



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DEL GEN DEL
RECEPTOR DELTA DE LINFOCITOS T DE**

Dasypus novemcinctus

TESIS

**QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA Y
BIOTECNOLOGIA MOLECULAR**

PRESENTA

M. en C. MARCOS RAMSES ESCOBEDO GUERRA

DIRECTORES DE TESIS:

DR. FERNANDO M. GUERRA INFANTE

DR. MIGUEL ANGEL ANTONIO IBAÑEZ HERNÁNDEZ

México, D. F. 2010



El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Bioinmunología Celular del Departamento de Infectología e Inmunología Perinatal del Instituto Nacional de Perinatología bajo la dirección del Dr. Fernando Martín Guerra Infante y del Dr. Miguel Angel Antonio Ibáñez Hernández.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	Pagina
ÍNDICE GENERAL	i
ABREVIACIONES	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1.1 <i>Dasyus novemcinctus</i>	1
1.1.2 <i>Características inmunológicas de Dasyus novemcinctus</i>	2
1.1.3 <i>Descripción general de las células T en humanos y otros mamíferos</i>	4
1.1.4 <i>El receptor de células T</i>	8
1.1.5 <i>Función de las células T$\gamma\delta$</i>	9
1.1.6 <i>Significado del estudio de los TCR$\gamma\delta$ de Dasyus novemcinctus</i>	13
1.2 JUSTIFICACIÓN	15
1.3 HIPÓTESIS	16
1.4 OBJETIVOS	17
2. MATERIALES Y MÉTODOS	18
2.1 <i>Diseño de los oligonucleótidos</i>	18
2.2 <i>Extracción del DNA genómico</i>	19
2.3 <i>Obtención de los productos de amplificación del gen dtrdv2</i>	19
2.4 <i>Purificación de los productos de amplificación del gen dtrdv2</i>	20
2.5 <i>Secuenciación del producto de amplificación del gen dtrdv2</i>	21
2.6 <i>Clonación en el vector pF1K T7 Flexi®</i>	22
2.7 <i>Transformación de las células JM109 de Escherichia coli</i>	24
2.8 <i>Recuperación de las clonas</i>	24
2.9 <i>Purificación del plásmido</i>	24
2.10 <i>Análisis de las transformantes</i>	24
2.11 <i>Calculo del peso molecular del producto de expresión del ligando dtrdv2</i>	25
2.12 <i>Expresión del producto de PCR y purificación de la proteína recombinante dTRDV2</i>	25
2.13 <i>Concentración de la proteína dTRDV2</i>	26
2.14 <i>Inmunización y análisis de proliferación</i>	26
2.15 <i>Análisis de la antigenicidad de la proteína dTRDV2</i>	27
2.16 <i>Obtención de sangre periférica de armadillo y purificación de células mononucleares</i>	28
2.17 <i>Detección de linfocitos T$\gamma\delta$ de Dasyus novemcinctus por inmunofluorescencia</i>	28
2.18 <i>Detección de linfocitos T$\gamma\delta$ de Dasyus novemcinctus por citometría de flujo</i>	29
3. RESULTADOS	30
3.1 <i>Diseño y especificidad de los iniciadores</i>	30
3.2 <i>Amplificación del gen dtrdv2 a partir de DNA de Dasyus novemcinctus</i>	30
3.3 <i>Purificación del producto dtrdv2 de Dasyus novemcinctus obtenido por PCR</i>	31

CONTENIDO	Pagina
3.4 <i>Secuenciación del gen dtrdv2 de Dasyus novemcinctus</i>	32
3.5 <i>Clonación de dtrdv2 en el vector de expresión pF1K T7 Flexi®</i>	34
3.6 <i>Análisis de las clonas de Escherichia coli JM109 transformantes</i>	35
3.7 <i>Análisis de la expresión de la proteína dTRDV2</i>	36
3.8 <i>Análisis de la antigenicidad de la proteína recombinante dTRDV2</i>	37
3.9 <i>Detección de linfocitos de armadillo con el TCRδ</i>	38
4. DISCUSIÓN	42
5. CONCLUSIONES	52
6. REFERENCIAS	53
7. PERSPECTIVAS	60
8. APÉNDICE A	61
8.1 <i>Reporte de la secuencia nucleotídica del receptor trdv2 humano (hdv102s1)</i>	61
8.2 <i>Reporte de la secuencia nucleotídica del receptor trdv2 humano</i>	63
8.3 <i>Resultados de la alineación de la secuencia dtrdv2</i>	64
8.4 <i>Resultados del programa Flexi® Vector Primer Design Tool para el desarrollo de los iniciadores trdv2-f y trdv2-r.</i>	65
9. APÉNDICE B	66
9.1 <i>Medios de cultivo</i>	66
9.2 <i>Soluciones y reactivos</i>	66
9.3 <i>Productos biológicos</i>	67
10. APENDICE C	69
10.1 <i>Preparación de geles de poliacrilamida</i>	69

ABREVIACIONES

ABREVIACIÓN	SIGNIFICADO
APC	Célula presentadora de antígeno
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
DMAPP	Dimetil-alil-pirofosfato
<i>dtrdv2</i>	Gen del receptor delta variable 2 de células T de armadillo
<i>dTRDV2</i>	Proteína del receptor delta variable 2 de células T de armadillo
EMBL-EBI	European Molecular Biology Laboratory- European Bioinformatics Institute
GPP	Geranil-pirofosfato
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HLA	Antígeno de histocompatibilidad
HSP	Proteína de choque térmico
HSV	Virus herpes simples
i-IEL	Linfocito intraepitelial
IIP	Isopentil-pirofosfato
IP	Intraperitoneal
ITAM	Receptor dependiente de tirosina
LIE	Compartimiento linfocítico de lamina propia
LLP	Compartimiento linfocítico intraepitelial
MAFFT	Multiple Alignment using Fast Fourier Transform
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad, tipo I (MHC-I) y tipo II (MHC-II)
MTT	Bromuro de 3,(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PHA	Fitohemaglutinina
sIgM+	Linfocitos con IgM en superficie celular
TCR	Receptor de células T
TCRAD	Locus del receptor de células T
TCR- $\gamma\delta$	Locus del receptor de células T
<i>trdv2</i>	Gen del receptor delta variable 2 de humano
TRDV2	Proteína del receptor delta variable 2 de humano
VIM	Vía intramuscular
β 2m	Beta 2 microglobulinas

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PAGINA
1	Modelo tridimensional del complejo TCR:MHC/péptido	7
2	Localización cromosómica del gen <i>trdv2</i> humano (<i>hdv102s1</i>).	8
3	Estrategia de ligación del plásmido de expresión <i>pF1K T7 Flexi</i> ®	19
4	Estrategia de ligación del vector <i>pF1K T7 Flexi</i> ®	23
5	Diagrama del alineación de los iniciadores <i>trdv2-f</i> <i>ytrdv2-r</i> para la amplificación del gen <i>dtrdv2</i> de humano	30
6	Integridad del DNA genómico de <i>Dasypus novemcinctus</i>	31
7	Amplificación del gen <i>dtrdv2</i> de <i>Dasypus novemcinctus</i>	32
8	Purificación del producto de PCR del gen <i>dtrdv2</i> de <i>Dasypus novemcinctus</i>	32
9	Secuencias nucleotídicas obtenidas de la secuenciación del producto de PCR del gen <i>dtrdv2</i> de <i>Dasypus novemcinctus</i> .	33
10	Alineación de las secuencias nucleotídicas del gen <i>dtrdv2</i> utilizando la matriz Blosum62 del programa <i>MultAlin</i>	33
11	Alineación de las secuencias aminoacídicas de TRDV2 utilizando la matriz Blosum 62 del programa <i>Multalin</i> .	34
12	Cultivo de las clonas positivas al gen <i>dtrdv2</i> con resistencia a la Kanamicina	35
13	Integridad del DNA plasmídico extraído de las clonas de <i>Escherichia coli JM109</i> en gel de agarosa al 0.8%.	36
14	Amplificación de los insertos de <i>dtrdv2</i> de los plásmidos de las clonas de <i>Escherichia coli JM109</i> .	36

FIGURA	TÍTULO	PAGINA
15	Expresión de la proteína TRDV2 recombinante	37
16	Ensayo de la proliferación de linfocitos de ratón a la proteína recombinante <i>d</i> TRDV2	38
17	Linfocitos de sangre periférica de <i>Dasyus novemcinctus</i> que fueron reconocidos por los anticuerpos de ratón anti-TCR δ (A, B, C y D).	39
18	Observación microscópica de los linfocitos de armadillo con el receptor delta. E) Campo claro y F) Fluorescencia.	39
19	Linfocitos de armadillo con suero de ratones inoculados con solución salina(G) y linfocitos con anti-inmunoglobulinas totales de ratón fluoresceínados (H).	40
20	Cuantificación de linfocitos con el suero anti- <i>d</i> TRDV2.	40
21	Cuantificación de linfocitos con anticuerpos monoclonales anti-TCR $\gamma\delta$ de humano.	41
22	Construcciones filogenéticas para el gen <i>trdv2</i> de diferentes especies animales	45
23	Modelos tridimensionales de la proteína <i>d</i> TRDV2 y 1hxm.	46
24	Modelos tridimensionales de la proteína <i>d</i> TRDV2 y 1hxm incluidos en el modelo completo del receptor T $\gamma\delta$.	47
25	Representación de Ramachandran generada por el programa Swiss-PdbViewer.	48

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	TÍTULO	PAGINA
1	Características generales de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación	18
2	Protocolo original para la amplificación del gen <i>dtrdv2</i> de <i>Dasybus novemcinctus</i>	20
3	Protocolo para la reacción de secuenciación del gen <i>dtrdv2</i> de <i>Dasybus novemcinctus</i>	21
4	Condiciones para la reacción de secuenciación del gen <i>dtrdv2</i> de <i>Dasybus novemcinctus</i>	21
5	Protocolo para la reacción de digestión del amplicón del gen <i>dtrdv2</i> de <i>Dasybus novemcinctus</i>	22
6	Protocolo para la reacción de digestión del vector <i>pFIK T7 Flexi</i> ®	22
7	Protocolo para la reacción de ligación del producto de PCR al vector <i>pFIK T7 Flexi</i> ®	23
8	Protocolo de inmunización	27
9	Protocolo estandarizado para la amplificación del gen <i>dtrdv2</i> de <i>Dasybus novemcinctus</i>	31
10	Resultados del análisis de las células transformantes	35
11	Probables regiones antigenicas para las proteínas δ TRDV2 y TRDV2 obtenidas mediante el método descrito por Kolaskar y Tongaonkar.	50

RESUMEN

Durante los años 1970s, el armadillo se consideró como el modelo experimental más adecuado para el estudio de la lepra. Sin embargo, su respuesta inmunológica es poco conocida y hoy en día aun no se ha podido identificar y cuantificar a los linfocitos T. Los linfocitos T con receptor $\gamma\delta$, son considerados más antiguos, desde el punto de vista evolutivo, que los linfocitos T con el receptor $\alpha\beta$. Este trabajo tuvo como objetivo la obtención de anticuerpos capaces de reconocer la cadena delta del receptor de linfocitos T del armadillo que se encuentra codificada por el gen *dtrdv2*. Se obtuvo una proteína recombinante de armadillo la cual es homóloga a la región variable delta 2 de los linfocitos humanos. La región fue amplificada por PCR y se insertó en el vector de clonación pF1K T7 Flexi®. Se obtuvo un amplicón de 319 pb. Las secuencias nucleótídicas y aminoacídicas presentaron un valor de homología del 87% y 56% respectivamente, en comparación con el *trdv2* humano. La proteína recombinante tiene un peso molecular de 12 kDa. Esta fue mezclada con adyuvante completo de Freud y se inoculó por vía intraperitoneal en ratones BALB/c. El suero de los ratones se utilizó para cuantificar los linfocitos T de la sangre periférica de armadillo con el receptor delta por inmunofluorescencia y citometría de flujo. El suero de los ratones reconoció del 30 al 35% de los linfocitos en sangre periférica de *Dasyus novemcinctus* y sólo el 1% de los linfocitos humanos. En conclusión, la sangre periférica del armadillo revela una subpoblación de linfocitos con una cadena delta similar al TCR $\gamma\delta$ humano, lo que probablemente se trate de la población de células T $\gamma\delta$ del armadillo.

ABSTRACT

During the 70s, the armadillo was considered to be the most suitable experimental model to study leprosy. However, its immunological response is scarcely known and T lymphocytes have not been identified and quantified yet in this animal. T lymphocytes with receptor $\gamma\delta$ are considered to be more ancient, from the evolutionary point of view, than T lymphocytes with receptor $\alpha\beta$. This research was aimed at obtaining antibodies able to recognize the delta chain of the receptor $\gamma\delta$ of T lymphocytes from the armadillo encoded by gene *dtrdv2*. A recombinant protein was obtained from an armadillo DNA sequence that is homologous to the variable region of gene *trdv2* that encodes the receptor T $\gamma\delta$ of human lymphocytes. The region was amplified through PCR and inserted in the clonation vector *pFIK T7 Flexi*®. The obtained protein was mixed with complete Freud's adjuvant and inoculated intraperitoneally into BALB/c mice. The serum from the mice was used to quantify T lymphocytes from the peripheral blood of armadillo with the delta receptor by flow cytometry. We obtained a 319 bp amplicon. The nucleotide and aminoacidic sequences present a homology value of 87% and 56% respectively with the gene *trdv2* of human. The recombinant protein has a 12 kDa molecular weight. The mice serum recognized 30 to 35% of the lymphocytes from peripheral blood of *Dasypus novemcinctus* and only 1% of the human lymphocytes. In conclusion, peripheral blood of the armadillo reveals a subpopulation of lymphocytes with a δ chain that is homologous to the TCR $\gamma\delta$ of human; this cell population corresponds probably to T $\gamma\delta$ lymphocytes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1.1 *Dasyus novemcinctus*

Kirchheimer y Storrs ⁽³⁹⁾ en 1971 informaron que el armadillo de nueve bandas (*Dasyus novemcinctus*) es susceptible de ser infectado experimentalmente con *Mycobacterium leprae*, agente causal de la lepra humana. Este hallazgo fue de enorme importancia ya que por primera vez se contaba con la posibilidad de estudiar aspectos de la bacteria y de su relación huésped-parásito que antes no podían analizarse por la falta de un modelo de experimentación ⁽³⁹⁾.

Los armadillos son mamíferos de la subclase *Eutheria*, superorden *Edentata*, orden *Xenartha* y familia *Dasypodidae*. En esta familia quedan incluidas las 20 especies de armadillos conocidas, distribuidas en nueve géneros; tres especies en el género *Chaetophractus*, una en *Euphractus*, una en *Zaedyus*, una en *Priodontes*, cuatro en *Cabassous*, dos en *Tolypeutes*, seis en *Dasyus*, una en *Chlamyphorus* y una en *Burmeisteria* ⁽⁶⁵⁾.

Los armadillos adultos, en específico de *Dasyus novemcinctus*, son animales pequeños que miden de 70 a 90 cm. de longitud, incluida la cola. Llegan a pesar hasta 6 Kg., su característica más notable es la presencia de un sólido caparazón articulado que cubre la parte superior del cuerpo, el cual está formado por numerosas placas o escudetes óseos, recubiertas por una epidermis queratinosa. Su coloración es café oscuro, negruzca a veces con zonas laterales más claras de color sepia amarillento. El caparazón está dividido en tres zonas: la postcervical o anterior, que cubre la cabeza y hombros, ambas separadas por un pliegue de la piel; la central, que consiste en nueve bandas móviles interconectadas por pliegues, y la pélvica o posterior, que abarca tanto la pelvis como la cola. Las placas óseas de las dos zonas distales son poligonales y en las centrales son típicamente rectangulares. En este último caso, cada placa tiene dos regiones: la anterior es plana, lisa, cubierta por la banda previa a la misma o por la concha post-cervical en el caso de la primera banda; y la novena se sobrepone a la región posterior ⁽⁵⁹⁾.

Fisiológicamente se ha observado que el armadillo posee los mismos patrones electroforéticos y niveles de cada una de las fracciones de proteínas séricas que el humano ⁽⁴³⁾. La hemoglobina del armadillo tiene el mismo comportamiento electroforético que la hemoglobina A humana, cuando se usa electroforesis a pH de 8.9. Las células sanguíneas en el armadillo tienen características peculiares. Los eritrocitos miden 6.2 μm de diámetro y su número es de 7.36 millones/ mm^3 . El tiempo de sobrevivencia máximo *in vivo* es de 70 a 75 días. Este valor indica que hay

una eritropoyesis desproporcionadamente alta con respecto al metabolismo basal de los armadillos, comparada con el de otros mamíferos ⁽⁴³⁾.

Los leucocitos tienen una morfología típica y son fáciles de identificar en extensiones de sangre teñidas, donde se puede observar un diferencial de 33% de neutrófilos, 4% de eosinófilos, 0.7% de basófilos, 0.7% de monocitos y 52% de linfocitos en un total de 8.84×10^3 células/mm³ ⁽⁵⁷⁾. Una característica notable es la eosinofilia que parece que se debe a las parasitosis que estos animales sufren.

