response of lymphocytes: effect of inflammation, differentiation and MHC-compatibility". *Animals*, 12(8), p. 984. DOI:10.3390/ani12080984.

Cequier, A., Vázquez, F.J., Romero, A., Vitoria, A., Bernad, E., García-Martínez, M., Gascón, I., Barrachina, L. y Rodellar, C. (2022b) "The immunomodulation–immunogenicity balance of equine Mesenchymal Stem Cells (MSCs) is differentially affected by the immune cell response depending on inflammatory licensing and major histocompatibility complex (MHC) compatibility". *Front Vet Sci*, 9, p. 957153. DOI:10.3389/fvets.2022.957153.

Dahlgren, L.A. (2018) "Regenerative medicine therapies for equine wound management". *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*. W.B. Saunders, pp. 605-620. DOI:10.1016/j.cveq.2018.07.009.

Deeg, C.A., Marti, E., Gaillard, C. y Kaspers, B. (2004) "Equine recurrent uveitis is strongly associated with the MHC class I haplotype ELA-A9". *Equine Veterinary Journal*, 36(1), pp. 73-75. DOI:10.2746/0425164044864651.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Krause, D.S., Deans, R.J., Keating, A., Prockop, D.J. y Horwitz, E.M. (2006) "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement". *Cytotherapy*, 8(4), pp. 315-317. DOI:10.1080/14653240600855905.

Fritz, K.L., Kaese, H.J., Valberg, S.J., Hendrickson, J.A., Rendahl, A.K., Bellone, R.R., Dynes, K.M., Wagner, M.L., Lucio, M.A., Cuomo, F.M., Brinkmeyer-Langford, C.L., Skow, L.C., Mickelson, J.R., Rutherford, M.S. y McCue, M.E. (2014) "Genetic risk factors for insidious equine recurrent uveitis in Appaloosa horses". *Animal Genetics*, 45(3), pp. 392-399. DOI:10.1111/age.12129.

Goodrich, L., Gerber, H., Marti, E. y Antczak, D.F. (1998) "Equine sarcoids". *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 14(3), pp. 607-623. DOI:10.1016/s0749-0739(17)30189-x.

Gustafson, A.L., Tallmadge, R.L., Ramlachan, N., Miller, D., Bird, H., Antczak, D.F., Raudsepp, T., Chowdharya, B.P. y Skow, L.C. (2003) "An ordered BAC contig map of the equine major histocompatibility complex". *Cytogenetic and Genome Research*, 102(1-4), pp. 189-195. DOI:10.1159/000075747.

Holmes, C.M., Violette, N., Miller, D., Wagner, B., Svansson, V. y Antczak, D.F. (2019) "MHC haplotype diversity in Icelandic horses determined by polymorphic microsatellites". *Genes and Immunity*, 20(8), pp. 660-670. DOI:10.1038/s41435-019-0075-y.

Hughes, A.L. y Nei, M. (1992) "Models of Host-Parasite Interaction and MHC Polymorphism". *Genetics*, 132(3), pp. 863-864. DOI:10.1093/genetics/132.3.863.

Jaworska, J., Ropka-Molik, K., Wocławek-Potocka, I. y Siemieniuch, M. (2020) "Inter- and intrabreed diversity of the major histocompatibility complex (MHC) in primitive and draft horse breeds". *PLoS ONE*, 15(2). DOI:10.1371/journal.pone.0228658.

Jeannerat, E., Marti, E., Thomas, S., Herrera, C., Sieme, H., Wedekind, C. y Burger, D. (2020) "Embryo survival in the oviduct not significantly influenced by major histocompatibility complex social signaling in the horse". *Scientific Reports*, 10(1). DOI:10.1038/s41598-020-58056-w.

Kafrawy, A.H. (2002) "Chapter 17: Immune System.". En: Bricker, S.L., Langlais, R.P. y Miller, C.S. *Oral Diagnosis, Oral Medicine & Treatment Planning*. Hamilton, Ontario: BC Decker, pp. 515-531.

Kamm, J.L., Parlane, N.A., Riley, C.B., Gee, E.K., Dittmer, K.E. y McIlwraith, C.W. (2019) "Blood type and breed-associated differences in cell marker expression on equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells including major histocompatibility complex class II antigen expression". *PLoS ONE*, 14(11). DOI:10.1371/journal.pone.0225161.

Kamm, J.L., Riley, C.B., Parlane, N.A., Gee, E.K. y McIlwraith, C.W. (2021) "Immune response to allogeneic equine mesenchymal stromal cells". *Stem Cell Research and Therapy*, 12, p. 570. DOI:10.1186/s13287-021-02624-y.

