

Secuenciación de un fragmento de ADNc homólogo a interleucina-1 alfa humana derivado de leucocitos de armadillo (*Dasypus novemcinctus*)

Sequencing of an armadillo (*Dasypus novemcinctus*) leukocyte-derived cDNA fragment homolog to human interleukin-1 alpha.

Saúl Flores-Medina*** Francisco J. Díaz-García*** Fernando M. Guerra-Infante*

Abstract

Messenger RNA (RNAm) detection was done by a reverse-transcription assay coupled to the polymerase chain reaction (RT-PCR) specific for human interleukin-1 alpha on armadillo leukocytes stimulated with phorbol myristate acetate (PMA). This strategy allowed amplifying a DNA fragment of 491 bp. Furthermore, the sequence showed high nucleotide homology with the human (99%), monkey (93%), pig (82%), horse (81%) and llama (81%) cDNA. Meanwhile, the deduced amino acid sequence was compatible with the precursor of the human interleukin-1 alpha. These results suggest the presence of the interleukin-1 gene in the armadillo genome. However, it is necessary to characterize the complete sequence of the gene and prove the functionality of the translated protein to clarify the immune response mechanisms in the armadillo against *Mycobacterium leprae*.

Key words: *DASYPUS NOVEMCINCTUS*, INTERLEUKIN-1, RT-PCR, SEQUENCING.

Resumen

Se realizó detección del ARN mensajero (ARNm) mediante un ensayo de transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) específico para la detección de Interleucina-1 alfa humana en leucocitos de armadillo estimulados con acetato de forbol miristato (PMA, por su siglas en inglés); esta estrategia permitió amplificar un fragmento de ADN de 491 pares de bases. Adicionalmente, la secuencia mostró alta homología nucleotídica con las secuencias de ADNc humano (99%), mono (93%), cerdo (82%), caballo (81%) y llama (81%), mientras que la secuencia deducida de aminoácidos fue compatible con el precursor de la proteína IL-1 α humana. Estos resultados sugieren presencia del gen de interleucina-1 en el genoma del armadillo; sin embargo, es necesario caracterizar la secuencia completa del gen y comprobar la funcionalidad de la proteína traducida para dilucidar los mecanismos de la respuesta inmune del armadillo contra *Mycobacterium leprae*.

Palabras clave: *DASYPUS NOVEMCINCTUS*, INTERLEUCINA-1, RT-PCR, SECUENCIACIÓN.

Recibido el 1 de agosto de 2007 y aceptado el 13 de febrero de 2008.

*Laboratorio de Microbiología Veterinaria, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Casco de Santo Tomás, C.P. 11340, México, D. F., correo electrónico: s.flores@servidor.inper.edu.mx Correspondencia: misma dirección.

**Área de Materias Tecnológicas y Academia de Química. CECyT 15 Diódoro Antúnez Echegaray, Instituto Politécnico Nacional, Av. Dr. Gastón Melo 441, C.P. 12100, Col. San Antonio Tecomitl, México, D. F.

***Laboratorio de Biología Molecular, Edificio de Investigación, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, C.P. 04510, México, D. F.

Introduction

Interleukin-1 (IL-1) is a pro-inflammatory cytokine with several activities. It is mainly synthesized by monocytes and other types of cells, including fibroblasts, endothelial cells, dendritic cells and keratinocytes, among others.^{1,2} IL-1 is important for hematogenesis and the regulation of the inflammatory immune response.^{1,2} IL-1 has been cloned and sequenced in another species,³⁻⁵ but these genes have only been totally characterized in humans and mice.^{6,7}