1.1.2 Características inmunológicas de Dasypus novemcinctus

Los armadillos tienen órganos linfoides bien desarrollados no muy diferentes de los del resto de los mamíferos. El timo involuciona con la edad, de modo que a los 18 meses sólo queda un 60% y a los 4 años la reducción llega a un 20% del original; el tejido tímico es reemplazado por tejido adiposo y en la periferia se puede observar un aumento notable de células cebadas. No hay alteraciones en la abundancia, y distribución de linfocitos en las áreas timo-dependientes de los ganglios linfáticos, placas de Peyer, amígdalas y bazo ⁽⁵⁾. Las únicas células atípicas observadas en los órganos linfoides son algunos histiocitos con gránulos que se tiñen de color azul con colorante Giemsa y que también han sido identificados en pacientes humanos con algunas alteraciones metabólicas.

Como se mencionó anteriormente, los linfocitos constituyen la población más abundante de leucocitos en los armadillos. Sin embargo, hay pocos estudios sobre la proporción y las características de las subpoblaciones de linfocitos. En 1978, Amezcua y colaboradores ⁽²⁾, trataron de identificar a los linfocitos T mediante la formación de rosetas espontáneas con el uso de eritrocitos de carnero, las cifras que se encontraron no dieron valores por arriba del 49% como sucede para las células T de humano utilizado el mismo método. Otros experimentos posteriores, fue la detección de linfocitos con receptor C3b mediante la formación de las rosetas EAC que identifica a los linfocitos B, dando cifras de 2 y 8% ⁽²⁾. Así mismo, Santos-Argumedo y col. ⁽⁶³⁾ en 1995 determinaron que el 17% de los linfocitos de sangre periférica de *D. novemcinctus* eran sIgM+, para lo cual se utilizaron anticuerpos de conejo anti-IgM, de armadillo, conjugados a FITC y peroxidasa; además se cuantificó a los linfocitos con la capacidad de formar rosetones con los eritrocitos de oveja; el promedio para este marcador fue del 10% ⁽⁶³⁾.

Estudios posteriores se enfocaron en la descripción de las poblaciones de linfocitos en el armadillo. Santos-Argumedo y Guerra-Infante ⁽⁶²⁾ en 1996 lograron identificar a las subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica de *D. novemcinctus* mediante el empleo de doce lectinas marcadas con FITC. Los resultados mostraron que 5 lectinas (ConA, LcH, RCA, WGA y UEA) reaccionaron con casi el 100% de los linfocitos y 7 más (PNA, DBA, SBA, PCA, PHA-L, PWM y VVA) reconocieron porcentajes variables de este tipo celular (< 100%). Los datos generados implicaban que este último grupo de lectinas puede ser útil en la identificación de las subpoblaciones de los linfocitos y se podría correlacionar con las etapas de su diferenciación celular. Además, estas células mononucleares de armadillo presentaron diferentes grados de estimulación antigénica al utilizar las lectinas ConA, PHA-L, PWM, DBA y SBA como mitógenos; lo que nos indicaría que se puede llevar a cabo una identificación selectiva de linfocitos y así poder evaluar la respuesta inmune de armadillos y la evolución de las etapas de la lepra lepromatosa ⁽⁶²⁾.

Recientemente se demostró la presencia de varias citocinas en sobrenadantes de cultivos de células mononucleares de *D. novemcinctus* y también por medio de la búsqueda de secuencias homologas a los genes de las citocinas humanas ya fuese por amplificación del gen o por medio de la detección de RNAm. Guerra-Infante y col. ⁽²⁷⁾ demostraron la presencia de una molécula con actividad semejante a factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en el sobrenadante de un cultivo de leucocitos de *D. novemcinctus*. Así mismo Van Dyjk y col. ⁽⁷⁰⁾ llevaron a cabo la clonación y secuenciación de un fragmento del gen del TNF en otra especie de armadillo (*Cabassous unicinctus*) que presentó una homología del 88% con respecto a su contraparte humana.

Consecuentemente, Flores-Medina y Guerra-Infante ⁽²¹⁾ lograron llevar a cabo la amplificación e identificación del RNAm de la IL-1 a partir de leucocitos de armadillo estimulados con acetato de forbol miristato (PMA), la secuencia obtenida mostró un 99% de homología con las secuencias reportadas para la IL-1 α humana ⁽²¹⁾. Estudios similares se han desarrollado en el caso de la IL-2, en donde Peña y col. ⁽⁵⁵⁾ han logrado obtener la molécula recombinante de esta citocina. La similitud de las citocinas que se han encontrado en *D. novemcinctus* y las de humano podrían en un futuro explicar el desarrollo de la respuesta inmune con el huésped se encuentra infectada con la micobacteria.

Los esfuerzos para determinar la patogénesis y la participación del sistema inmune en la enfermedad de Hansen han sido escasos e infructuosos debido a la imposibilidad de realizar cultivos de la micobacteria. Actualmente el armadillo de nueve bandas es considerado como el único modelo

animal para el estudio de la Lepra, sin embargo su respuesta inmunológica es poco conocida. Por ejemplo, no se ha logrado identificar y cuantificar a los linfocitos T de sangre periférica. En 1997 se reportó que del 5 al 27% de los linfocitos circundantes fueron reconocidos por anticuerpos monoclonales anti-TCR $\gamma\delta$ humano ⁽⁴¹⁾, así mismo, se inquirió el reconocimiento de esta estirpe en intestino del 14 al 26.9%, en bazo del 8.9 al 29.7%, en médula ósea del 3.9 al 10.1% y en nódulo linfoide del 2.5 al 8.7; sugiriendo estos resultados de que se trate de células T $\gamma\delta$ tal y como sucede con especies de rumiantes y suinos, que presentan estos linfocitos en un 75 y en un 50% en sangre respectivamente ^(26, 33). A pesar de lo anterior no sea logrado identificar y cuantificar a los linfocitos T de armadillo, por lo que es necesario identificar esta población para realizar estudios de relación huésped-parásito entre el armadillo y *M. leprae*.

1.1.3 Descripción general de las células T en humanos y otros mamíferos.

El humano adulto sano contiene cerca de 10^{12} linfocitos ⁽⁴²⁾. El linfocito es una célula pequeña de forma redondeada que contiene un núcleo esférico, con cromatina nuclear densamente compacta y escaso citoplasma que apenas es detectable. Pueden distinguirse varios tipos de linfocitos con base en sus propiedades funcionales y a las proteínas específicas que expresan en su superficie o secretan al ambiente. Las dos líneas principales conocidas son células T (derivadas del timo) y células B (derivadas de la médula ósea). Las proporciones relativas de células T y B varían según el tejido; en sangre periférica representan cerca del 75 y 10% de los linfocitos, respectivamente. El 15% restante pertenece a una línea celular conocida como células Natural Killer (NK) ^(7,46).

El linaje de células T y B se origina de células progenitoras hematopoyéticas en la médula ósea o en el hígado fetal ⁽⁴⁶⁾. Son descendientes de un progenitor denominado célula progenitora linfoide que actúa como precursor común de las células T, B, NK y dendríticas ⁽⁷⁾. El desarrollo del linfocito B humano se realiza en su totalidad dentro de la médula ósea. Las células T se desarrollan a partir de precursores inmaduros que abandonan la médula ósea y se desplazan hasta el timo vía sanguínea, donde proliferan y diferencian en linfocitos T maduros con ayuda de citocinas IL-7, IL-2, factor de célula progenitora (SCF) otros factores tímicos ⁽⁶⁾.

Los linfocitos T no expresan inmunoglobulinas, pero tienen la capacidad de detectar la presencia de sustancias extrañas por medio de su receptor (TCR de las siglas en inglés T Cell Receptor). Las especies de mamíferos que han sido estudiadas hasta su momento han presentado dos tipos distintos de linfocitos T, de acuerdo al tipo de expresión heterodimérica de TCR, como

células T con receptor $\alpha\beta$ o con receptor $\gamma\delta$ ⁽³²⁾. Estos linajes comparten características comunes como la asociación con moléculas CD3, con moléculas del MHC-I y algunas β 2-microglobulinas (β 2m), receptores que están involucrados durante la presentación del antígeno a las diferentes tipos de células T ^(22,51). Sin embargo, difieren de manera significativa en su distribución anatómica, ontogenia y en su papel inmunológico.

El TCR es una proteína ubicada en la membrana de los linfocitos T que cumplen la función de un potente transductor de señales intracelular como respuesta a estímulos del sistema inmunológico, tanto innato como adquirido ⁽³²⁾. El TCR se encuentra asociado a la membrana celular, la cual atraviesa exponiendo dominios extra e intracelulares. Las dos cadenas del receptor tienen una morfología similar al de las inmunoglobulinas, conteniendo en su extremo apical una zona de hipervariabilidad que corresponde al lugar de interacción antigénica ⁽³²⁾.

Los TCR están relacionados con las inmunoglobulinas desde el punto de vista evolutivo; comparten con ellas varias propiedades estructurales y funcionales, incluso la capacidad para detectar pequeños ligandos moleculares específicos llamados antígenos ⁽³⁸⁾. Sin embargo, a diferencia de las inmunoglobulinas, las proteínas del receptor de célula T nunca se secretan y, como resultado, las células T carecen de la propiedad de atacar sus blancos a grandes distancias. En vez de esto, ejercen sus efectos protectores por medio de contacto directo con el blanco o al influir en la actividad de otras células inmunitarias. Junto con los macrófagos, las células T son el principal tipo celular participante en la respuesta inmune de tipo celular ^(1,6).

Los linfocitos T, funcionales y maduros, expresan diferentes proteínas de superficie, además de los TCR. Una de estas proteínas de superficie es el caso del complejo CD3 compuesto por 5 polipéptidos de características transmembranales. Esta proteína CD3 se une de manera no covalente con los TCR y actúa en la transducción de señales de los receptores hacia el interior celular. Este complejo está conformado por tres unidades denominadas γ , δ y ϵ ; de las cuales CD3 γ y CD3 δ son glicoproteínas, mientras que CD3 ϵ es una proteína no glicosilada. Tiene además una porción intracelular $\zeta\zeta$ que es la responsable de transmitir las señales resultantes de la unión TCR:MHC-antígeno ⁽²³⁾.

En particular, los linfocitos T reconocen a una proteína extraña solo si esta es procesada en péptidos pequeños, que posteriormente se muestran sobre la superficie de una segunda célula, conocida como célula presentadora de antígeno (APC por sus siglas en inglés). Prácticamente todos

los tipos de células pueden presentar antígenos en determinadas situaciones, pero existen algunos tipos celulares que se encuentran adaptados para este propósito y que además tienen la particularidad de controlar la actividad de las células T. Este grupo incluye a macrófagos, linfocitos B y una familia de células derivadas de la médula ósea conocidas como células dendríticas ^(26,32).

La presentación del antígeno depende, de proteínas específicas llamadas proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) expresadas en la superficie de las células APC. Los péptidos extraños se unen de manera covalente a las proteínas del MHC para mostrarse, y esta combinación de péptido y proteína del MHC es lo que permite que el TCR del linfocito pueda reconocer al péptido extraño. La respuesta inmune está fundamentada en el reconocimiento de antígenos de origen endógeno o exógeno. Las células T cumplen esa función de reconocimiento antigénico por medio de los TCR. Comúnmente los antígenos presentados por células APC mediante la molécula MHC-II son reconocidos por las células $\alpha\beta$ (95% de la población en sangre periférica), la población restante corresponde a linfocitos con TCR $\gamma\delta$. Por el contrario, el número y proporción de células T $\gamma\delta$ se ve aumentada en los tejidos epiteliales ⁽²⁴⁾. Así mismo, se ha encontrado que las células T $\gamma\delta$ son el primer linaje generado durante el desarrollo de los organismos, presentándose en algunas especies desde el estado fetal. Los factores genéticos y ambientales influyen en la producción y/o selección de poblaciones $\gamma\delta$ que expresan receptores de antígeno codificados por segmentos de genes específicos ⁽⁶⁹⁾.

El complejo TCR:CD3 (Figura 1) permite la interacción de las células T con células APC y son responsables de gran parte de la comunicación intracelular mediada por el TCR ⁽³⁰⁾. La unión del complejo MHC-péptido es transducida al interior de la célula por medio de una señal transmitida del CD3 y amplificada por co-receptores denominadas CD4 y CD8 próximos al TCR y reconocedoras del MHC ^(23,49). Así mismo, interactúan tirocinasas (Src, Syk y Tec), las cuales participan en la transmisión de la señal, debido a su asociación con la cadena ζ de CD3 y con el co-receptor CD4 y CD8 ^(49,52). La porción intracelular de la cadena ζ está complementada por tres zonas fosforilables denominadas ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*). La fosforilación de estas zonas ITAM propaga la señal intracelular proviene del TCR ⁽⁵²⁾.

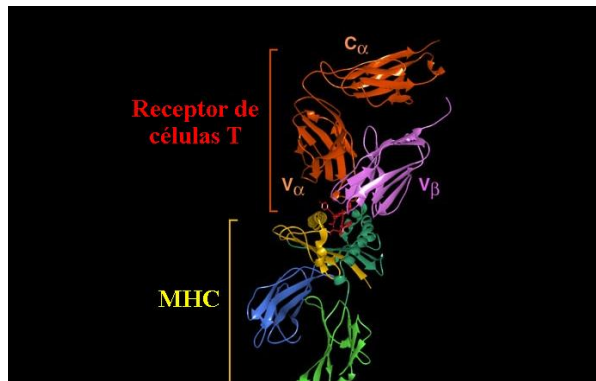


Figura 1. Modelo tridimensional del complejo TCR:MHC/péptido

Casi todos los linfocitos maduros que se encuentran en la sangre periférica y en órganos linfoides secundarios son CD2+CD3+ (marcadores de línea celular), es decir, cada uno expresa CD2 y CD3 en su superficie, no obstante, la clase de linfocitos T CD2+CD3+, esta constituida de subpoblaciones que tienen funciones inmunitarias muy diversas y que expresan sus propios marcadores de superficie ⁽²⁸⁾. Estas subpoblaciones se pueden distinguir por dos proteínas de superficie adicionales conocidas como CD4 y CD8. Los linfocitos T maduros y funcionales casi siempre expresan solo una de estas proteínas, y que se encuentra relacionado con diferencias importantes en la función celular. La mayor parte de los linfocitos T CD8+ tienen actividad citotóxica, es decir, la propiedad de matar células que tengan moléculas extrañas en sus superficies. Los linfocitos T citotóxicos (células Tc) son de extrema importancia en la defensa contra de infecciones de tipo viral o cuando ocurre una transformación celular como en el caso de las neoplasias ⁽²⁹⁾.

En contraste, las células con marcador CD4 actúan como: células T cooperadoras (células Th), promotoras de la proliferación, maduración y función inmunitaria de otros tipos celulares; fenómeno que podemos observar en el control de las actividades de las células B y de las células Tc. En conjunto, aproximadamente 70% de las células T en sangre humana o en tejidos linfoides secundarios es CD4+CD8- (o simplemente células CD4), mientras que 25% es CD4-CD8+ (o solo células CD8). Las células con cualquiera de estos fenotipos se les denomina linfocitos simples positivos y son las células que más a menudo participan en las respuestas inmunitarias. Cerca del 4% de las células T fuera del timo son CD4-CD8-, linfocitos dobles negativos; casi todos éstos se expresan en un tipo alternativo de receptor llamado $\gamma\delta$. El uno por ciento restante de células T extra-tímicas son células dobles positivas CD4+CD8+, cuya función aún se desconoce ^(23,29,51).

llegan a madurar en el timo postnatal, emplean varios segmentos $V\gamma$ y por consecuencia diversos TCR.

Los factores genéticos y ambientales influyen en la generación y/o selección de las poblaciones $\gamma\delta$ en los organismos adultos ^(15,34), que tienen la particularidad de expresar regiones de reconocimiento antigénico que son codificados por una diversidad de genes incluidos en el cromosoma 14 (14q11.2) ^(46,71).

Los repertorios de células $T\gamma\delta$ de ratón y humano están caracterizados por células que expresan receptores que son codificados por un segmento único $V\gamma$ y $V\delta$ ⁽³⁾. Al contrario de las células $\alpha\beta$ el repertorio de las células $\gamma\delta$ es muy limitado con 6 genes para $V\gamma$ (1,3,4,5,8 y 9) y 3 genes para $V\delta$ (1,2 y 3) que se expresan funcionalmente ^(3,73). Sin embargo, el potencial de diversidad de los receptores generados por las células $\gamma\delta$ es mayor que el de las células T $\alpha\beta$ debido a los mecanismos de recombinación en las cadenas V(D)J, así como la inserción o delección de nucleótidos. Este mecanismo envuelve la yuxtaposición de segmentos V, J y D (este último solamente en el caso TCR β y TCR δ) ^(44,53,77). Teóricamente un segmento V puede recombinarse en posición *cis* con un segmento D y/o J lo que permitiría un gran número de combinaciones potenciales. Estas combinaciones son altamente heterogéneas, debido a que algunos de los nucleótidos pueden ser adicionados o eliminados durante la recombinación, generando por lo tanto una diversidad que no se encuentra genómicamente codificada ⁽³⁸⁾. Cada cadena de TCR posee su propio segmento D (solamente cadenas beta o delta), un segmento J y una región constante ⁽³⁸⁾. Por otro lado, tanto las cadenas α y β están codificadas en un mismo locus (TCRAD) empleando un juego simple de segmentos V (ADV/DV) ^(4,17). Para ratones BALB/c el locus TCRAD comprende aproximadamente unos 100 segmentos agrupados en 25 familias de acuerdo a su homología nucleotídica (aproximadamente un 75%) ⁽⁴⁾.