Klumplerova, M., Vychodilova, L., Bobrova, O., Cvanova, M., Futas, J., Janova, E., Vyskocil, M., Vrtkova, I., Putnova, L., Dusek, L., Marti, E. y Horin, P. (2013) "Major histocompatibility complex and other allergy-related candidate genes associated with insect bite hypersensitivity in Icelandic horses". *Molecular Biology Reports*, 40(4), pp. 3333-3340. DOI:10.1007/s11033-012-2408-z.

Kydd, J.H., Davis-Poynter, N.J., Birch, J., Hannant, D., Minke, J., Audonnet, J.C., Antczak, D.F. y Ellis, S.A. (2006) "A molecular approach to the identification of cytotoxic T-lymphocyte epitopes

within equine herpesvirus 1". *Journal of General Virology*, 87(9), pp. 2507-2515. DOI:10.1099/vir.0.82070-0.

Kydd, J.H., Case, R., Minke, J., Audonnet, J.C., Wagner, B. y Antczak, D.F. (2014) "Immediate-early protein of equid herpesvirus type 1 as a target for cytotoxic T-lymphocytes in the Thoroughbred horse". *Journal of General Virology*, 95(PART 8), pp. 1783-1789. DOI:10.1099/vir.0.065888-0.

Kydd, J.H., Case, R., Winton, C., MacRae, S., Sharp, E., Ricketts, S.L., Rash, N. y Newton, J.R. (2016) "Polarisation of equine pregnancy outcome associated with a maternal MHC class I allele: Preliminary evidence". *Veterinary Microbiology*, 188, pp. 34-40. DOI:10.1016/j.vetmic.2016.04.004.

Lancaster, W.D., Theilen, G.H. y Olson, C. (1970) "Hybridization of bovine papilloma virus type 1 and type 2 DNA to DNA from virus-induced hamster tumors and naturally occurring equine tumors". *Intervirology*, 11(4), pp. 227-233. DOI:10.1159/000149038.

Lazary, S., Gerber, H., Glatt, P.A. y Straub, R. (1985) "Equine leucocyte antigens in sarcoid-affected horses". *Equine Veterinary Journal*, 17(4), pp. 283-286. DOI:10.1111/j.2042-3306.1985.tb02498.x.

Lazary, S., Antczak, D.F., Bailey, E., Bell, T.K., Bernoco, D., Byrns, G. y McClure, J.J. (1988) "Joint Report of the Fifth International Workshop on Lymphocyte Alloantigens of the Horse, Baton Rouge, Louisiana, 31 Oct-1 Nov 1987". *Animal Genetics*, 19, pp. 447-456. DOI:10.1111/j.1365-2052.1988.tb00836.x.

Mak, T.W. y Saunders, M.E. (2005) *The immune response: Basic and clinical principles*. (1ª ed.) Neva York: Elsevier Science & Technology, pp. 1-552.

Makinen, A., Chowdhary, B., Mahdy, E., Andersson, L. y Gustavsson, I. (1989) "Localization of the equine major histocompatibility complex (ELA) to chromosome 20 by in situ hybridization". *Hereditas*, 110(1), pp. 93-96. DOI:10.1111/j.1601-5223.1989.tb00425.x.

McClure, J.J., Koch, C., Powell, M. y McClure, J.R. (1988) "Association of arytenoid chondritis with equine lymphocyte antigens but no association with laryngeal hemiplegia, umbilical hernias and cryptorchidism". *Animal Genetics*, 19(4), pp. 427-433. DOI:10.1111/j.1365-2052.1988.tb00834.x.

McCue, M.E., Bannasch, D.L., Petersen, J.L., Gurr, J., Bailey, E., Binns, M.M., Distl, O., Guérin, G., Hasegawa, T., Hill, E.W., Leeb, T., Lindgren, G., Penedo, M.C.T., Røed, K.H., Ryder, O.A., Swinburne, J.E., Tozaki, T., Valberg, S.J., Vaudin, M. *et al.* (2012) "A high density SNP array for the domestic horse and extant Perissodactyla: Utility for association mapping, genetic diversity, and phylogeny studies". *PLoS Genetics*, 8(1). DOI:10.1371/journal.pgen.1002451.

Meredith, D., Elser, A.H., Wolf, B., Soma, L.R., Donawick, W.J. y Lazary, S. (1986) "Equine leukocyte antigens: Relationships with sarcoid tumors and laminitis in two pure breeds". *Immunogenetics*, 23(4), pp. 221-225. DOI:10.1007/bf00373016.

Ostlund, E.N. (1993) "The equine herpesviruses". *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 9(2), pp. 283-294. DOI:10.1016/S0749-0739(17)30396-6.