The IL-1 molecule has two biological active forms; IL-1 alpha (IL-1 α) and IL-1 beta (IL-1 β). The genes that encode for each of the members of this family are located in the long arm of chromosome 2. Both forms come from precursors called pro-IL-1 α and pro-IL-1 β with 31 kDa, while the more mature forms of IL-1 α and IL-1 β have an approximated weight of 17 kDa, respectively, and join the same receptor with similar affinity causing the same biological activity.⁶ In the nine banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*) the presence of IL-1 has never been reported and it is considered as the only animal model able to experimentally reproduce lepromatous leprosy, similar to the one produced in humans.⁸

The presence of a molecule with similar activity to the tumor necrosis factor alpha (TNF- α) has been recently demonstrated in the supernatant from nine-banded armadillo leukocyte culture.⁹ Meanwhile, van Dyk and Jong¹⁰ cloned and sequenced a fragment of the TNF gene of the *Cabassous unicinctus* armadillo species that showed 88% nucleotide homology regarding its human counterpart. Based on this, it is possible to assume that armadillos are capable of releasing cytokines similar to those identified in other species. Actually, human IL-1 shares genetic, structural and functional characteristics with those of IL-1 in other vertebrate and invertebrate species. It suggests that this molecule has been preserved across evolution.¹¹⁻¹³

The objective of this study was to detect a fragment of the messenger RNA (mRNA) by means of a reverse-transcription assay coupled to the polymerase chain reaction (RT-PCR), specific for human IL-1 α applied to armadillo leukocytes stimulated with phorbol myristate acetate (PMA). The five nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*) used in this study were captured in Chilapa, Guerrero, Mexico, sent to the laboratory animal center of Escuela Nacional de Ciencias Biológicas of Instituto Politécnico Nacional, for their adaptation.

Ten milliliters of peripheral blood were collected by cardiac puncture from five animals anesthetized with base ketamine.* The blood was transferred into tubes with anticoagulant (EDTA 5 mg) and at the same time were stimulated with 50 ng/mL of PMA,**

Introducción

La interleucina-1 (IL-1) es una citocina pro-inflamatoria con actividad plurifuncional, sintetizada predominantemente por monocitos y otros tipos de células que incluyen fibroblastos, células endoteliales, células dendríticas y keratinocitos, entre otros.^{1,2} La IL-1 es importante en la hematogénesis y en la regulación de las respuestas inmune e inflamatoria.^{1,2} En otras especies los genes de la IL-1 se han clonado y secuenciado,³⁻⁵ pero sólo en el humano y ratón dichos genes han sido totalmente caracterizados.^{6,7}

La molécula de IL-1 se encuentra en dos formas biológicamente activas; IL-1 alfa (IL-1 α) e IL-1 beta (IL-1 β), los genes que codifican para cada uno de los miembros de esta familia se localizan en el brazo largo del cromosoma 2. Ambas formas provienen de precursores denominados pro-IL-1 α y pro-IL-1 β de 31 kDa, mientras que las formas maduras de la IL-1 α e IL-1 β presentan un peso aproximado de 17 kDa, respectivamente, y se unen al mismo receptor con afinidad similar ejerciendo la misma actividad biológica.⁶ En el armadillo de nueve bandas (*Dasypus novemcinctus*) nunca se ha registrado presencia de IL-1 y es considerado como el único modelo animal capaz de reproducir experimentalmente la lepra lepromatosa, similar a la producida en humanos.⁸

Recientemente se demostró presencia de una molécula con actividad semejante al factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en el sobrenadante de un cultivo de leucocitos de armadillo de nueve bandas,⁹ mientras que Van Dyk y Jong¹⁰ clonaron y secuenciaron un fragmento del gen de TNF en la especie de armadillo *Cabassous unicinctus*, que presentó homología nucleotídica de 88% respecto de su contraparte humana. Con estos hallazgos se puede suponer que los armadillos son capaces de liberar citocinas similares a las identificadas en otras especies. De hecho, la IL-1 humana comparte características genéticas, estructurales y funcionales con la IL-1 de otras especies de vertebrados e invertebrados, lo que sugiere que esta molécula se ha conservado evolutivamente.¹¹⁻¹³

El objetivo del presente trabajo fue detectar un fragmento de ARN mensajero (ARNm) mediante un ensayo de transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), específico a la IL-1 α humana, en leucocitos de armadillo estimulados con acetato de forbol miristato (PMA). En este estudio se emplearon cinco armadillos de nueve bandas (*Dasypus novemcinctus*) capturados en Chilapa, Guerrero, México, que se enviaron al bioterio de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, del Instituto Politécnico Nacional, para su adaptación.