1.1.5 Función de las células $T\gamma\delta$

Las funciones que desempeñan las células $T\gamma\delta$ no se ha vislumbrado en su totalidad, pero algunos estudios las relacionan con actividad inmunoreguladora la cual es complementaria a las que ejercen las células $T\alpha\beta$ durante las etapas temprana y tardía de una respuesta inmune inducida. La expresión diferencial de los co-receptores del TCR $\gamma\delta$ por los linfocitos restringe y regula las funciones efectoras de las células $T\alpha\beta$ ⁽⁸⁾.

En estos días se conoce muy poco sobre como las células T $\gamma\delta$ reconocen a los antígenos, pero reportes han sugerido que son capaces de interactuar con moléculas mitogénicas asociadas o no a estructuras tipo MHC. Los complejos que se forman con los TCR $\gamma\delta$ y las moléculas CD3 se asemejan a las de las inmunoglobulinas, y que difieren de manera significativa con los que se forman con los TCR $\alpha\beta$, lo que sugiere un reconocimiento de los antígenos muy diferente al empleado por las células T $\gamma\delta$ ⁽²³⁾. Así mismo, las células T $\gamma\delta$ no necesitan reconocer a los antígenos en un MHC en particular. Hasta el momento las proteínas sin procesar, compuesto orgánicos con grupos de alquilfosfato y alquilaminas son antígenos que son capaces de inducir y ser reconocidos por las células T $\gamma\delta$ ⁽⁶⁾.

Estas poblaciones celulares se han asociado al compartimiento linfocítico intraepitelial (LIE) y al compartimiento linfocítico de la lámina propia (LLP) ^(10,36). La población de LIE, se encuentra constituida por células situadas por encima de la lámina propia y de la membrana basal. Los LIE son una población morfológicamente distinta, la mayor parte de los LIE son células T CD8 (90% en ratones; y de 50 a 80% en humanos) siendo lo más importante la expresión del receptor T $\gamma\delta$ en vez del TCR $\alpha\beta$ (20 a 80% en ratones; 5 a 10% en humanos) ^(29,36).

Diversos estudios han observado que las células T $\gamma\delta$, ya sea doble negativas o CD8, son componentes principales de las poblaciones celulares en la epidermis y en algunos epitelios de tipo mucoso en donde responden a señales expresadas por queratinocitos dañados, la activación de estas células produce algunas citocinas como el factor de crecimiento de queratinocitos lo que facilita así la cicatrización de la herida ⁽²⁹⁾.

Estudios realizados en ratones timectomizados indican que muchas de estas células del LIE no son de origen tímico sino que se encuentran constituidos por células de la médula ósea que se desarrollaron, se seleccionaron y proliferaron en el epitelio intestinal. El significado fisiológico de este desarrollo extratímico no es claro, pero permitiría asegurar que la especificidad del TCR en el LIE se dirija de manera exclusiva hacia los antígenos encontrados en el ambiente epitelial ⁽⁵¹⁾. Actualmente la función de las células que componen a los LIE no se comprende por completo. La estimulación de estas células compromete una pobre proliferación clonal, pero, contrario a lo anterior, estas células estimuladas producen cantidades abundantes de citocinas. Además, poseen la capacidad de mediar la función citotóxica y esto, junto con el hecho de que son células T CD8, sugiere que actúan *in vivo* como células efectoras citotóxicas ^(29,37,49). Lo anterior aplicaría tanto en

aquellas subpoblaciones celulares que contiene TCR $\alpha\beta$ y/o $\gamma\delta$, y es probable que difieran en la especificidad en el reconocimiento del antígeno.

Una hipótesis es que los LIE responden a un conjunto restringido de proteínas de estrés expresadas por las células epiteliales, o liberadas por éstas, en respuestas a la presencia de microorganismos; esto permitiría la pronta eliminación de las células epiteliales junto con el patógeno ⁽¹⁰⁾. Por tanto, los LIE pueden disminuir la capacidad de los patógenos para colonizar la mucosa mediante su reacción contra el sustrato celular necesario para tal colonización, más que contra los propios microorganismos.

Recientemente se han estudiado a las MHC de clase I y su relación con las cadenas MIC (MICA y MICB), estas moléculas se han relacionado como antígenos de estrés reconocidos por TCR $\gamma\delta$ en intestino ⁽¹⁾. Su expresión al igual que la proteína de choque térmico de 70 kDa (hsp70) se induce cuando las células epiteliales son sometidas a cambios de temperatura. Las características estructurales y funcionales de MICA y MICB permiten el reconocimiento específico de células TCR $\gamma\delta$, particularmente cuando expresan la región variable delta 1 (V δ 1); la mayoría son CD8 negativas y se encuentran en intestino, además se relacionan primordialmente con antígenos de péptidos externos y no péptidicos ⁽¹⁾. Debido a que MICA y MICB son reconocidos por células T con TCR $\gamma\delta$ V δ 1, se sugiere que formen parte del sistema de vigilancia inmune que se dedica a la detección del daño, infección u otras afecciones en células intestinales.

En modelos murinos se ha observado que algunas de las células T $\gamma\delta$ tienen la capacidad de reconocer proteínas no asociadas a MHC. Esto se demostró cuando en algunos estudios los hibridomas de ratón se expusieron a moléculas como la glicoproteína gI del virus herpes simplex (HSV-I) y con algunas proteínas de choque térmico (HSP) purificadas de extractos proteicos totales y mitocondriales (HSP60) de micobacterias ⁽³¹⁾. En humano, las células T $\gamma\delta$ (V γ 9/V δ 2) son las responsables de activarse de manera específica con las HSP65 de origen micobacteriano ⁽³¹⁾.

Se cree que las células T $\gamma\delta$ ejercen funciones reguladoras y efectoras durante la respuesta a una infección, aunque ha ido difícil definir su real intervención. Estas células tienen la capacidad de ser citotóxicas y por tanto de producir y liberar INF γ , así como otras citocinas inmunoregulatoras, este fenómeno se ha observado cuando el huésped sufre de una infección con algunas bacterias de tipo intracelular como es el caso de micobacterias, *Brucella* y *Listeria*, así como en algunas parasitosis como la Leishmaniasis y la Malaria ^(7,46). La actividad y función de los linfocitos T $\gamma\delta$

durante este tipo de infecciones derivaría en su capacidad de reconocer y proliferar en respuestas a alquilfosfatos y alquilaminas producidas por los patógenos anteriormente mencionados ⁽³⁰⁾.

La función fisiológica de las células T $\gamma\delta$ todavía no se comprende en su totalidad, algunos estudios muestran que estas células podrían jugar un papel importante como la primera línea de defensa del organismo contra un amplio espectro de microorganismos como es el caso de las micobacterias. Además se ha observado que este tipo celular es capaz de promover la lisis de células cancerígenas RPMI 8226 y Daudi ⁽²⁰⁾.

En comparación con las células T $\alpha\beta$, las células T $\gamma\delta$ con el fenotipo V γ 9V δ 2 tiene la capacidad de reconocer componentes no peptídico fosfatados de bajo peso molecular (100-600d) como el isopentenil pirofosfato (IPP) el cual es un ligando natural aislado de micobacterias ^(56,60); además del IPP puede reconocer al dimetil-alil pirofosfato (DMAPP) y al geranil pirofosfato (GPP) de origen oncológico ^(25,68). Así mismo, los linfocitos TCR $\gamma\delta$ exhiben un alta reactividad con nucleótidos fosforilados (TUBag1-4), presentes en micobacterias y en otros patógenos intracelulares como *Plasmodium falciparum* ^(16,18), con azúcares fosforilados ⁽¹⁴⁾ y pirofosfatos sintéticos ⁽⁶⁹⁾.

El reconocimiento de antígenos no peptídicos por parte de las células T $\gamma\delta$ sugieren que intervienen en la vigilancia sobre células infectadas o transformadas ⁽²⁰⁾. Durante el desarrollo de infecciones intracelulares se ve aumentada de manera significativa la población de las células T $\gamma\delta$, dentro de las cuales el fenotipo Vg9d2 es el más importante. Las infecciones por micobacterias, principalmente tuberculosis (TB), son enfermedades ampliamente diseminadas con un estimado de 3 millones de muertes por año ⁽⁶⁵⁾. El incremento en la prevalencia de la TB esta asociada con la infección con HIV y al surgimiento de cepas multi-resistentes de *M. tuberculosis*.

Numerosos estudios sobre los mecanismos de defensa involucrados durante la infección por TB han propuesto que las células T $\gamma\delta$ están involucradas en la respuesta inmune temprana ⁽⁴⁵⁾ además de ejercer un efecto anti-inflamatorio que podría darle protección al huésped ⁽⁵⁸⁾. Recientemente se ha observado que la presencia de proteínas de choque térmico estimulan la proliferación de las células T $\gamma\delta$ ^(30,31).

Diferentes moléculas de superficie parecen estar envueltas en la inducción y modulación de la activación de las células T $\gamma\delta$. Así como también, se ha observado que la IL-10 tiene un efecto inhibitorio sobre las células T $\gamma\delta$ ⁽⁵⁴⁾ fenómeno que puede estar involucrado directamente en la anergia

de los pacientes con infecciones por micobacterias. En rumiantes, los linfocitos $T\gamma\delta$ constituyen el 75% de las células mononucleares en sangre periférica en animales jóvenes⁽⁴⁸⁾ y el 40% en adultos^(47,73). En contraste, solamente el 7 y el 3% de los monocitos expresan el receptor $T\gamma\delta$ en humanos y roedores respectivamente^(13,35). Los linfocitos $T\gamma\delta$ de los rumiantes se han caracterizado por la expresión de una molécula de superficie de 215 kDa denominada WC1, proteína rica en residuos de cisterna con 11 dominios en la región extracelular y que se encuentra asociada a moléculas CD5 y CD6^(50,75). Se ha sugerido que WC1 actúa como un posible ligando para la selectina-E y esto le permitiría ser el mensajero en el reconocimiento específico entre las células $T\gamma\delta$ ^(72,76). Recientemente, se ha propuesto que WC1 participa de manera importante en la regulación de la proliferación de los linfocitos TCR $\gamma\delta$ dependientes de IL-2^(40,67). Las células $T\gamma\delta$ poseen un papel importante en la tuberculosis humana y murina, el gran número de linfocitos TCR $\gamma\delta$ encontrados en rumiantes sugieren que podrían actuar de la misma manera en la tuberculosis bovina. Se ha observado que este tipo de células poseen funciones de citotoxicidad en respuesta a antígenos intracelulares que le permitirían involucrarse en la defensa contra *M. bovis*⁽⁴⁷⁾.

En trabajos realizados de nuestro grupo de investigación se han empleado anticuerpos anti TCR $\gamma\delta$ (Pharmigen y Coulther) sin tener éxito en la cuantificación de estos linfocitos en el armadillo lo que sugiere que estos anticuerpos reconocen diferentes epítopes⁽²⁸⁾. Una posible estrategia para identificar y cuantificar la población $T\gamma\delta$ sería tener anticuerpos contra la proteína recombinante del TCR $\gamma\delta$ de linfocitos de armadillo.

1.1.6 Significado del estudio de los TCR $\gamma\delta$ de *Dasypus novemcinctus*

Como se conoce *M. leprae*, es el agente etiológico de la lepra en el hombre, causa una enfermedad granulomatosa crónica que afecta primariamente la piel y los nervios periféricos, y secundariamente algunos órganos internos como los testículos y los ojos; las vísceras raramente son afectadas. Dependiendo de la resistencia del huésped, la lepra puede presentarse como una enfermedad benigna (lepra tuberculoide) o como una enfermedad maligna (lepra lepromatosa), pero también puede presentar en un espectro de formas intermedias. La inmunidad antileprosa depende de la inmunidad mediada por células del huésped y ésta se encuentra severamente deteriorada en la lepra lepromatosa. Aunque *M. leprae* todavía se mantiene como un microorganismo no cultivable, puede hacerse crecer en varios animales experimentales, incluyendo el armadillo, primates no humanos, y roedores, en cierto grado. Aparte del hombre, la enfermedad adquirida naturalmente se ha encontrado en armadillos silvestres de nueve bandas (*Dasypus*

novemcinctus), en chimpancés (*Pan troglodytes*), en monos mangabey pardos (*Cercocebus atys*) y en macacos (*Macaca fascicularis*). Esto identifica a la lepra como una zoonosis.

Como se sabe, el armadillo *D. novemcinctus* es susceptible a la infección con *M. leprae*, por lo que su comportamiento y características inmunológicas son de suma importancia para el conocimiento de la relación huésped-parásito entre esta micobacteria y el humano. Aunque la respuesta humoral del armadillo y la histopatología han sido documentadas durante la inoculación de *M. leprae*, la caracterización y la participación de las poblaciones de células T en el reconocimiento y presentación de antígenos no se han revelado aún. Con base en lo anterior, en ese trabajo se pretende identificar a células T mediante la obtención de anticuerpos anti proteína recombinante de la región variable 2 de la cadena delta del receptor de linfocitos T (trdv2) de *Dasypus novemcinctus*.

1.2. JUSTIFICACIÓN

Aunque la producción de citocinas tales como: IL-2 e Interferon- γ han sido documentados no se ha caracterizado aún las poblaciones de las células T que producen estas citocinas. Sin embargo, un reporte en la literatura ha sugirió la presencia de linfocitos T de armadillo que reaccionan con un anticuerpo monoclonal contra el receptor $\gamma\delta$ de las células T humanas, lo que sugiere la presencia de linfocitos con este receptor. El TCR- $\gamma\delta$ parece ser un ancestro común en todos los mamíferos por lo que el objetivo de esta investigación fue la identificación de las células T de armadillo con TCR- $\gamma\delta$ mediante la obtención de anticuerpos contra una proteína recombinante obtenida a partir de la inserción de un gen homólogo a la región variable 2 de la cadena delta del receptor de linfocitos T (TRDV2) de humano a un vector de *Escherichia coli*.

1.3 HIPÓTESIS

Afirmativa

Los anticuerpos generados de la inmunización de ratones BALB/c con la proteína recombinante *dTRDV2* serán capaces de reconocer a los linfocitos T $\gamma\delta$ presentes en la sangre periférica de *Dasypus novemcinctus*.

Negativa

Los anticuerpos generados de la inmunización de ratones BALB/c con la proteína recombinante *dTRDV2* no serán capaces de reconocer a los linfocitos T $\gamma\delta$ presentes en la sangre periférica de *Dasypus novemcinctus*.

1.4 OBJETIVOS

Objetivo general

La identificación de células T $\gamma\delta$ de armadillo mediante anticuerpos anti-TCR $\gamma\delta$ obtenidos de la clonación y expresión del gen del receptor delta de linfocitos T de *Dasypus novemcinctus*.

Objetivos particulares

- Amplificación del gen del receptor delta de linfocitos T de *Dasypus novemcinctus* mediante el uso de iniciadores específicos diseñados para el gen Trdv2 humano.
- Analizar la secuencia del gen trdv2 de *D. novemcinctus* mediante el programa *MultAlin* y *ClustalX* comparándola con aquellas secuencias reportadas en NCBI para dicho gen de diferentes especies animales.
- Realizar la clonación del gen trdv2 de armadillo mediante la transformación de células de *Escherichia coli JM109* con la construcción *pF1K T7 Flexi®-trdv2*.
- Identificar las clonas con fenotipo positivo a la resistencia a Kanamicina y la presencia del inserto del gen tdv2 mediante PCR.
- Desarrollar la cinética de expresión de la proteína TRDV2 recombinante (*dTRDV2*); comprobando e identificando su síntesis constitutiva por electroforesis SDS-PAGE.
- Establecer un esquema de inmunización para ratones *BALB/c* con la administración de la proteína recombinante para la obtención de anticuerpos anti-*dTRDV2*.
- Realizar la identificación y cuantificación de linfocitos con el receptor $\gamma\delta$ mediante los anticuerpos obtenidos por inmunofluorescencia indirecta.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El protocolo para la identificación de células T $\gamma\delta$ de armadillo estuvo compuesto por el análisis *in silico* e *in vitro* del gen *dTRDV2* y su proteína. Ambos tipos de estudios se desarrollaron de manera paralela para confirmar los datos y resultados que se generaban al momento.

2.1 Diseño de los oligonucleótidos

Para el diseño de los iniciadores que se requirieron para la amplificación del gen *dtrdv2* de *Dasypus novemcinctus*, se realizó un análisis del gen *hdv102s1* de origen humano. Para este estudio se analizaron las secuencias reportadas para el *hdv102s1*, tanto de la proteína como la secuencia nucleotídica comprendida en 14q11.2; con número de acceso en Genbank AE000661, gi: 2358060 con 247877 pb de longitud (Apéndice A).