Pezzanite, L.M., Fortier, L.A., Antczak, D.F., Cassano, J.M., Brosnahan, M.M., Miller, D. y Schnabel, L. V. (2015) "Equine allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells elicit antibody

responses in vivo". *Stem Cell Research and Therapy*, 6(1), p. 54. DOI:10.1186/s13287-015-0053-x.

Ranera, B., Lyahyai, J., Romero, A., Vázquez, F.J., Remacha, A.R., Bernal, M.L., Zaragoza, P., Rodellar, C. y Martín-Burriel, I. (2011) "Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue". *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 144(1-2), pp. 147-154. DOI:10.1016/j.vetimm.2011.06.033.

Remacha, A.R., Barrachina, L., Álvarez-Arguedas, S., Ranera, B., Romero, A., Vázquez, F.J., Zaragoza, P., Yañez, R., Martín-Burriel, I. y Rodellar, C. (2015) "Expression of genes involved in immune response and in vitro immunosuppressive effect of equine MSCs". *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 165(3-4), pp. 107-118. DOI:10.1016/j.vetimm.2015.04.004.

Ribitsch, I., Oreff, G.L. y Jenner, F. (2021) "Regenerative medicine for equine musculoskeletal diseases". *Animals*. MDPI AG, pp. 234-234. DOI:10.3390/ani11010234.

Rowland, A.L., Miller, D., Berglund, A., Schnabel, L. V., Levine, G.J., Antczak, D.F. y Watts, A.E. (2021) "Cross-matching of allogeneic mesenchymal stromal cells eliminates recipient immune targeting". *Stem Cells Translational Medicine*, 10(5), pp. 694-710. DOI:10.1002/sctm.20-0435.

Sadeghi, R., Moradi-Shahrabak, M., Miraei Ashtiani, S.R., Miller, D.C. y Antczak, D.F. (2018) "MHC haplotype diversity in Persian Arabian horses determined using polymorphic microsatellites". *Immunogenetics*, 70(5), pp. 305-315. DOI:10.1007/s00251-017-1039-x.

Sasaki, M., Hasebe, R., Makino, Y., Suzuki, T., Fukushi, H., Okamoto, M., Matsuda, K., Taniyama, H., Sawa, H. y Kimura, T. (2011a) "Equine major histocompatibility complex class I molecules act as entry receptors that bind to equine herpesvirus-1 glycoprotein D". *Genes to Cells*, 16(4), pp. 343-357. DOI:10.1111/j.1365-2443.2011.01491.x.

Sasaki, M., Kim, E., Igarashi, M., Ito, K., Hasebe, R., Fukushi, H., Sawa, H. y Kimura, T. (2011b) "Single amino acid residue in the A2 domain of major histocompatibility complex class I is involved in the efficiency of equine herpesvirus-1 entry". *Journal of Biological Chemistry*, 286(45), pp. 39370-39378. DOI:10.1074/jbc.M111.251751.

Schnabel, L. V., Pezzanite, L.M., Antczak, D.F., Felipe, M.J.B. y Fortier, L.A. (2014) "Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells are heterogeneous in MHC class II expression and capable of inciting an immune response in vitro". *Stem Cell Research and Therapy*, 5, pp. 13-13. DOI:10.1186/scrt402.

Smith, R.K.W., Garvican, E.R. y Fortier, L.A. (2014) "The current «state of play» of regenerative medicine in horses: What the horse can tell the human". *Regenerative Medicine*. Future Medicine Ltd., pp. 673-685. DOI:10.2217/rme.14.42.

Spaas, J.H., Guest, D.J. y Van De Walle, G.R. (2012) "Tendon regeneration in human and equine athletes: Ubi Sumus-Quo Vadimus (where are we and where are we going to)?" *Sports Med*, 42(10), pp. 871-890. DOI:10.1007/BF03262300.

Tallmadge, R.L., Campbell, J.A., Miller, D.C. y Antczak, D.F. (2010) "Analysis of MHC class I genes across horse MHC haplotypes". *Immunogenetics*, 62(3), pp. 159-172. DOI:10.1007/s00251-009-0420-9.

Tseng, C.T., Miller, D., Cassano, J., Bailey, E. y Antczak, D.F. (2010) "Identification of equine major histocompatibility complex haplotypes using polymorphic microsatellites". *Animal Genetics*, 41(2), pp. 150-153. DOI:10.1111/j.1365-2052.2010.02125.x.

Vasoya, D., Tzelos, T., Benedictus, L., Karagianni, A.E., Pirie, S., Marr, C., Oddsdóttir, C., Fintl, C. y Connelley, T. (2023) "High-Resolution Genotyping of Expressed Equine MHC Reveals a Highly Complex MHC Structure". *Genes*, 14(7). DOI:10.3390/genes14071422.