Se recolectaron 10 mL de sangre periférica mediante punción cardíaca en cinco animales anes-

as it was previously described.⁹ The tubes were incubated at 37° C in a 5% CO₂ atmosphere during 4 h, then centrifuged at 450 g for 20 minutes. The leukocyte fraction was separated and washed twice with erythrocyte lysis solution (10 mM Tris-base pH 7.6, 5 mM MgCl₂ and 10 mM NaCl) in order to purify total RNA using Tripure Isolation Reagent,^{***} according to manufacturer instructions. Because of IL-1 α mRNA goes through post-transcriptional modification, it was not treated with DNAases. The obtained RNA from the five animals was placed in a single tube for further analysis.

The synthesis of the complementary chain (cDNA) was done by using 1 μ g of the purified RNA, oligo(dT) \dagger primer and Moloney-Murine Leukemia Virus \ddagger reverse transcriptase. RNA obtained from the five animals was placed in one tube for its later analysis. Four microliters of the obtained cDNA were submitted to amplification by polymerase chain reaction (PCR) in a final volume of 50 μ L. The reaction mixture contained: 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 0.2 μ M of each dNTP, 1.75 mM of MgCl₂, 1.5 units of Taq DNA polymerase^o and 20 pmol/ μ L of each primer F-5'-CAA GGA GAG CAT GGT GGT AGT AGC AAC CAA CG-3'; R-3'- 'TAG TGC CGT GAG TTT CCC AGA AGA AGA GGA GG-5'. The amplification was done under the following conditions: initial denaturalization 94° C/3 min, followed by 40 cycles of 94° C/1 min, 61° C/1.5 min and 72° C/2 min with a final extension of 72° C, during 7 min. Each run included negative and positive controls. The amplified products were resulted in a 2% agarose gel, stained with ethidium bromide (Figure 1). The expected fragment was purified directly from the gel using the QIAquick Gel Extraction kit^{oo} and analyzed in an ABI-PRISM 3100 automatic sequencer.^{ooo}

The direct amplification from the probable contaminant genomic DNA is not probable under these conditions. Besides, its size would be much larger (> 5 kb) than that of the amplified cDNA. Furthermore, the alignment of the obtained sequence (GenBank access: AY800133) regarding other sequences (Figure 2), revealed high nucleotide homology with the complementary chains of the human (99%), monkey (93%), pig (82%), horse (81%) and llama (81%) IL-1 α . The sequence showed in Figure 3 presented a fragment compatible with the human IL-1 precursor. It is necessary to clarify that the results obtained, regarding nucleotide homologies, represent only a small fragment (491 bp) and not the whole protein, in this sense, if the complete nucleotide sequence was available, maybe the homology among these species, and especially with human, would be smaller.

Based on such results, it can be speculated that the armadillo molecule related to the IL-1 α might

tesiadados con ketamina base.* La sangre se transfirió a tubos que contenían anticoagulante (EDTA 5 mg) y al mismo tiempo se estimularon con 50 ng/mL de PMA** como se describió previamente.⁹ Los tubos se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% durante 4 h, luego se centrifugaron a 450 g por 20 minutos. La fracción de leucocitos se separó y se lavó dos veces con solución de lisis para eritrocitos (Tris-base 10 mM pH 7.6, MgCl₂ 5 mM y NaCl 10 mM) con el fin de purificar el ARN total empleando Tripure Isolation Reagent,^{***} según las instrucciones del proveedor. Debido a que el ARNm de IL-1 α sufre modificación postranscripcional, éste no se trató con ADNsas. El ARN obtenido en los cinco animales se colocó en un solo tubo para su análisis posterior.