El gen *hdv102s1* forma parte del Locus *T-cell receptor alpha delta* (TCR- $\alpha\delta$ o TCRA) ya que se encuentra junto a los genes del receptor alpha de células T. Los iniciadores *trdv2-f* y *trdv2-r* (Tabla 1, apéndice A) se diseñaron para que hibriden en la región comprendida entre 176698 y 176999 pb (secuencia con acceso AE000661.1) del locus TCR- $\alpha\delta$ de humano con la obtención de un producto de amplificación de 319 pb, que resultaría en un péptido de 99 residuos aminoácidos, perteneciente al gen *dtrdv2*, al ser insertado el amplicón al plásmido de expresión tipo Flexi.

Tabla 1. Características generales de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación		
Organismo	Oligonucleótido	Blanco
<i>Dasypus novemcinctus</i>	<i>trdv2-f</i>	Posición 176698 pb
	<i>trdv2-r</i>	Posición 176999 pb

Debido a la estrategia de clonación en el plásmido *pF1K T7 Flexi*[®] (Figura 3), a los iniciadores de sentido 5' a 3' se les incluyeron bases adicionales (TAA-AGC-GAT-CGC-C) en el extremo 5', que poseen el sitio de restricción *SgfI* con el propósito de realizar la ligación al extremo adhesivo 3' del vector. Así mismo, a los iniciadores de sentido 3' a 5' se les incluyeron las bases adicionales GAC-GGT-TTA-AAC en el extremo 3', que posee además del sitio de restricción *PmeI* para la ligación al extremo adhesivo 5' del vector; un codón de valina seguido de uno de terminación, que permite solo la transcripción de la secuencia requerida.

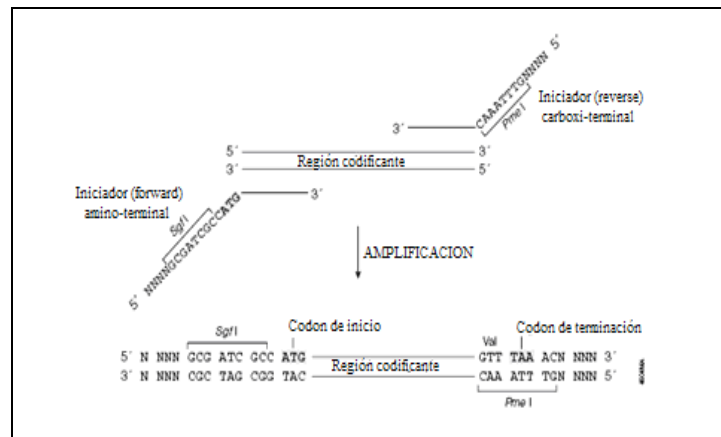


FIGURA 3. Estrategia de ligación del plásmido de expresión *pFIK T7 Flexi®*

2.2 Extracción del DNA genómico

Se maceraron 2 g de hígado de *Dasybus novemcinctus* en solución salina (SS). El material se lavó con regulador Tris-EDTA-Glucosa (300 µL) y se centrifugó a 6400 X g por espacio de 5 min.; el botón obtenido se resuspendió en 100 µL de regulador Tris-HCl/EDTA (TE, ver apéndice). Cien microlitros de la muestra se colocó en tubos Eppendorf, enseguida se adicionaron 200 µL de solución de lisis (ver apéndice), se digirió durante 1 hora a 55° C en baño de agua con agitación regular. Posteriormente se agregaron 400 µL de una mezcla fenol-cloroformo (1:1), se agitó y se centrifugó por 10 min a 6,400 X g. Inmediatamente se separó la fase orgánica (DNA-fenol) evitando que se contaminara con la fase proteica; al sobrenadante obtenido se le agregó 200 µL de cloroformo, se mezcló durante 5 min y centrifugó a 6,400 X g por 10 min. El DNA obtenido se precipitó adicionando 30 µL de NaCl 1M y 1,000 µL de etanol absoluto mantenido a 4° C. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 13,000 X g durante 30 min a 4° C, se eliminó el sobrenadante y se realizaron tres lavados con alcohol etílico al 70%. Finalmente el DNA obtenido fue resuspendido en regulador TE y se comprobó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a 65V por una hora.

2.3 Obtención de los productos de amplificación del gen *dtrdv2*

Para la amplificación de las secuencias del gen *dtrdv2* de *Dasybus novemcinctus* se emplearon las condiciones de reacción contenidas en la Tabla 2. Durante los ensayos se manejaron diferentes concentraciones de cada uno de los componentes de reacción y temperaturas de alineación para ajustar y estandarizar las condiciones óptimas necesarias. Cabe señalar que para el cálculo de la temperatura de alineación se utilizó la ecuación, $T_m = 64.9 + 41(G+C)$

16.4)/(A+T+G+C). Así mismo, se usó para estos experimentos la enzima *Gotaq Flexi DNA polymerase* (Promega, USA) contenida en el kit de amplificación de la misma casa comercial.

Tabla 2. Protocolo original para la amplificación del gen <i>dtrdv2</i> de <i>Dasypus novemcinctus</i>			
Componente			Concentración
Oligonucleótidos	trdv2-f		30 pmol/μL
	trdv2-r		30 pmol/μL
Bases			160 μmol/μL
Regulador			1X
MgCl ₂			1.75 mM
<i>GoTaq Flexi DNA polymerase</i>			5 U/μL
DNA			100 ng/mL
Volumen final			35
	Condición	Temperatura	Tiempo
	1ra. Desnaturalización	95° C	5 min.
	2da. Desnaturalización	95° C	1 min.
	Alineación	60° C	1 min.
	Extensión	72° C	1 min. 10''
	Extensión final	72° C	5 min.
	Conservación	4° C	-----

2.4 Purificación de los productos de amplificación del gen *dtrdv2*

Con el propósito de eliminar el exceso de productos no específicos de la reacción de PCR, se realizó la purificación de las bandas de 319 pb (amplicón del gen *dtrdv2*) con el sistema *QIAquick™ Gel Extraction Kit* (QIAGEN, Alemania). Para ello se separaron los productos de reacción de PCR por electroforesis en un gel de agarosa al 2%, la banda deseada se obtuvo por el corte del gel con una navaja estéril. La muestra de DNA contenida en el corte se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo de 1.5 mL adicionando posteriormente 4 volúmenes de regulador QG, se incubó a 60° C hasta la disolución completa de la agarosa (aproximadamente 10 min.).

Posteriormente, la mezcla fue transferida a la columna de separación y se centrifugó a 13,000 X g/60 seg; el sobrenadante se eliminó y se realizó un segundo lavado con regulador QG para la eliminación completa de los residuos de agarosa utilizando las mismas condiciones de centrifugación. Inmediatamente se adicionaron 750 μL de regulador PE y se centrifugó dos veces a 13,000 X g/60 seg, para eliminar el exceso de impurezas y de solución de lavado. El eluyente se transfirió a un tubo Eppendorf limpio y estéril colocando 40 μL de H₂O sobre la membrana, se dejó reposar durante 5 min y se extrajo el producto de PCR por centrifugación a 13,000 X g/60 seg. Finalmente, la calidad de los productos de PCR fue analizada por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2%. Los productos de 319 pb obtenidos se conservaron a -20° C para su secuenciación y posterior ligación al vector.

2.5 Secuenciación del producto de amplificación del gen *dtrdv2*

Para corroborar que el amplicón obtenido pertenece al gen *dtrdv2*, se realizó su secuenciación mediante el uso del equipo *SEQ4x4 Personal Sequencer System* (Amersham, Biosciences). Para ello, se montaron 4 reacciones de secuenciación, cada una de ellas manejando 2 μ L de cada uno de los dideoxinucleótidos (ddATP, ddTTP, ddGTP y ddCTP) marcado con Cy5.5 con una longitud de onda de emisión de 676 nm (*Thermo Sequenase Cy5.5 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit*, Amersham Biosciences, USA). Enseguida, se agregaron 6 μ L de la mezcla de reacción (Tabla 3) y se colocaron en el termociclador (PTC-100) que fue previamente enfriado a 4° C. Las condiciones de secuenciación se muestran en la Tabla 4.

Tabla 3. Protocolo para la reacción de secuenciación del gen <i>dtrdv2</i> de <i>Dasyatis novemcinctus</i>	
Componente	Concentración
Oligonucleótido	10 pmol/ μ L
Regulador	1X
<i>Thermo Sequenase DNA polymerase</i>	10 U/ μ L
DNA	100 ng/mL
Volumen final	27 μ L

Tabla 4. Condiciones para la reacción de secuenciación del gen <i>dtrdv2</i> de <i>Dasyatis novemcinctus</i>			
Condición	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1ra. Desnaturalización	95° C	5 min.	
2da. Desnaturalización	95° C	30 seg.	
Alineación	60° C	30 seg.	30
Extensión	72° C	2 min.	
Extensión final	72° C	5 min.	
Conservación	4° C	-----	

Los productos de la reacción de secuenciación se purificaron para la eliminación de los dideoxinucleótidos no incorporados por filtración en columnas de Sephadex G-50 mediante el uso del sistema *Illustra™ Autoseq G-50 Dye Terminator Removal Kit*, (GE Healthcare, United Kingdom). Para ello, previamente se resuspendió la resina contenida en las mediante agitación y se eliminó el regulador (0.05% Catón CG/ICP) por centrifugación a 7,600 X g/1 min; posteriormente las muestras de cada una de las reacciones se depositaron sobre la superficie de la resina, y se centrifugó a 7,600 X g/1 min para la purificación de los productos de secuenciación. Al filtrado obtenido se le agregaron 6 μ L del regulador de carga de formamida incluido en el kit de secuenciación.

Paralelamente a la reacción de secuenciación, se preparó el gel de desarrollo de poliácridamida al 6%. La solución *RapidGel XL 6%* fue difundida dentro del cassette (*RapidGel Quick Fill Glass Cassette*) de manera uniforme. Inmediatamente se polimerizó en el equipo *SEQ4x4*

RapidSet Gel Polymerizer durante un periodo de 3 minutos. Al término, se extrajo el cassette y se colocó en la cámara de desarrollo del secuenciador *SEQ4x4*. Enseguida, se inició el Programa *SEQ4x4 Basecaller*, seleccionando las condiciones de electroforesis (1500 V, 30 mA, 50° C) con una intensidad del láser del 50% a 70 mA. Se realizó un pre-desarrollo (al aire) para corroborar la estabilidad de las lecturas del láser; las cuales no deben de fluctuar por más de 200 mA. Finalmente, se agregó el regulador de desarrollo a la cámara (TBE) y se cargaron 1 µl de los productos purificados de la reacción de secuenciación en el orden ACGT realizando un pre-desarrollo de 30 segundos por lote de muestra. Finalmente, se comenzó el desarrollo de la electroforesis, el cual duró aproximadamente 1 hora.

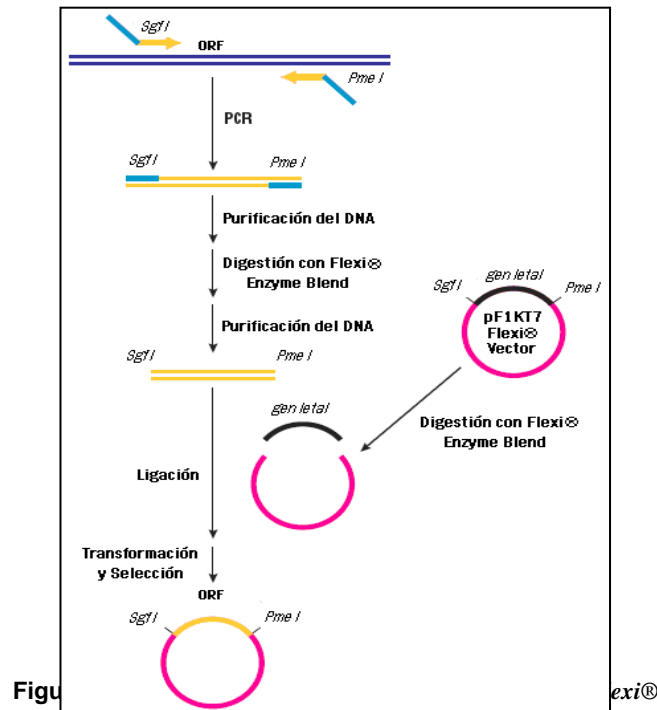
Terminado el proceso se alinearon y analizaron los gráficos de desarrollo de la electroforesis, se realizó el llamado de bases (Basecaller) de forma automática y se rectificaron las curvas y las secuencias de forma manual.

2.6 Clonación en el vector *pF1K T7 Flexi*®

Para la reacción de ligación de nuestro producto de PCR al vector *pF1K T7 Flexi*® se siguió el protocolo descrito en el *Technical Manual Flexi*® Vector Systems (Figura 4). Con base en lo anterior, el primer paso que se realizó, fueron las reacciones de restricción del producto de PCR del gen *dTrdv2* y del plásmido *pF1K T7 Flexi*® empleando las enzimas *SgfI* y *PmeI*, Tabla 5 y 6.

Tabla 5. Protocolo para la reacción de digestión del amplicón del gen <i>dTrdv2</i> de <i>Dasybus novemcinctus</i>	
Componente	Volumen
Regulador	4 µL
<i>SgfI PmeI</i>	4 µL
Producto de PCR	500 ng/mL
Volumen final	20 µL

Tabla 6. Protocolo para la reacción de digestión del vector <i>pF1K T7 Flexi</i>®	
Componente	Volumen
Regulador	4 µL
<i>SgfI PmeI</i>	4 µL
Vector <i>pF1K T7 Flexi</i> ®	2 µL
Volumen final	20 µL



Las reacciones se incubaron 30 minutos a una temperatura de 37° C. y posteriormente se calentaron a 60° C con el propósito de inactivar las enzimas de restricción contenidas en la mezcla.

Para ligar el producto de PCR con el vector *pFIK T7 Flexi*® se siguió el protocolo descrito en la Tabla 7. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante una hora y posteriormente el producto obtenido se utilizó para la transformación de células competentes de *Escherichia coli JM109*.

Tabla 7. Protocolo para la reacción de ligación del producto de PCR al vector <i>pFIK T7 Flexi</i> ®	
Componente	Volumen
Regulador	10 µL
Producto de PCR	4 µL
Vector <i>pFIK T7 Flexi</i> ®	4 µL
T4 DNA Ligase	1 µL
Volumen final	20 µL

2.7 Transformación de las células JM109 de *Escherichia coli*

Se agregó 3 μL de la reacción de ligación a un vial de las células JM109 mezclándose por pipeteo de manera suave. La reacción de transformación se incubó a 4° C por espacio de 30 minutos. Posteriormente, las células se sometieron a choque térmico a 42° C durante 45 seg., evitando agitarlas e inmediatamente se colocaron en baño de hielo. Al término, se agregaron 250 μL de medio SOB a cada vial y se incubaron las células por espacio de 30 minutos a 37° C.

2.8 Recuperación de las clonas

Se transfirieron 100 μL de las células en suspensión de cada uno de los viales a placas con medio LB (Luria Bertani) complementado con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Kanamicina. Se identificaron las colonias blancas de las placas incubadas a 37° C durante 18 h; las cuales se picaron y se sembraron en tubos con caldo LB con el antibiótico (*Kan* 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$); los cultivos restantes se dividieron para su conservación a -70° C y análisis de la presencia y expresión de los fragmentos clonados.

2.9 Purificación del plásmido

Se centrifugaron 1.5 mL del cultivo de cada clona a 6,400 X g/min, el sobrenadante fue eliminado y el botón se resuspendió en 150 μL de regulador S1, inmediatamente se agregaron 150 μL de regulador S2 mezclando por inversión. Enseguida se añadieron 300 μL de regulador S3, se mezcló por inversión y centrifugó a 6400 x g/60 seg.; el sobrenadante se depositó en la columna *GFX™ Micro Plasmid Prep kit* (Amersham Pharmacia Biotech, USA). La columna fue centrifugada a 5,200 X g y se descartó el líquido del tubo Eppendorf; así mismo, para eliminar las impurezas se realizó un lavado con 0.3 mL de regulador S3 y se centrifugó a 5,200 X g/30 seg.

Enseguida se realizó un lavado con 400 mL de regulador W y se centrifugó dos veces para eliminar el exceso del buffer. Posteriormente la columna se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se le agregaron 100 μL de regulador TE (10 mM Tris-Cl, EDTA 20 mM, pH 8.5), se incubó durante un minuto y finalmente se centrifugó para obtener el plásmido purificado.

2.10 Análisis de las transformantes

El DNA plasmídico de cada una de las clonas se sometió a dos ensayos para verificar la presencia del fragmento clonado. Se realizaron las pruebas de PCR utilizando los iniciadores trdv2-f y trdv2-r, bajo las condiciones antes descritas en el punto 5.3, además de su secuenciación para confirmar la presencia del inserto de *dtrdv2*.

2.11 Cálculo del peso molecular del producto de expresión del ligando *dtrdv2*

Basándonos en el tamaño del producto de PCR y de los resultados obtenidos de su secuenciación, los datos se sometieron a un análisis con el programa *Compute pI/Mw* que se encuentra en el servidor de *Expasy (Expert Protein Analysis System)* para calcular el peso molecular teórico de la proteína recombinante que se expresaría del gen *dtrdv2* insertado en el vector *pF1K T7 Flexi®*.