La síntesis de la cadena complementaria (ADNc) se realizó al usar 1 μ g del ARN purificado, iniciador oligo(dT) \dagger y transcriptasa reversa Moloney-Murine Leukemia Virus. \ddagger El ARN obtenido en los cinco animales se colocó en un solo tubo para su análisis posterior. Cuatro microlitros del ADNc obtenido se sometieron a amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en volumen final de 50 μ L. La mezcla de reacción contenía: 20 mM de Tris-HCl pH 8.4, 50 mM de KCl, 0.2 μ M de cada dNTP, 1.75 mM de MgCl₂, 20 pmol/ μ L de cada iniciador; F-5'-CAAGGAGAGCATGGTGGTAGTAGCAACCAA CG-3', R-3'-TAGTGCCGTGAGTTCCCAAGAAGAGGAGG-5' y 1.5 unidades de Taq ADN polimerasa.^o La amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 94°C/3 min, seguida por 40 ciclos de 94°C/1 min, 61°C/1.5 min y 72°C/2 min con una extensión final de 72°C, durante 7 min. En cada corrida se incluyó un testigo negativo y otro positivo. Los productos amplificados fueron resueltos en un gel de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio (Figura 1); el fragmento esperado fue purificado directamente del gel empleando el software kit QIAquick Gel Extraction^{oo} y procesado en un secuenciador automatizado ABI-PRISM 3100.^{ooo}

La amplificación directa a partir de probable ADN genómico contaminante no es probable bajo estas condiciones, además el tamaño de éste sería mucho mayor (> 5 kb) que el del amplificado de ADNc. Asimismo, la alineación de la secuencia obtenida (número de acceso en el GenBank: AY800133) con respecto a otras secuencias (Figura 2), reveló alta homología nucleotídica con cadenas complementarias de IL-1 α

*Revetmex, S.A., México.

**Sigma, Estados Unidos de América.

***Roche, Estados Unidos de América

\dagger Promega, Estados Unidos de América.

\ddagger Promega, Estados Unidos de América.

^oInvitrogen, Estados Unidos de América.

^{oo}QIAGEN, Alemania.

^{ooo}Applied Biosystem, Estados Unidos de América.

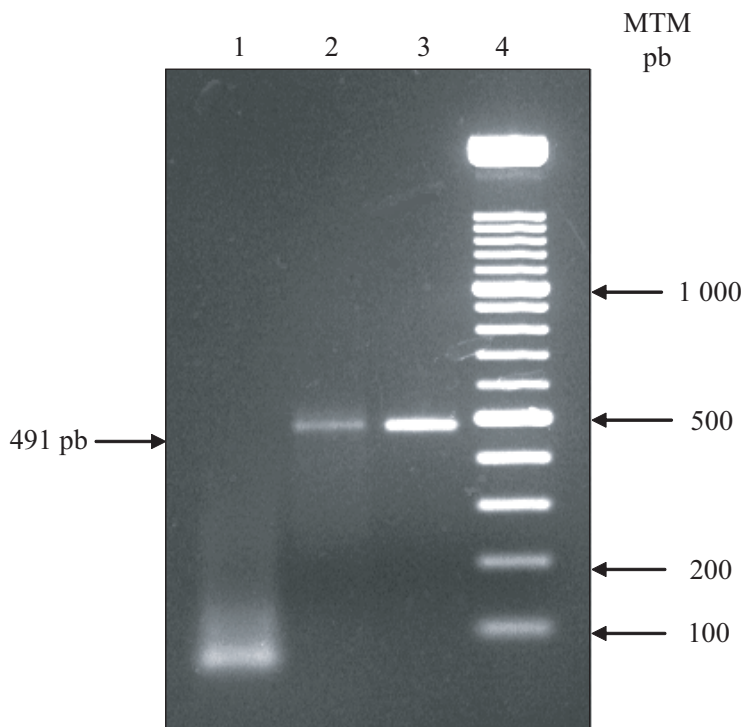


Figura 1: Perfil de amplificación por RT-PCR del ADNc de armadillo empleando iniciadores específicos para IL-1 humana. Carril 1: Testigo negativo sin ADNc blanco; carril 2: Muestra de armadillo; carril 3: Testigo positivo; carril 4: Marcador de tamaño molecular (MTM) de 100 pb.

Figure 1: Amplification profile by RT-PCR of the armadillo cDNA using primers specific for human IL-1. Lane 1: Negative control without target cDNA; lane 2: Armadillo sample; lane 3: Positive control; lane 4: Molecular size marker (MSM) 100 bp.

display a biological functionality similar to that of the human IL-1 α . In fact, the presence of a protein similar to the IL-1, that was purified from the starfish coeloma, showed similar activity to human and mice IL-1.¹¹ This suggests that IL-1 functionality has been evolutionary preserved among vertebrate and invertebrate species.^{11,14}

Despite the fact that the IL-1 activity has been detected in supernatants from cultures of neutrophils and other phagocytic cells,^{11,15,16} the presence of this molecule in the supernatants from armadillo leukocyte cultures has not been proved yet. Therefore, the detection of a mRNA sequence related to IL-1 in armadillo opens the possibility to isolate the complete gene and widen up research on the genetic regulation of its synthesis and release posterior to mycobacterium or lipoarabinomannan antigenic stimulation. That would help to understand the importance of these phagocytic cells in the response to *M. leprae* infection and clarify why only some animals develop leprosy after an experimental inoculation with this bacterium.^{17,18} Resuming, the detection of an mRNA fragment related to IL-1 in the armadillo, supports the presence of cytokines in this animal. It might also provide the molecular bases to investigate their presence in this mammal. However, additional research is required to prove its structure and functionality and then understand its immune regulation and function for leprosy control and eradication.

de humano (99%), mono (93%), cerdo (82%), caballo (81%) y llama (81%). En la Figura 3 se muestra la secuencia, la cual presentó un fragmento compatible con el precursor de la IL-1 humana. Es necesario aclarar que los resultados obtenidos con respecto a las homologías nucleotídicas representan sólo un pequeño fragmento (491 pares de bases) y no toda la proteína, de manera que si se contara con la secuencia nucleotídica completa, quizá la homología entre estas especies y en especial con la del humano sería menor.

Con tales resultados se puede especular que en el armadillo la molécula relacionada con IL-1 α podría desplegar una funcionalidad biológica similar a la interleucina-1 α humana. De hecho, la presencia de una proteína semejante a la IL-1, que fue purificada del celoma de una estrella de mar, presentó actividad similar a la IL-1 de humano y de ratón,¹¹ ello sugiere que la funcionalidad de la IL-1 ha sido conservada evolutivamente en especies de vertebrados y de invertebrados.^{11,14}

A pesar de que la actividad de la IL-1 ha sido fácilmente detectada en sobrenadantes de cultivos de neutrófilos y otras células fagocíticas,^{11,15,16} la presencia de esta molécula en los sobrenadantes de cultivos de leucocitos de armadillo no se ha demostrado aún. Por tanto, la detección de una secuencia del ARNm relacionada con la IL-1 en el armadillo abre la posibilidad de aislar el gen completo y ampliar las investigaciones sobre la regulación genética de su síntesis y liberación posterior a la estimulación con antígenos micobacterianos o de lipoarabinomannana, lo cual ayudaría a