2.12 Expresión del producto de PCR y purificación de la proteína recombinante *dTRDV2*

Una vez confirmada la presencia del gen *dtrdv2* ligado al vector *pF1K T7 Flexi®*, las clonas se cultivaron en caldo LB con kanamicina 50 µg/mL para la expresión del péptido de 99 aminoácidos esperado; basándose en la sobre-expresión nativa conferida por el promotor T7 RNA. Las células transformantes correspondientes se cultivaron en 2 mL de caldo LB con 50 µg/mL de kanamicina a 37° C/18 h. Posteriormente, se sembraron los cultivos en 5 tubos con caldo RM/antibiótico (0.1 mL de cultivo en 10 mL), los cuales se incubaron durante 24 h a 37° C. Concluidas las 24 h, se centrifugaron los viales, a 6,400 X g por espacio de 10 minutos, recuperándose el sobrenadante y botón para el análisis de proteínas.

Para el caso de proteínas solubles el botón celular se liso mediante la adición de 500 µL de regulador de lisis (50mM K₂HPO₄, 400mM NaCl, 100mM KCl, 10% glicerol, 0.5% triton X-100) y se sometieron a choque térmico con calentamiento a 42° C y congelación a -150° C en nitrógeno líquido, se centrifugó el lisado y resuspendió en agua desionizada.

Para la determinación del perfil proteico de los sobrenadantes de cada cinética de expresión se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras (SDS-PAGE). Para el desarrollo electroforético se montaron las placas, con el gel de poliacrilamida, en una unidad de electroforesis vertical (BIORAD, USA), la cual se llenó con regulador de desarrollo (Tris-Glicina-SDS). En primer lugar se depositaron 5 µL del marcador de peso molecular (Gibco BRL ,10 747-012) y en seguida se adicionaron 20 µL (1 mg/mL) del sobrenadante de cada uno de los cultivos en los pozos. Se inició la electroforesis por 20 minutos a 80 V, para concentrar las muestras, y posteriormente se aumentó el voltaje a 120 V y se dejó correr por 60 minutos para el desarrollo del gel.

Terminado el desarrollo, los geles se tiñeron con la técnica del Azul de Coomassie precalentado a 60° C; se tiño por espacio de 1 h. Se lavaron los geles con una mezcla de decoloración (Etanol absoluto-Ácido Acético Glacial-Agua [3:1:6]) en agitación continua, hasta observar las bandas.

Se identificó la proteína recombinante mediante la comparación de los desarrollos electroforéticos entre el testigo (células de *Escherichia coli JM109* no transformadas) y las clonas obtenidas. Se recortó la banda de 12 kDa (peso molecular teórico de la proteína *dTRDV2* recombinante) del gel de poliacrilamida y se procedió a su purificación mediante la técnica de electroelución (BIORAD, USA); en donde el fragmento del gel se depositó en la columna de vidrio armada con una membrana de diálisis con límite de exclusión mayor de 10 kDa, a la columna se le aplicó una corriente de 8 mA durante 3 horas. La columna se desarmó y se extrajo la proteína *dTRDV2* purificada contenida en la membrana.

2.13 Concentración de la proteína *dTRDV2*

Mediante la técnica de Bradford se determinó la concentración [$\mu\text{g/mL}$] de la proteína purificada previamente por electroelución. Para ajustar la concentración de cada uno de los purificados se procedió a concentrar la proteína *dTRDV2* mediante el uso de las columnas *Microcon® Centrifugal Filter Devices* (Millipore, USA). Para ello, se depositaron 500 μL de los purificados dentro del filtro de las columnas armadas y se centrifugaron a 13,000 X g por espacio de 30 minutos a 25° C; enseguida se descartó el líquido remanente en el tubo de la columna y se invirtió el filtro para la recuperación del filtrado. Se centrifugó a 3,600 X g /3 min para obtener finalmente la proteína recombinante concentrada en un volumen de 10 μL aproximadamente.

Posteriormente, a cada uno de los concentrados se le determinó la cantidad de la proteína *dTRDV2* en $\mu\text{g/mL}$ mediante la técnica de Bradford. La concentración se homogenizó a 100 $\mu\text{g/mL}$ para cada vial para su posterior uso en la inoculación de los animales de experimentación.

2.14 Inmunización y análisis de proliferación

Para la obtención de anticuerpos anti-*dTRDV2* se procedió a inmunizar ratones de la cepa BALB/c mediante la administración vía intraperitoneal de 100 $\mu\text{g/mL}$ de la proteína recombinante purificada. Se realizaron dos retos adicionales con el inmunógeno a nuestros animales a los 15 y 21 días posteriores a la primera inmunización (Tabla 8). La proteína *dTRDV2* se administró a los

animales junto con el adyuvante de Freund completo en las dos primeras inmunizaciones e incompleto en la tercera, con el propósito de aumentar la respuesta inmune de los ratones.

Tabla 8. Protocolo de inmunización						
Inyección No.	Tiempo (días)	Fecha	Dosis	Adyuvante	Vía	Observaciones
1	0		100 µg/mL	Completo	IP	
2	15		100 µg/mL	Completo	IP	
3	21		100 µg/mL	Incompleto	IP	
Sangrado	28					

Los animales inmunizados y controles (Ratones BALB/c inoculados con 100 µL de SS) se sangraron de la vena caudal obteniéndose 50 µL de sangre. Para la separación del suero, la sangre fue centrifugada a 6,400 X g por 7 minutos; el suero obtenido fue diluido 1:100 y a 1:50 con PBS. Estas diluciones fueron utilizadas para los posteriores ensayos de inmunofluorescencia.

2.15 Análisis de la antigenicidad de la proteína dTRDV2

Se extrajo sangre de bazo de los ratones inmunizados, se empleó solución de Alsever (relación 1:1) como anticoagulante. La sangre fue diluida en solución Hank modificada (sin Ca²⁺ y Mg²⁺ de Sigma) y se procedió al aislamiento de células mononucleares por centrifugación en gradiente de densidad sobre Ficoll-Paque (Histopaque-1077, Sigma). Se extrajo el anillo de células y se lavaron estas, 3 veces con solución de Hank. Finalmente fueron resuspendidas en medio RPMI 1640 (Sigma) suplementado con L-glutamina 100 mmol, penicilina-estreptomicina (100 UI/mL y 100 µg/mL) y 10% de SFB. Se contaron y ajustaron las células a 10⁶/mL en el mismo medio y se dispersaron en placas de 96 pozos de cultivo, a razón de 10⁵ células por pozo. Se añadió la proteína recombinante a las concentraciones: 50, 100 y 200 ng/pozo y se incluyó un control de mitógeno: fitohemaglutinina (PHA) a 5 µg/mL⁽⁵⁸⁾. Cada prueba se montó por triplicado. La microplaca se incubó por espacio de 72 h a 37° C. Concluido el tiempo se le adicionó una solución de MTT 5mg/mL y se incubó durante 1 hora a 37° C.

Al finalizar el periodo de incubación se le realizaron a la placa tres lavados con PBS y se fijaron las células con 150 µL de alcohol isopropilico. Posteriormente, se sedimentaron las células mediante centrifugación a 6,400 X g por espacio de 10 min. Se descartó el sobrenadante y a cada pocillo se le agregaron 120 µL de KOH 2M⁽⁶¹⁾. Se leyó la DO a 650 nm en un lector para microELISA para obtener así los valores de proliferación celular.

2.16 Obtención de sangre periférica de armadillo y purificación de células mononucleares

Por medio de punción cardiaca se realizó la obtención de la sangre de varios especímenes de *Dasybus novemcinctus* previamente anestesiado. Para tal fin, primeramente se le administró vía intramuscular (VIM) atropina (0.1 mg por Kg de peso) para la relajación del nervio vago e impedir el paro respiratorio por acción del sedante. Después de 15 minutos se le aplicó VIM el analgésico (fentanil sódico, 0.1mg/Kg) para disminuir su umbral de dolor.

Posteriormente, a los 15 minutos de la analgesia se le administró VIM el sedante ketamina (0.1mg/Kg) y se esperó hasta que el animal estuviera en completamente anestesiado. Diez mililitros de sangre por punción cardiaca que fueron depositados en 5 mL de solución de Alsever para evitar su coagulación.

Las células mononucleares de armadillo se aislaron mediante la técnica de Boyün^(11,12); la cual consiste en diluir 10 mL de sangre con 5 mL de solución de Ficoll-Hypaque con una densidad de 1.077 g/L en un tubo cónico de 15 mL. Se centrifugó el tubo a 4600 X g por espacio de 30 min, posteriormente fueron recuperadas las células mononucleares de la interfase entre el plasma y el Ficoll.

Las células fueron lavadas por duplicado con 5 mL de solución de Alsever por centrifugación a 4600 X g durante 10 minutos, durante el último lavado las células se resuspendieron en un mililitro del medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal de ternera al 10%.

2.17 Detección de linfocitos T $\gamma\delta$ de *Dasybus novemcinctus* por inmunofluorescencia.

Para la identificación de los linfocitos de armadillo con receptor T δ se realizó una prueba de inmunofluorescencia indirecta. Quinientas mil células mononucleares fueron depositadas en cada pozo de un portaobjetos, posteriormente fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 20 min en cámara húmeda. Pasado el tiempo de incubación, el portaobjetos fue lavado tres veces con 10 mL de PBS. Se eliminó el exceso de PBS y se depositaron 20 μ L de cada uno de los sueros diluidos 1:50 de los ratones BALB/c no inoculados; 2 sueros de ratones inmunizados con la proteína dTRDV2 y 2 sueros con ratones inoculados con solución salina. A un quinto pozo se le depositaron 20 μ L de PBS estéril que actuó como control del conjugado de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón.

La laminilla se incubó a temperatura ambiente por espacio de 20 minutos en cámara húmeda. Al término de la incubación, se realizaron 3 lavados con PBS estéril, posteriormente a cada pozo se le adicionaron 20 μ L del anticuerpo fluoresceinado anti-inmunoglobulinas de ratón (Sigma Diagnostics, USA). La preparación se incubó a temperatura ambiente por 20 min en la cámara húmeda y se lavó por duplicado con 5 mL de PBS; un tercer lavado se realizó con agua desionizada.

Finalmente se montó la preparación agregando 1 μ L del colorante de Azul de Evans con glicerina y un microlitro de Ioduro de Propidio para eliminar la fluorescencia inespecífica. La laminilla se revisó con un microscopio de Epi-fluorescencia *Axiovert 100* (Carl Zeiss, Germany) para observar linfocitos teñidos de color verde en su superficie los cuales fueron considerados como linfocitos T $\gamma\delta$ de *Dasypus novemcinctus*.

2.18 Detección de linfocitos T $\gamma\delta$ de *Dasypus novemcinctus* por citometría de flujo.

100 μ L de sangre periférica de armadillo y/o humano se colocó en tubos de propileno (BD, Falcon 352058). A los tubos se le agregó 20 μ L del suero anti-dTRDV2 y suero de animales no inoculados con la proteína. Se incubaron a temperatura ambiente por espacio de 20 min en oscuridad; posteriormente se adicionó 2 mL de solución de lisis (BD, CA, USA), se agitaron durante 1 min y fueron centrifugados a 600 g por 10 min.

Al botón celular obtenido se le realizaron 3 lavados con un 1 mL de solución de PBS-azida-FCS (azida de sodio 0.02% y suero fetal de ternera al 10%) y se centrifugó a 600 g durante 10 min. Al término, se les adicionó a cada tubo 10 μ L de anticuerpos de carnero anti-IgG-FITC de ratón (Zymed, CA, USA). Se incubó a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad por espacio de 20 min. y se le realizaron tres lavados con PBS-azida-FCS. Las células se resuspendieron con 1 mL de PBS-azida-formaldehído (PBS-azida suplementado con 10% formaldehído). Finalmente, las células fueron cuantificadas mediante el uso del citómetro de flujo (EPICS ALTRA, Coulter Corporation, Miami, Florida USA). La tinción con el anticuerpo monoclonal anti-TCR $\gamma\delta$ (Immunotech Coulter, FL, USA), utilizado como control para la identificación de células humanas con este tipo de receptor, fue desarrollado con la técnica antes descrita.

3. RESULTADOS

3.1 Diseño y especificidad de los iniciadores.

Los oligonucleótidos trdv2-f (5'- TAA-AGC-GAT-CGC-CAT-GTC-AGC-CAT-TGA-GTT-GGT-GCC-3) y trdv2-r (5'-GAC-GGT-TTA-AAC-GGT-GTC-ACA-GGC-ACA-GTA-GTA-AGA-CCC-3') diseñados amplificaron la región comprendida entre 176,698 a 176,999 pb del marco de lectura abierto del gen *dtrdv2* humano (Fig. 5). Mediante el uso del programa *Flexi® Vector Primer Design Tool*, originaron un producto de amplificación de 319 pb a partir del DNA de humano. Para tal efecto se consultó la secuencia reportada en NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) para el gen *trdv2* de *Homo sapiens* con numero de accesion AE000661, gi:2358060 (apéndice A)

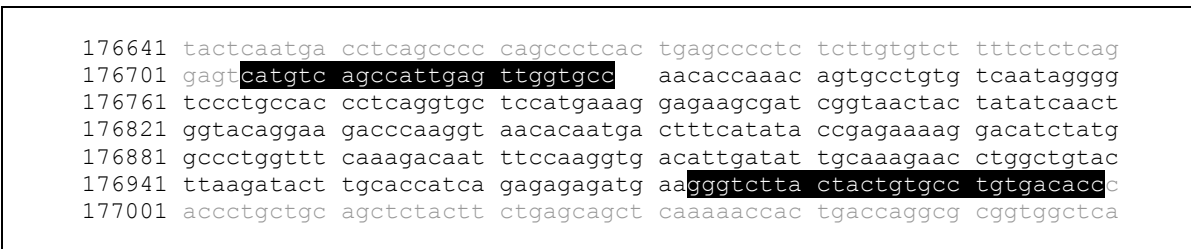


Figura 5. Diagrama de la alineación de los iniciadores trdv2-f y trdv2-r para la amplificación del gen *dtrdv2* de humano.

Se presenta de manera gráfica, resaltados, los sitios de hibridación de los iniciadores diseñados en la secuencia reportada del gen *hdv102s1* contenida en 14q11.2 (AE000661, gi:2358060)

El análisis de la especificidad de los iniciadores desarrollados se verificó con el empleo del programa *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*, NCBI, RID: 1160675633-677-163711396556.BLASTQ4 y RID: 1160675881-22060-84099598296.BLASTQ4, para *trdv2-f* y *trdv2-r* respectivamente). Los resultados arrojados por este análisis solo presentaron alineamientos por parte de los iniciadores con secuencias reportadas del gen *hdv102s1* de humano, hecho que nos asegura la utilidad y eficacia de los oligonucleótidos desarrollados.

3.2 Amplificación del gen *dtrdv2* a partir de DNA de *Dasypus novemcinctus*

Se llevó a cabo la optimización de la reacción en cadena de la polimerasa empleando los iniciadores construidos, para ello se utilizó el DNA de *Dasypus novemcinctus*, obtenido a partir de la técnica de fenol-cloroformo descrita anteriormente.

Los oligonucleótidos diseñados amplificaron un producto de 319 pb a partir del DNA total de hígado de *Dasypus novemcinctus* (Figura 6), el cual correspondió al tamaño de amplicón

esperado teóricamente basado en los análisis *in silico* desarrollados anteriormente. Los resultados obtenidos en la estandarización de la PCR del gen *dtrdv2* establecieron los parámetros y condiciones para su amplificación (Tabla 9).

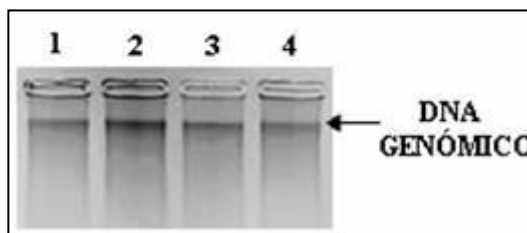


Figura 6. Integridad del DNA genómico de *Dasypus novemcinctus*
Pozos 1-4: DNA extraído de una biopsia de hígado Se empleó un Gel de agarosa al 0.8%.

Tabla 9. Protocolo estandarizado para la amplificación del gen <i>dtrdv2</i> de <i>Dasypus novemcinctus</i>		
Componente	Concentración	
Oligonucleótidos	trdv2-f	20 pmol/μL
	trdv2-r	20 pmol/μL
Bases		120 μmol/μL
Regulador		1X
MgCl ₂		3.0 Mm
<i>Taq-DNA-polimerasa platinum</i>		5 U/μL
DNA		100 ng/μL
Volumen final		35 μL

Condición	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1ra. Desnaturalización	94° C	5 min	
2da. Desnaturalización	94° C	30 seg	
Alineación	60° C	30 seg	30
Extensión	72° C	70 seg	
Extensión final	72° C	5 min	
Conservación	4° C	-----	

Los productos de la amplificación obtenidos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% revelado con Bromuro de Etidio al 0.1% (Figura 7). Cada ensayo incluyó muestras de DNA genómico de *Escherichia coli* como control negativo.