<i>D. novemcinctus</i>	1	caaggagagcatggtggttagtagcaaccaacgggaaggttctgaagaagacggttgag	60
<i>H. sapiens</i>	201	260
<i>M. mulatta</i>	201c.....t.....t.....	260
<i>S. scrofa</i>	241c..tg.....a.g.c.....g.....a.....	300
<i>E. caballus</i>	212g.....c.g.g.....g.....ac.....	271
<i>L. glama</i>	201tg.....a.g.g.....g.....t.a.a.....c.....	260
<i>D. novemcinctus</i>	61	ttaagccaatccctcgtgatgatgacctggaggccatcgacaatgactcagaggaaga	120
<i>H. sapiens</i>	261a.a.....c.....	320
<i>M. mulatta</i>	261g.a.a.a.a.....c.c.....	320
<i>S. scrofa</i>	301at.g.t.a.a.c.....c.....a.....t.c.....a.a.....	360
<i>E. caballus</i>	272at.g.t.a.a.ca.....a.....t.c.....tc.....a.g.....	331
<i>L. glama</i>	261	c.....at.g.t.a.a.c.....a.....t.c.....a.a.....	320
<i>D. novemcinctus</i>	121	aatcatcaagcctaggtcagcaccttttagcttctctgagcaatgtgaaatacaactttat	180
<i>H. sapiens</i>	321	380
<i>M. mulatta</i>	321c.....g.....a.....a.c.....	380
<i>S. scrofa</i>	361c.a.....a.a.ac.....a.....ca.....c.....	420
<i>E. caballus</i>	332g.cc.a.....t.a.ac.a.....a.....aca.....	391
<i>L. glama</i>	321c.a.....t.....ac.at.c.g.a.....c.....a.....	380
<i>D. novemcinctus</i>	181	gaggatcatcaaatacgaattcatctgaatgacgcctcaatcaaagtataattcgag-	239
<i>H. sapiens</i>	381	439
<i>M. mulatta</i>	381	a.....c.....c.....	439
<i>S. scrofa</i>	421g.....cc.c.g.g.....t.g.....c.c.....	480
<i>E. caballus</i>	392g.....cc.c.g.g.t.ct.....t.....g.....	451
<i>L. glama</i>	381g.....cc.c.g.g.....t.....g.....	440
<i>D. novemcinctus</i>	240	ccaatga--tcagtacctcagcgctgctgcattacataatctggatgaagcagtgaaatt	297
<i>H. sapiens</i>	440	497
<i>M. mulatta</i>	440c.....a.....	497
<i>S. scrofa</i>	481	..cg.c.....a.....t.....tgc.a.....c.....g.....	540
<i>E. caballus</i>	452	ac.c.....a.t.tg.a.....a.....c.c.....	511
<i>L. glama</i>	441	..cg.c.....a.....t.....c.tg.a.....c.....ca.c.....	500
<i>D. novemcinctus</i>	298	tgacatgggtgcttataagtcatcaaaggatgatgctaaaattaccgtgattctaagaat	357
<i>H. sapiens</i>	498	557
<i>M. mulatta</i>	498c.....a.....g.c.t.....	557
<i>S. scrofa</i>	541c.....t.....t.gc.c.c.t.....c.....	597
<i>E. caballus</i>	512g.a.g.....t.c.c.c.t.....c.....	568
<i>L. glama</i>	501g.a.g.....t.c.gc.c.t.....c.....	557
<i>D. novemcinctus</i>	358	ctcaaaaactcaattgtatgtgactgcccaagatgaagaccaaccagtgctgctgaagga	417
<i>H. sapiens</i>	558	617
<i>M. mulatta</i>	558g.....g.....	617
<i>S. scrofa</i>	598g.....c.g.c.....t.....g.....t.a.c.....g.....c.....t.....	657
<i>E. caballus</i>	569g.c.....t.....g.....a.....tg.....c.a.....a.....	628
<i>L. glama</i>	558c.....t.....g.....t.a.....g.....c.....ct.....a.....	617
<i>D. novemcinctus</i>	418	gatgcctgagatacccaaaaccatcacaggtagtgagaccaacctctcttctcttgga	477
<i>H. sapiens</i>	618	677
<i>M. mulatta</i>	618aa.....t.....	677
<i>S. scrofa</i>	658c.....c.....a.....a.....gt.....	714
<i>E. caballus</i>	629c.c.....t.....a.....a.....	685
<i>L. glama</i>	618c.....c.....t.....a.....a.....	674
<i>D. novemcinctus</i>	478	aact-cacggcacta	491
<i>H. sapiens</i>	678	691
<i>M. mulatta</i>	678t.....	691
<i>S. scrofa</i>	715	..ag--t...a..	728
<i>E. caballus</i>	686	..cg-.....t..	699
<i>L. glama</i>	675	..aa..t..t..-	688