3.3 Purificación del producto *dtrdv2* de *Dasypus novemcinctus* obtenido por PCR

Los productos de amplificación del gen *dtrdv2* se purificaron mediante el estuche de purificación de QIAGEN. Como se puede observar en la Figura 8, se obtuvo tanto el rendimiento como las características necesarias para que el producto de PCR fuera utilizado para su secuenciación e inserción al vector *pF1K T7 Flexi*®.

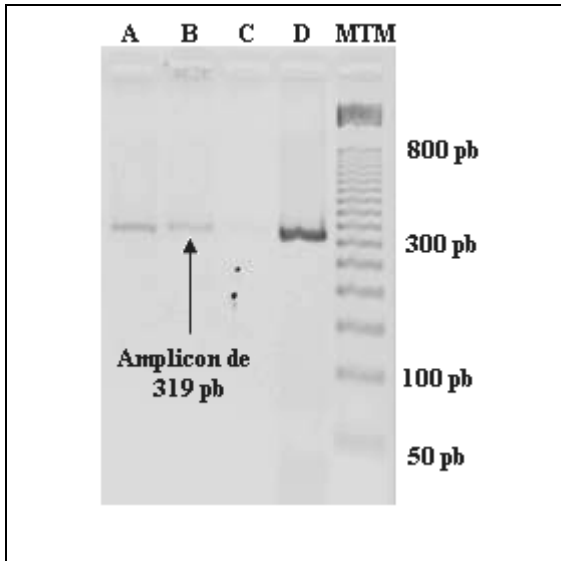


Figura 7. Amplificación del gen *dtrdv2* de *Dasypus novemcinctus*.

Se muestran los productos de PCR obtenidos mediante el empleo de los iniciadores trdv2-f y trdv2-r; A) y B) Amplificación a partir de DNA de hígado de *Dasypus novemcinctus*, C) Control negativo (DNA de *Escherichia coli*), y D) Control positivo (DNA humano).

Gel de agarosa al 2.0%, revelado con bromuro de etidio.

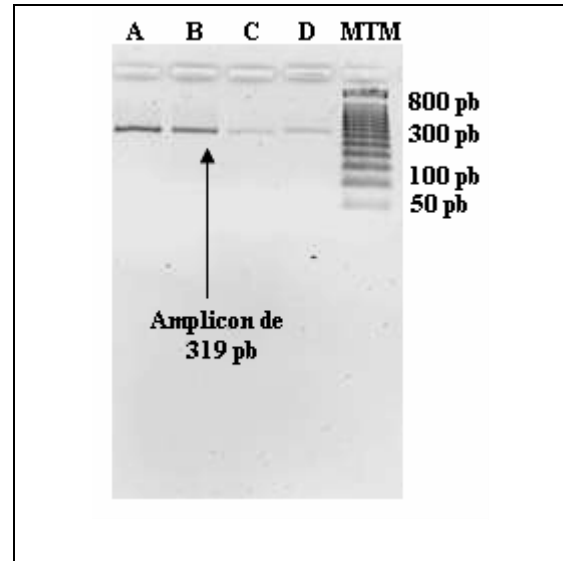


Figura 8. Purificación del producto de PCR del gen *dtrdv2* de *Dasypus novemcinctus*.

Se muestra la purificación de los productos de PCR obtenidos mediante el empleo de los iniciadores trdv2-f y trdv2-r; A) y B) Muestras de PCR no purificadas, C) y D) Productos purificados por el método de *QIAGEN*.

Gel de agarosa al 2.0%, revelado con bromuro de etidio.

3.4 Secuenciación del gen *dtrdv2* de *Dasypus novemcinctus*

La secuencia generada, mediante el análisis con el equipo *SEQ 4x4*, del producto de amplificación del gen *dtrdv2* de *Dasypus novemcinctus* se muestra en la Figura 9; dicha secuencia fue además ratificada con un estudio en paralelo con el equipo *ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer PE* (Applied Biosystems, USA) realizado por el servicio externo del departamento de Fisiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

El análisis de esta secuencia en el programa *MultAlin (Multiple Sequence Alignment with Hierarchical Clustering)* versión 5.4.1, Copyright I.N.R.A. France 1989, 1991, 1994, 1996) demostró que las secuencias obtenidas ambos casos son complementarias con una similitud nucleotídica del 95.6% cuyas diferencias se deben primordialmente a la sensibilidad del método de secuenciación (Figura 9).

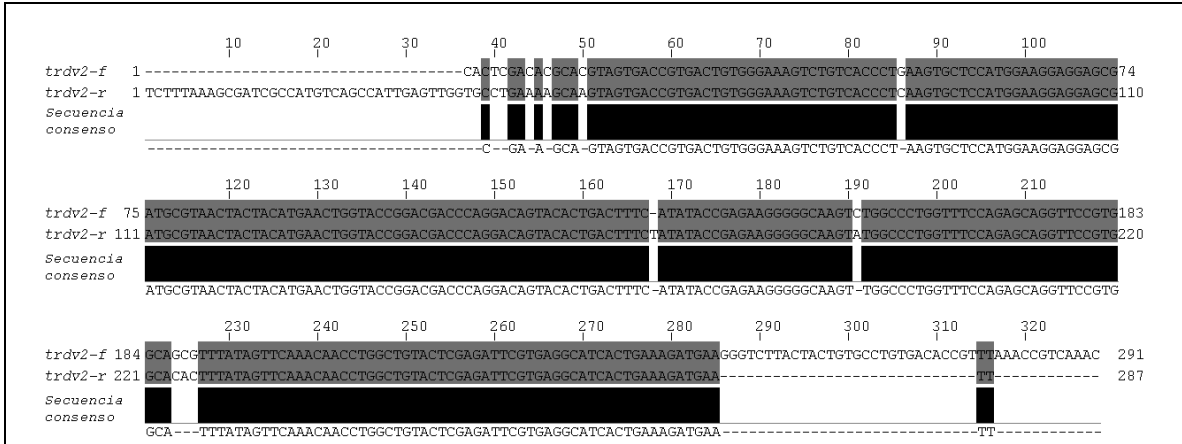


Figura 9. Secuencias nucleotídicas obtenidas de la secuenciación del producto de PCR del gen *dtrdv2* de *Dasyatis novemcinctus*.

En la figura se muestra los resultados de la secuenciación de los amplicones del gen *dTrdv2*, utilizando los oligonucleótidos *trdv2-f* y *trdv2-r*, y el análisis de homología. En la imagen se muestra la alineación de las secuencias obtenidas por ambos iniciadores en un gráfico que manifiesta la homología entre sí, los resultados fueron generados con el programa *MultAlin* y editados en *Bioedit*.

La secuencia de nucleótidos consenso obtenida del amplicón purificado fue analizada mediante el programa de alineación *BLASTn* del servidor NCBI. Los resultados generados de la alineación de la secuencia del gen *dtrdv2* presentaron una similitud del 87% (RID: 1160087380-12090-72554474606.BLASTQ4, apéndice A,) con la secuencias reportadas en el NCBI para el gen *trdv2* o *hds102s1* de origen humano (AE000661 [gi:2358060]).

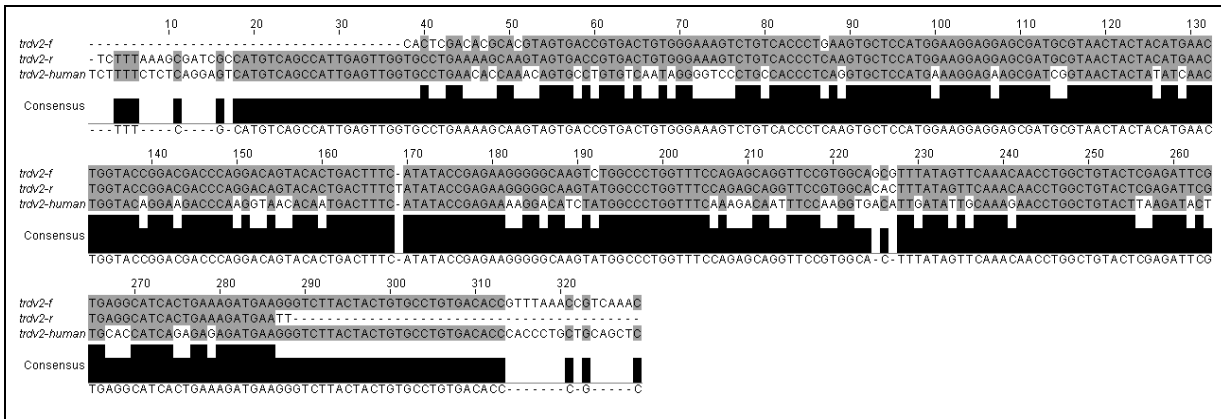


Figura 10. Alineación de las secuencias nucleotídicas del gen *dtrdv2* utilizando la matriz *Blosum62* del programa *MultAlin*.

Se observan los resultados obtenidos de la alineación de las secuencias del gen *hds102s1* de humano con las secuencias obtenidas experimentalmente del gen *dtrdv2* de *Dasyatis novemcinctus* mediante el uso de los iniciadores *trdv2-f* y *trdv2-r*.

Así mismo, las secuencias se analizaron mediante el programa *MultAlin* para verificar y valorar la homología entre el gen *trdv2* de humano (*hds102s1*) y el gen *dtrdv2* de *Dasyatis novemcinctus* (Figura 10). Este análisis ratifico el grado de homología encontrada con el programa *BLASTn*.

Paralelamente, la secuencia se tradujo con el objeto de buscar condones de terminación que en un momento dado nos impediría la expresión del gen *dtrdv2* de *Dasyus novemcinctus* insertado en un vector de expresión; como es el caso del plásmido *pFIK T7 Flexi®* seleccionado para este trabajo. En los resultados generados por el programa *EMBOSS Transeq* del *European Bioinformatics Institute* (EMBL-EBI) no se observó la presencia de este tipo de codones, lo que nos asegura que la expresión del gen *dtrdv2* podría llevarse a cabo. Además, al comparar la estructura primaria entre *dTRDV2* y *TRDV2* se encontró que poseían una similitud del 56.31%.

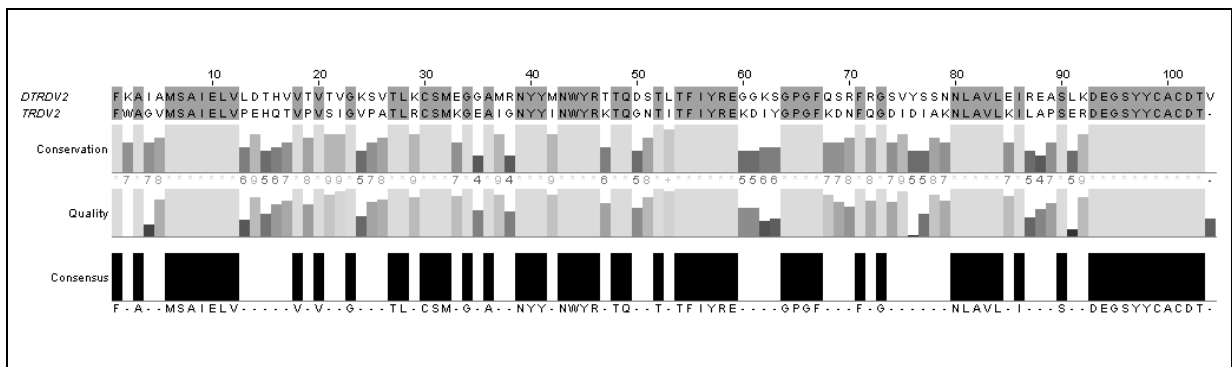


Figura 11. Alineación de las secuencias aminoácidas de TRDV2 utilizando la matriz BLOSUM62 del programa Multalin.

En la imagen se muestra los resultados de la alineación del péptido *dTRDV2* con las secuencias registradas en el NCBI para las proteínas de la cadena variable delta 2 del receptor de linfocitos T.

TRDV2.- Secuencia aminoácida reportada en 14q11.2, AE000661 [gi:2358060]

dTRDV2.- Secuencia aminoácida de la proteína recombinante

3.5 Clonación del gen *dtrdv2* en el vector de expresión *pFIK T7 Flexi®*

Después de realizar la ligación de los fragmentos obtenidos por PCR en el vector *pFIK T7 Flexi®* se llevó a cabo la transformación de las células *JM109* de *Escherichia coli*, las cuales fueron sembradas en placas con medio LB-Kanamicina, mecanismo que permitió realizar la selección de las clonas que poseían el plásmido cerrado o con el inserto ligado (Figura 12).

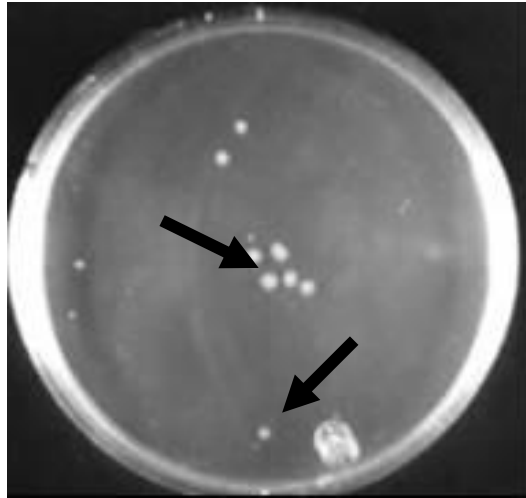


Figura 12. Cultivo de las clonas positivas al gen *dtrdv2* con resistencia a la Kanamicina.

En la imagen se puede observar el desarrollo de 9 colonias de células de *Escherichia coli JM109* transformadas en el medio LB+kanamicina. El crecimiento nos indica dos características importantes: 1) la presencia del vector *pFIK T7 Flexi®* en las bacterias que le confiere la resistencia al antibiótico y 2) la inserción del producto de PCR que removió al gen de la barnasa, la cual tiene propiedades citotóxicas.

Las colonias obtenidas en los ensayos se picaron, identificaron y cultivaron de novo para la conservación de las clonas y su estudio posterior. Cada una de las clonas se sometieron a diversos estudios para comprobar la presencia de los ligandos y posterior valoración de su expresión. Los datos que se muestran en la Tabla 10 son indicativos del número de ensayos realizados tomando en cuenta que solo se decidió trabajar en un principio con la mitad de las clonas generadas y la posterior disminución de las muestras para realizar un análisis más fino.

Tabla 10. Resultados del análisis de las células transformantes				
Fragmento	Clonas ¹	Denominación	Extracción de plásmido	PCR ²
319 pb	34	1-34	34	8/8

1.-Se analizaron la mitad de las clonas obtenidas
2.-PCR con los iniciadores trdv2-f y trdv2-r

3.6 Análisis de las clonas de *Escherichia coli JM109* transformantes

Después del aislamiento de las clonas, éstas se cultivaron en caldo LB-Kanamicina y se les extrajo el DNA plasmídico con el kit *GFX™ Micro Plasmid Prep kit* (Amersham Pharmacia Biotech, USA). Los resultados de la purificación se pueden observar en la Figura 13.

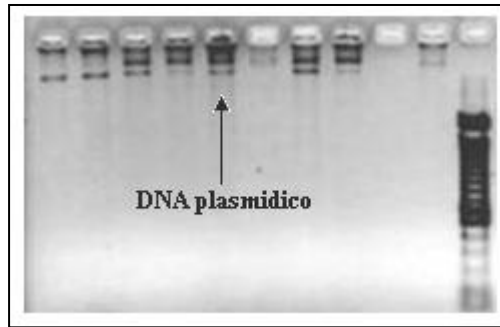


Figura 13. Integridad del DNA plasmidico extraído de las clonas de *Escherichia coli JM109* en gel de agarosa al 0.8%.

Con el material genético, aislado de las 34 clonas, se realizaron los ensayos de PCR para demostrar la presencia del inserto del gen *dtrdv2*, ligado al vector *pF1K T7 Flexi*®, para ello se utilizaron los iniciadores *trdv2-f* y *trdv2-r*. Las ocho clonas seleccionadas para este ensayo amplificaron el producto de 319 pb esperado (Figura 14).

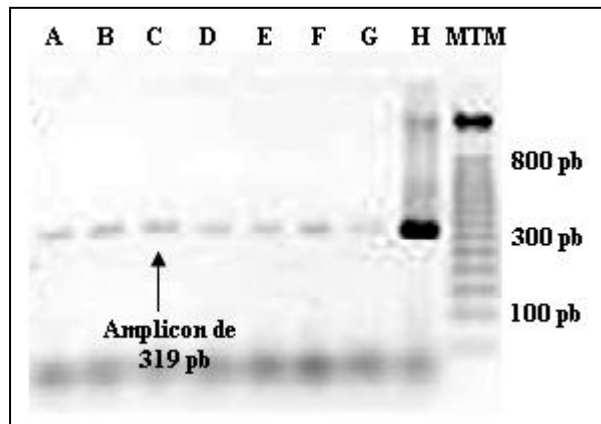


Figura 14. Amplificación de lo insertos de *dtrdv2* de los plásmidos de las clonas de *Escherichia coli JM109*.

Se observa los amplicones de 319 pb producto de la amplificación de los insertos ligados al vector *pF1K T7 Flexi*®. Los incisos de A) a G) corresponden a las clonas 1 a 7 respectivamente; el inciso H) es el control positivo (DNA de *Dasypus novemcinctus*).
Gel de agarosa al 2.0%, revelado con bromuro

3.7 Análisis de la expresión de la proteína dTRDV2

Mediante la técnica de SDS-PAGE se analizó la expresión del péptido *dTRDV2* recombinante de las clonas que mostraron la presencia del inserto (*dtrdv2*). Las bacterias se lisaron por choque térmico, el sobrenadante y el botón celular fueron separados, un análisis de las proteínas se realizó mediante electroforesis en SDS-PAGE al 12%.

Los resultados obtenidos en los geles de poliacrilamida de 12% se observó un aumento significativo de un péptido de peso molecular de 12 kDa aproximadamente en todas las clonas positivas al gen *trdv2* con respecto a la cepa control (*Escherichia coli JM109*, carril I, Figura 15). El peso molecular de esta proteína correspondió al calculado que fue de 12.252 kDa por el programa *Compute pI/Mw (Expasy-Tools)* para el producto de expresión del inserto del gen *dtrdv2* contenido en el plásmido.

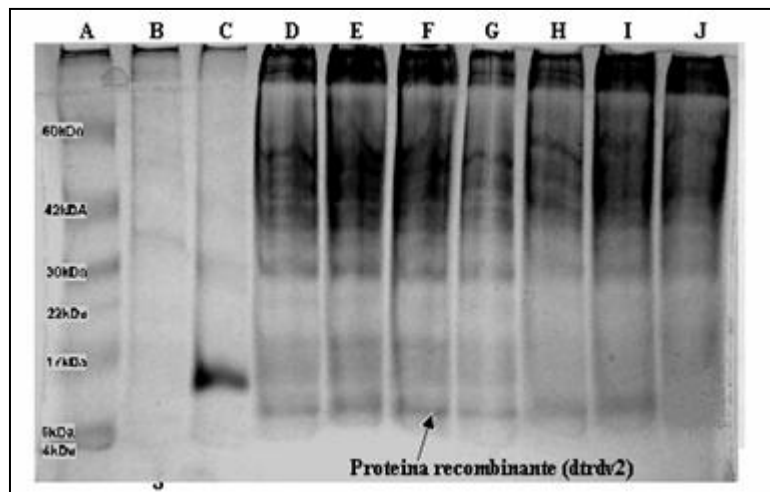


Figura 15. Expresión de la proteína TRDV2 recombinante

Se observa en la figura la presencia de la proteína *trdv2* recombinante de 12 kDa expresada por las clonas 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 en los pozos D) a I) respectivamente; El pozo J) pertenece al corrimiento de la cepa control de *Escherichia coli JM109*. Así mismo se manejaron 2 marcadores de tamaño molecular: A) marcador de peso molecular Multimark® (Invitrogen, Ca, USA) y C) corrimiento de la proteína Citocromo Oxidasa con peso molecular de 13 kDa.

Gel de SDS-PAGE al 12%, teñido con la técnica de azul de Coomassie

3.8 Análisis de la antigenicidad de la proteína recombinante *dTRDV2*

Una vez identificada nuestra proteína recombinante, esta fue purificada y concentrada para realizar la inmunización de los animales y la obtención posterior de los anticuerpos. Además, se valoró si esta proteína recombinante tenía la capacidad antigénica para estimular a los linfocitos de ratón. Después de finalizar el periodo de inmunización los ratones fueron sacrificados en blanco y esplenectomizados. Los linfocitos de bazo fueron incubados con la proteína recombinante *trdv2* (200 ng) y con fitohemaglutinina (5 µg/pozo) como testigo positivo por 72 h, posteriormente se evaluó el nivel de proliferación celular mediante la reducción de MTT. El resultado obtenido mostró valores promedio de absorbencia de 0.515 y 0.513 para los linfocitos estimulados con la proteína *dTRDV2* y la fitohemaglutinina respectivamente (Figura 16).

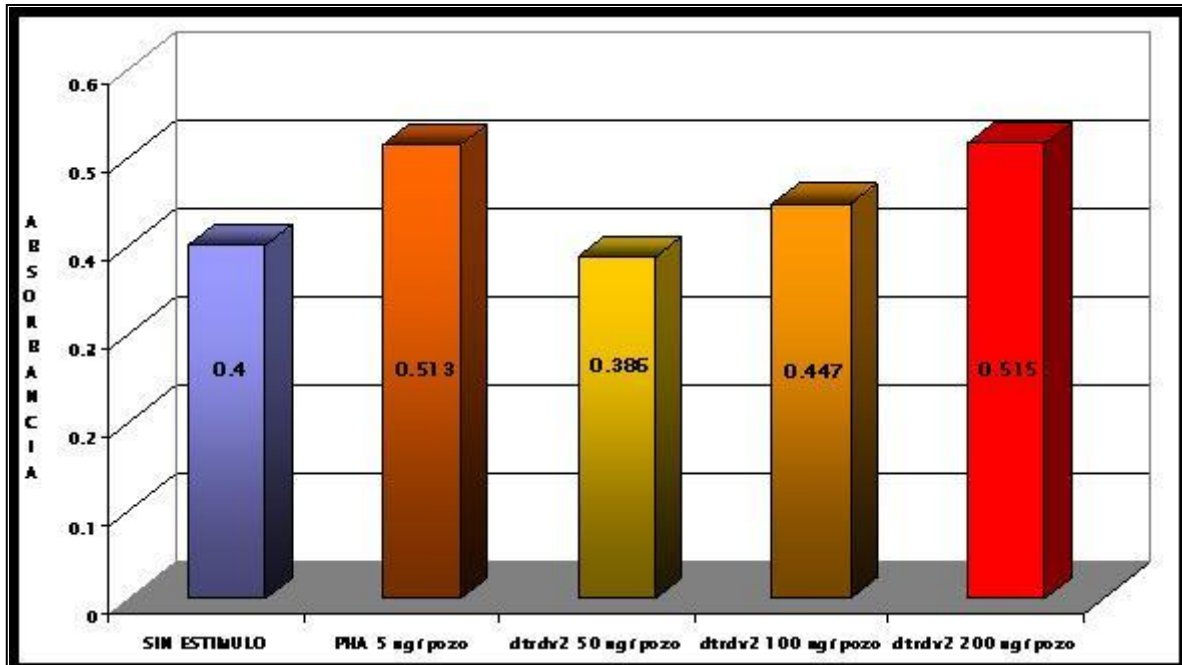


Figura 16. Ensayo de la proliferación de linfocitos de ratón a la proteína recombinante *dTRDV2*

En el gráfico se puede observar las diferencias encontradas cuando se estimularon linfocitos de ratón con diferentes concentraciones de la proteína recombinante *dTRDV2*. Los incrementos de las cantidades del péptido son directamente proporcionales a la estimulación registrada; encontrándose que a 200 ng de *dTRDV2* se obtienen valores similares de estimulación que en el control positivo de proliferación (PHA 5 µg/pozo).

3.9 Detección de linfocitos de armadillo con el TCR δ

Posterior a la confirmación de la antigenicidad de la proteína recombinante, se realizó la identificación y cuantificación de los linfocitos T de armadillo con receptor delta en sangre periférica de *Dasyus novemcinctus* mediante los anticuerpos de ratón anti-proteína recombinante (*dTRDV2*) obtenidos de los animales inmunizados por la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

Los resultados obtenidos en este ensayo se muestran en la Figura 17 en donde se puede observar las imágenes obtenidas en la identificación de las poblaciones de linfocitos T con receptor delta mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

En la imagen A) se muestra la detección de linfocitos por el suero de ratón inmunizado con la proteína recombinante *dTRDV2*, mismo fenómeno que se presenta en los ensayos B), C) y D) observándose la especificidad de los anticuerpos anti-*dTRDV2* hacía una población en especial.

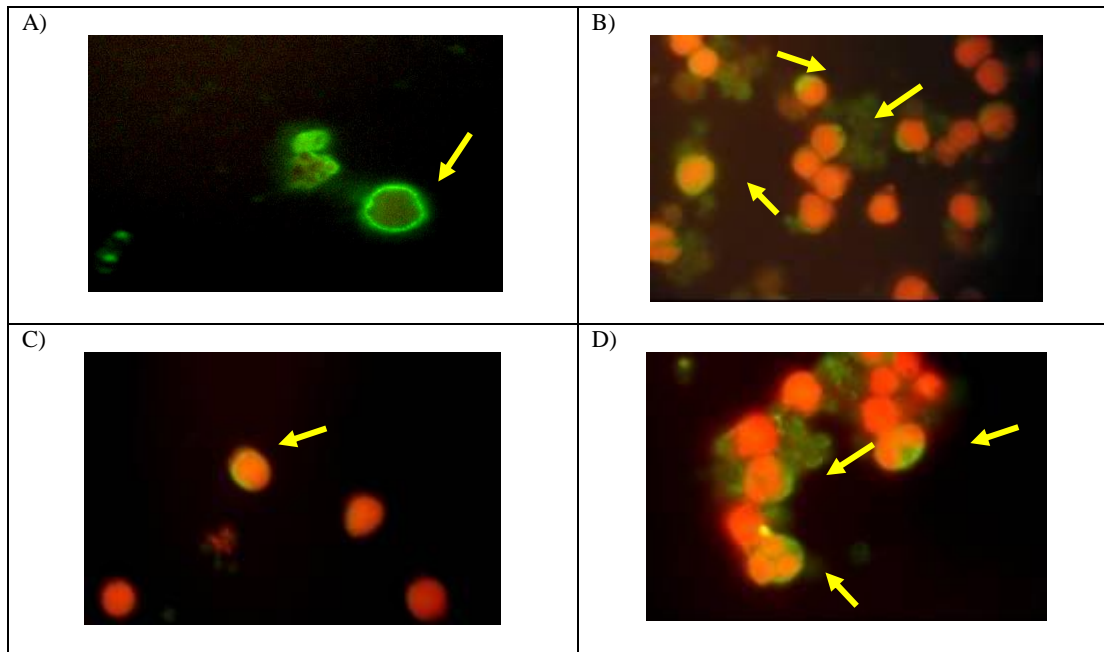


Figura 17. Linfocitos de sangre periférica de *Dasyus novemcinctus* que fueron reconocidos por los anticuerpos de ratón anti-TCR δ (A, B, C y D).

Así mismo, se realizaron observaciones de las células tanto en campo claro como en epifluorescencia para demostrar que solamente reconoce a aquellos linfocitos T con receptor δ (Figura 18).

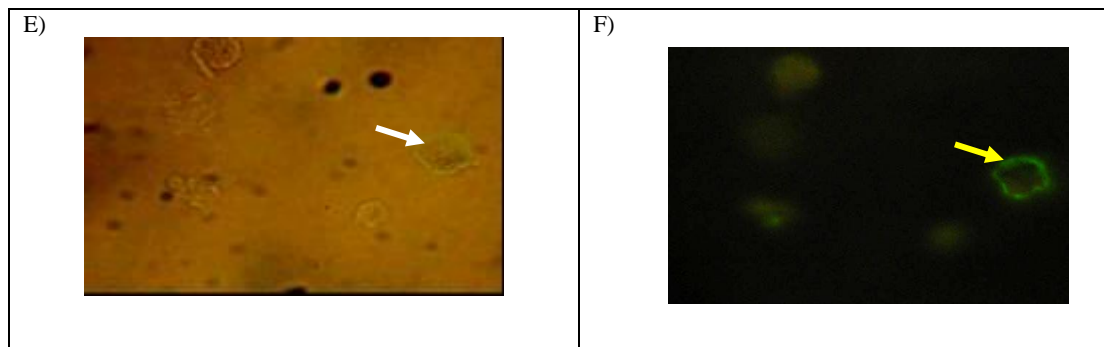


Figura 18. Observación microscópica de los linfocitos de armadillo con el receptor delta. E) Campo claro y F) Fluorescencia.

Por otro lado, en la imagen G, de la Figura 19, se presenta el ensayo en donde se utilizó el suero de animales control (inoculados con SS). En estas imágenes se puede apreciar que el suero de estos ratones no reconocen algún tipo de linfocitos del armadillo *Dasyus novemcinctus*. En la imagen H) se muestra el control que se realizó con los anticuerpos anti-inmunoglobulinas de ratón fluoresceínados que fueron utilizados para la técnica de inmunofluorescencia indirecta, estos anticuerpos no reconocieron a los linfocitos de estos animales.

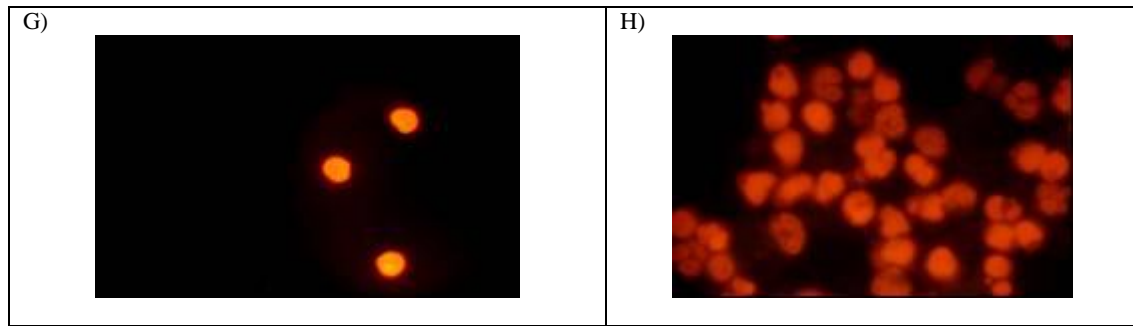


Figura 19. Linfocitos de armadillo con suero de ratones inoculados con solución salina(G) y linfocitos con anti-inmunoglobulinas totales de ratón fluoresceinados (H).

Finalmente, la cuantificación de los linfocitos de armadillo que mostraron el receptor delta fue entre un 30 y 35% de los linfocitos de sangre periférica de este mamífero.

Adicionalmente, el reconocimiento del TCR $\gamma\delta$ se llevo a cabo mediante la técnica de citometría de flujo. El porcentaje de células reconocidas por el anticuerpo anti-*d*TRDV2 reconoció entre el 30 al 35% de los linfocitos de armadillo y solamente el 1% en el caso de linfocitos humanos (Figura 20). Por el contrario el anticuerpo monoclonal anti- $\gamma\delta$ de Immunotech (Coulter, FL, USA) no reconoció ningún linfocito de *Dasypus* (0%) y entre el 5 al 8% de los humanos, que son valores de referencia para esta población en el hombre (Figura 21).

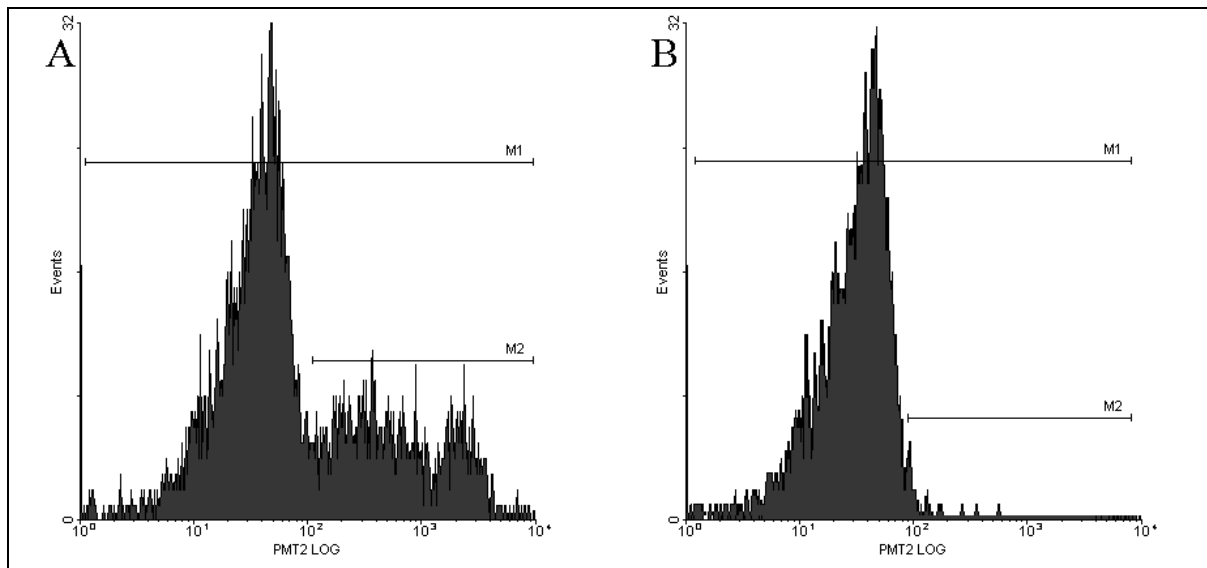


Figure 20. Cuantificación de linfocitos con el suero anti-*d*TRDV2.

Se analizaron 5000 eventos por experimento con 20 mL de suero de ratón anti-*d*TRDV2 (1:50) y anticuerpos de cabra anti-IgG-FITC de ratón (Zymed, CA, USA). A) Linfocitos de Armadillo (30.82%) y B) Linfocitos humanos(1.14%).