Organism	cDNA fragment length (bp)	Nucleotide identities (%)	Gaps (%)
<i>H. sapiens</i>	491	99	0
<i>M. mulatta</i>	491	93	0
<i>S. scrofa</i>	488	82	2
<i>E. caballus</i>	488	81	2
<i>L. glama</i>	488	81	2

Figura 2: Alineamiento del fragmento de ADNc de armadillo con respecto al ADNc de IL-1 de otros mamíferos. Los puntos representan bases idénticas; Las líneas indican espacios. Números de acceso en el GenBank: AY800133 *Dasyus novemcinctus*; BT007014 *Homo sapiens*; U19844 *Macaca mulatta*; AB107645 *Lama glama*; D42146 *Horse*; X52731 *Pig*.

Figure 2: Fragment alignment of armadillo cDNA regarding IL-1 cDNA from other mammals. Points represent identical bases; lines represent spaces. Access numbers for the GenBank: AY800133 *Dasyus novemcinctus*; BT007014 *Homo sapiens*; U19844 *Macaca mulatta*; AB107645 *Lama glama*; D42146 *Horse*; X52731 *Pig*.

caaggagagcatggtgtagtagcaaccaacgggaaggttctgaagaagagacggttgagt
 K E S M V V V A T N G K V L K K R R L S
 ttaagccaatccctcgctgatgatgacctggaggccatcgacaatgactcagaggaagaa
 L S Q S L A D D D L E A I D N D S E E E
 atcatcaagcctaggtcagcaccttttagcttctcctgagcaatgtgaaatacaactttatg
 I I K P R S A P F S F L S N V K Y N F M
 aggatcatcaaatacgaattcatcctgaatgacgccctcaatcaaagtataattcgagcc
 R I I K Y E F I L N D A L N Q S I I R A
 aatgatcagtacctcagggctgctgcattacataatctggatgaagcagtgaaatttgac
 N D Q Y L T A A A L H N L D E A V K F D
 atgggtgcttataagtcatcaaaggatgatgctaaaattaccgtgattctaagaatctca
 M G A Y K S S K D D A K I T V I L R I S
 aaaactcaattgtatgtgactgcccgaagatgaagaccaaccagtgctgctgaaggagatg
 K T Q L Y V T A Q D E D Q P V L L K E M
 cctgagatacccaaaaccatcacaggtagtgagaccaacctcctcttcttctgggaaact
 P E I P K T I T G S E T N L L F F W E T
 cacggcacta
 H G T

Figura 3: Secuencia nucleotídica y secuencia deducida de aminoácidos correspondientes al fragmento amplificado, relacionado con la IL-1 en el armadillo de nueve bandas.

Figure 3: Nucleotide sequence and deduced sequence of the amino acids corresponding to the amplified fragment, related to nine-banded armadillo IL-1.

Referencias

1. Oppenheim JJ, Kovacs EJ, Matsushima K, Durum SK. There is more than one interleukin 1. *Immunol Today* 1986; 7:45-55.
2. Dinarello AC. Proinflammatory cytokines. *CHEST* 2000; 118:503-508.
3. Andrews EA, Barcham GJ, Brandon MR, Nash AD. Molecular cloning and characterization of ovine IL-1 alpha and IL-1 beta. *Immunology* 1991; 74: 453- 132 460.
4. Huether MJ, Lin G, Smith DM, Murtaugh MP, Molitor TW. Cloning, secuencing and regulation of a mRNA encoding porcine interleukin-1 beta. *Gene* 1993; 129:285-289.
5. Denis F, Archambault D. Molecular cloning and characterization of beluga whale (*Delphinapterus leucas*) interleukin-1beta and tumor necrosis factor- alpha. *Can J Vet Res* 2001; 65:233-40.
6. March CJ, Mosley B, Larsen A, Cerratti DP, Braedt G, Price V *et al.* Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* 1985; 315:641-647.
7. Gray PW, Gliaster D, Chen E, Goeddel DV, Pennica

entender la importancia de las células fagocíticas en respuesta a la infección por *M. leprae*, y a clarificar por qué sólo algunos animales desarrollan lepra después de una inoculación experimental con esta bacteria.^{17,18} En síntesis, la detección de un fragmento de ARNm relacionado con IL-1 en el armadillo, apoya la presencia de citocinas en ese animal y pudiera proveer las bases moleculares para investigar su presencia en ese mamífero. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para comprobar su estructura y funcionalidad y así entender su regulación inmune y su función en el control y erradicación de la lepra.

-
- D. Two interleukin 1 genes in the mouse: cloning and expression of the cDNA for murine interleukin 1 beta. *J Immunol* 1986; 137:3644-3648.
 8. Job K. Nine-banded armadillo and leprosy research. *Indian J Pathol Microbiol* 2003; 46:541-550.
 9. Guerra-Infante FM, Lopez-Hurtado M, Flores-Medina S, Zamora-Ruiz A, De Haro-Cruz MaJ. Detection of a tumor necrosis factor-like activity in culture supernatants of armadillo leukocytes. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 2001; 69:354- 150 357.

10. Van Dyjk MA, Jong WW. *Cabassous unicinctus* partial tumor necrosis factor precursor, exon 1. Partial cds. GenBank Data Bank 2000 February 7. Cited: 2006 February 13. Accession Number: AJ286829.
11. Beck G, Habicht GS. Isolation and characterization of a primitive interleukin-1 like protein from an invertebrate, *Asterias forbesi*. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83:7429-7433.
12. Beck G, Habicht GS. Primitive cytokines: harbingers of vertebrate defense. Immunol Today 1991; 121:180-183.
13. Bird S, Zou J, Munday B, Cunningham C, Secombes CJ. Evolution of interleukin-1 beta. Cytokine Growth Factor Rev 2002; 13:483-502.
14. Huising OM, Stet JMR, Savelkoul FJH, Kemenade VLBM. The molecular evolution of the interleukin-1 family of cytokines; IL-18 in teolost fish. Dev Comp Immunol 2004; 28:395-413.
15. Rosenwasser LJ, Dinarello CA. Ability of human leukocyte pyrogen to enhance phytohemagglutinin induced murine thymocyte proliferation. Cell Immunol 1981; 63:134-142.
16. Schmidt JA, Mizel SB, Cohen D, Green I. Interleukin 1 a potential regulator of fibroblast proliferation. J Immunol 1982; 128:2177-2182.
17. Quesada-Pascual F, Rojas-Espinosa O, Santos-Argumedo L, Estrada-Parra S. A Mexican armadillo (*Dasypus novemcinctus*) colony for leprosy research. Int J Lepr Other Mycobact Dis 1987; 55:716-718.
18. Guerra-Infante F, Quesada-Pascual F, Estrada-Parra S, Santos-Argumedo L. Evolution of lymphocyte populations in armadillos (*Dasypus novemcinctus*) inoculated with *M. leprae*. Int J Lepr Other Mycobact Dis 1996; 64:152-158.