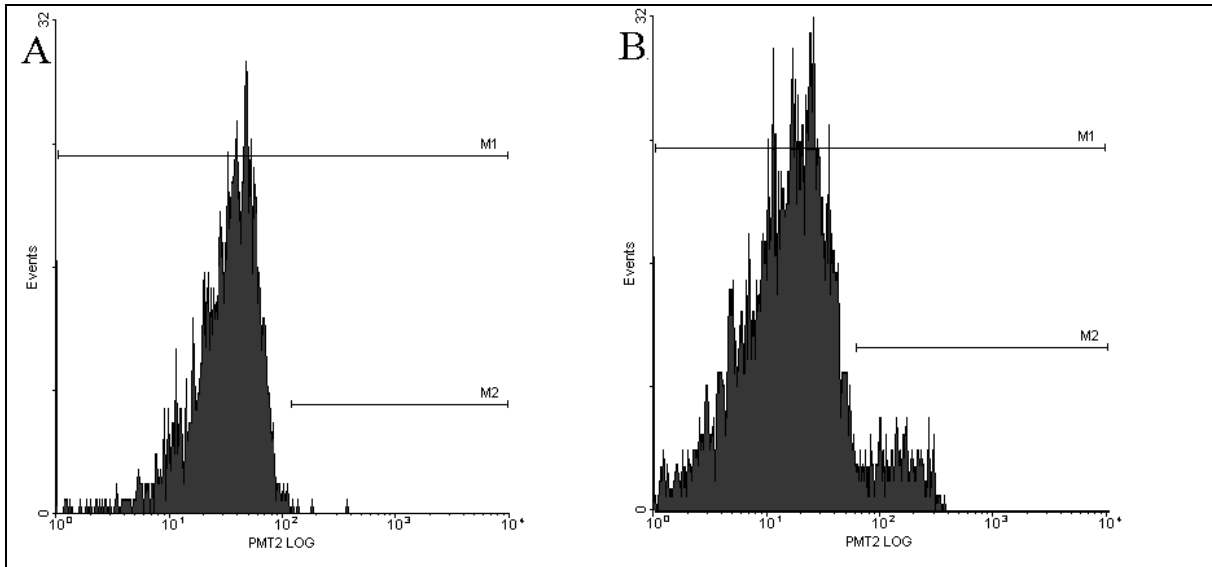


Figura 21. Cuantificación de linfocitos con anticuerpos monoclonales anti-TCR $\gamma\delta$ de humano.

Se analizaron 5000 eventos por experimento con 20 μ L de anticuerpo monoclonal anti-TCR $\gamma\delta$ (1:50) y anticuerpos de cabra anti-IgG-FITC humana (Zymed, CA, USA). A) Linfocitos de Armadillo (0.17%) y B) Linfocitos humanos (7.62%).

4. DISCUSION

Como se mencionó anteriormente los linfocitos de armadillo al igual que los de diversas especies de mamíferos expresan receptores sobre su superficie y gracias a ello se ha logrado identificar en *D. novemcinctus* a los linfocitos B. Este tipo de células varían en un 10% en su concentración en sangre periférica, por lo que el 90% de los linfocitos restantes podrían ser linfocitos T, NK o null. Debido a lo anterior, diferentes investigadores realizaron una búsqueda exhaustiva con el objeto de obtener un mecanismo efectivo que permitiera identificar a los linfocitos T, sin embargo no se lograron los resultados esperados.

Fue hasta 1997 en que Lathrop y colaboradores ⁽⁴¹⁾ mediante un panel de anticuerpos monoclonales contra antígenos humanos y murinos lograron observar reactividad sobre linfocitos de armadillo, los resultados obtenidos por estos investigadores mostraron que el anticuerpo monoclonal TCRdelta1 (anticuerpo específico para las células humanas con fenotipo TCR $\gamma\delta$) reconoció entre un 5.7% a un 15.4% de los linfocitos de sangre periférica del armadillo; así mismo, demostraron un reconocimiento de ésta estirpe celular en intestino del 14 al 26.9%, en bazo del 8.9 al 29.7%, en médula ósea del 3.9 al 10.1% y en nódulo linfoide del 2.5 al 8.7%; a la luz de este descubrimiento, Guerra-Infante y colaboradores ⁽²⁸⁾ trataron de reproducir el experimento y la posible identificación de los linfocitos de *D. novemcinctus*; para ello se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-T $\gamma\delta$ de humanos (Pharmigen y Coulther), sin embargo, los resultados obtenidos no correspondieron a lo publicado por Lathrop ya que no hubo reconocimiento de ningún tipo celular en los ensayos realizados. Las diferencias entre estos investigadores posiblemente radiquen en la especificidad del anticuerpo monoclonal que se utilizó para identificar a esta población de linfocitos, es decir que el anticuerpo monoclonal utilizado por Lathrop reconoció un epitopo diferente al utilizado por Guerra-Infante.

Con base en lo anterior, esta investigación se centro en la obtención de la proteína de superficie $\gamma\delta$ de los linfocitos T del armadillo mediante la clonación de alguno de los genes del TCR $\gamma\delta$ a un plásmido de expresión en *Escherichia coli*. El diseño de los iniciadores para identificar y amplificar el gen se basó en la homología que existe entre los genes de diversas especies de mamíferos, incluido el hombre, además de la relación filogenética que se ha encontrado con la familia de las inmunoglobulinas y la reactividad cruzada que se ha observado entre las proteínas séricas humana y del armadillo.

Al igual que las inmunoglobulinas humanas el arreglo genómico del TCR esta codificado a partir de la reordenación de segmentos génicos de tipo variable (V), de diversidad (D), de unión (J) y constantes (C) ^(73,77). Existe cuatro familias multigénicas de TCR: una para la cadena α , una para la cadena β , una para la cadena γ y otra para cadena δ , estando esta última en el mismo locus que para la familia de la cadena α ⁽⁷¹⁾. En el caso de las cadenas α y γ , estas poseen solamente segmentos V, J y C mientras que para las cadenas β y δ poseen segmentos V, D, J y C ⁽⁷¹⁾. Al contrario de las células $\alpha\beta$ el repertorio de las células $\gamma\delta$ es muy limitado con 6 genes para $V\gamma$ (1,3,4,5,8 y 9) y 3 genes para $V\delta$ (1,2 y 3) que se expresan funcionalmente ^(3,73). Sin embargo, el potencial de diversidad de los receptores generados por las células $\gamma\delta$ es mayor que el de las células T $\alpha\beta$ debido a los mecanismos de recombinación en las cadenas V(D)J, así como la inserción o deleción de nucleótidos. Este mecanismo envuelve la yuxtaposición de segmentos V, J y D (este último solamente en el caso TCR β y TCR δ) ^(44,53,77).

En los mapas genéticos se puede ver que los segmentos de la familia δ están dentro de la zona α , entre $V\alpha$ y $J\alpha$. Esto implica que una reordenación productiva de cadenas α deja fuera a toda la región δ ; es decir, que las reordenaciones de las cadenas α y δ son mutuamente excluyentes en la misma célula ⁽⁸⁾. Con base a esto, se decidió utilizar a la cadena delta como modelo para el desarrollo de los iniciadores necesarios para poder identificar al gen del receptor variable delta 2 del armadillo.

Debido a lo anterior, se concluyo que la posible estrategia para lograr el reconocimiento de los TCR $\gamma\delta$ de *D. novemcinctus* era mediante la clonación y expresión del gen del receptor variable delta 2 de linfocitos T del armadillo. Así mismo, la selección del gen *trdv2* se baso en la importancia que se ha encontrado para el fenotipo $V\gamma9V\delta2$ de las células T $\gamma\delta$ que tienen la capacidad de reconocer componentes no peptídicos fosfatados como el IPP, el cual es un ligando natural aislado de micobacterias ^(56,60); además de reconocer al DMAPP y a la GPP de origen oncológico ^(25,68). Además, las células con TCR $\gamma\delta$ exhiben una alta reactividad con los TUBag1-4, presentes en micobacterias ^(16,18). Con base a estos estudios se decidió analizar y valorar el gen *trdv2* debido a la asociación que existe entre los linfocitos $V\gamma9V\delta2$ y algunos antígenos del genero *Mycobacterium*, hecho de suma importancia ya que *M. leprae* es el agente etiológico de la lepra.

Para nuestro trabajo, fue necesario realizar un análisis exhaustivo de las secuencias reportadas para el gen *trdv2* en el NCBI ya que no existen en la actualidad información sobre el genoma de *Dasybus novemcinctus*. Se valoró al gen *hdv102s1* que codifica para el receptor variable delta 2 de linfocitos T humanos que se encuentra localizado en el cromosoma 14 (14q11.2). Dicha secuencia fue utilizada para el diseño de los iniciadores utilizados y que posteriormente amplificaron un producto de 319 pb al utilizar DNA de *D. novemcinctus*. El amplicón obtenido utilizando el DNA de armadillo nos sugiere que este producto se trate del mismo gen que en el humano (*hdv102s1*) con la misma importancia y función biológica.

La selección de la secuencia blanco para este estudio se baso en las características moleculares que poseen los TCR. Aunque la mayoría de la información publicada corresponde a los TCR $\alpha\beta$; los cuales se encuentran conformados por dos cadenas polipeptídicas distintas asociadas a polisacáridos, y que se encuentra unidas por la formación de puentes disulfuro⁽²³⁾, además, de estar relacionadas al complejo CD3 que le confiere estabilidad estructural y es la encargada de la transducción de señales hacia el interior celular⁽²³⁾. Estructuralmente los receptores T $\gamma\delta$ son muy parecidos a los TCR $\alpha\beta$, sus cadenas pueden estar o no unidas por puentes disulfuro esta característica es de suma importancia ya que al no presentar arreglos estructurales post-síntesis, facilita la clonación de cualquiera de las cadenas y su expresión en modelos procarióticos.

Como se muestra en los resultados de este trabajo se puede observar que las consideraciones teóricas del estudio *in silico* se reprodujeron al obtener un amplicon de 319 pb. Un análisis posterior, con programas de Alineamiento, realizado con secuencias para el gen *trdv2*, de diferentes especies animales, reportadas en el NCBI en contra de la secuencia del gen *dtrdv2* de armadillo, obtenida en nuestro trabajo, mostraron una homología del 87% con su contraparte humana; hecho que se confirmo al observar las relaciones filogenéticas generadas por el programa *Bioedit* que agruparon a las diferentes especies de animales en sus reinos correspondientes, en donde, la secuencia de *D. novemcinctus* se alojo en el mismo cluster que los genes de humano y de los primates *Macaca mulata* y *Aotus spp*, los cuales son también susceptibles a la infección con *M. leprae* (Figura 22).

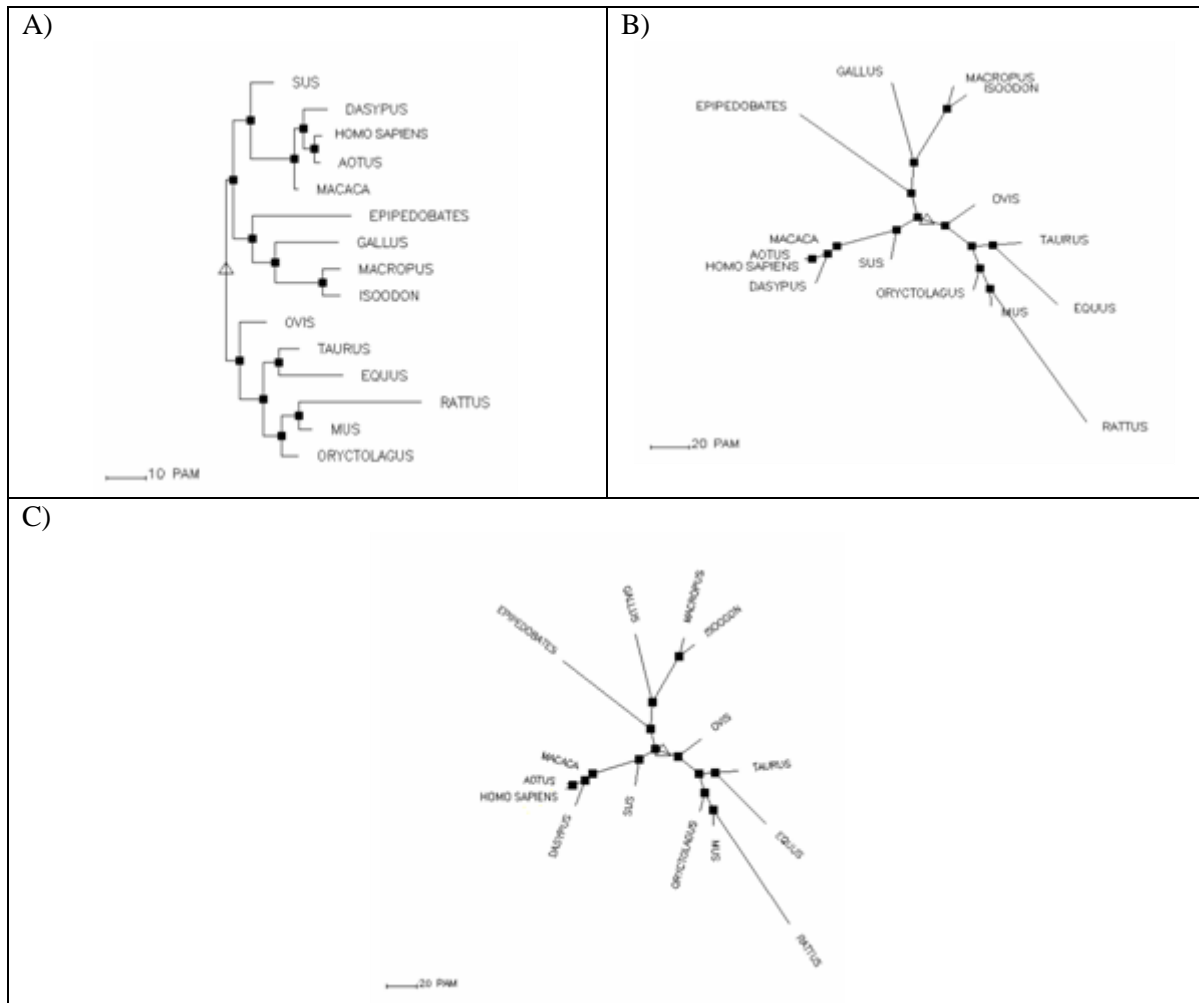


Figura 22. Construcciones filogenéticas para el gen *Trdv2* de diferentes especies animales.

Se muestra en los gráficos las asociaciones generadas por varios programas de alineación y de construcción de árboles filogenéticos a partir de las secuencias obtenidas de la base de datos del NCBI y las secuencias obtenidas experimentalmente del gen *dTrdv2* de armadillo.

- A) Asociación filogenética generada por el servidor *MultAlin*.
- B) Asociación filogenética generada por el servidor *Bioedit*.
- C) Asociación filogenética generada por el servidor *MAFFT*.

Así mismo, al determinar la secuencia aminoacídica de la proteína *dTRDV2* se observó que posee un 56.31% de homología con su contraparte humana, hecho que nos predice que posiblemente tenga la misma disposición en su estructura secundaria y terciaria. Lo anterior se ratificó al observar los modelos moleculares desarrollados por el programa *Swiss Model* en el que la alineación primaria se realizó de manera inmediata y exclusivamente con secuencias reportadas para el $TCR\gamma\delta$.

La primera estructura de baja resolución obtenida de la proteína nativa *dTRDV2* de *Dasypus novemcinctus* se puede observar en la figura 23-A. Esta proteína fue creada por homología

utilizando como plantilla a la proteína TRDV2 humana con una resolución de 2.0 Å, basándonos en las condiciones descritas por Xu y col. ⁽⁷⁸⁾. La plantilla o molde de alineación fue elegido tras un minucioso análisis del grado de homología entre las proteínas TRDV2 de varios vertebrados que se encuentran reportadas en el Protein Data Bank. La secuencia de aminoácidos de la proteína de armadillo fue alineada con el programa *Swiss-Model*; los resultados obtenidos mostraron un alto grado de homología de la proteína de *D. novemcinctus* cuando se comparó con la estructura cristalina del receptor de células T Vgamma9/Vdelta2 humano (PDB:1hxm, Figura 23-C).

La estructura de la proteína de armadillo se analizó con *PdbViewer* y fue refinada con el programa 96 GROMOS 43b1 bajo una constante dieléctrica de 81.04 para el agua y de 4.0 para a proteína. El análisis de la estructura mostró que ambas proteínas presentan 8 laminas beta pero con 3 diferencias en su longitud que podría ser la explicación del no reconocimiento por parte de los anticuerpos monoclonales anti-TCR $\gamma\delta$ contra el TCR humano. La primera diferencia se encuentra en la región comprendida entre Val18 a Val22 lo que resulta a una menor extensión de la lamina beta para TRDV2 de armadillo. Así mismo, en la TRDV2 humana se presenta una alfa hélice en la posición Gln68 a Ser69. Finalmente, la tercera diferencia se encuentra ubicada en los residuos Ser77 en donde la lamina beta de la proteína de armadillo esta más extendida que la humana (Figura 23-B).

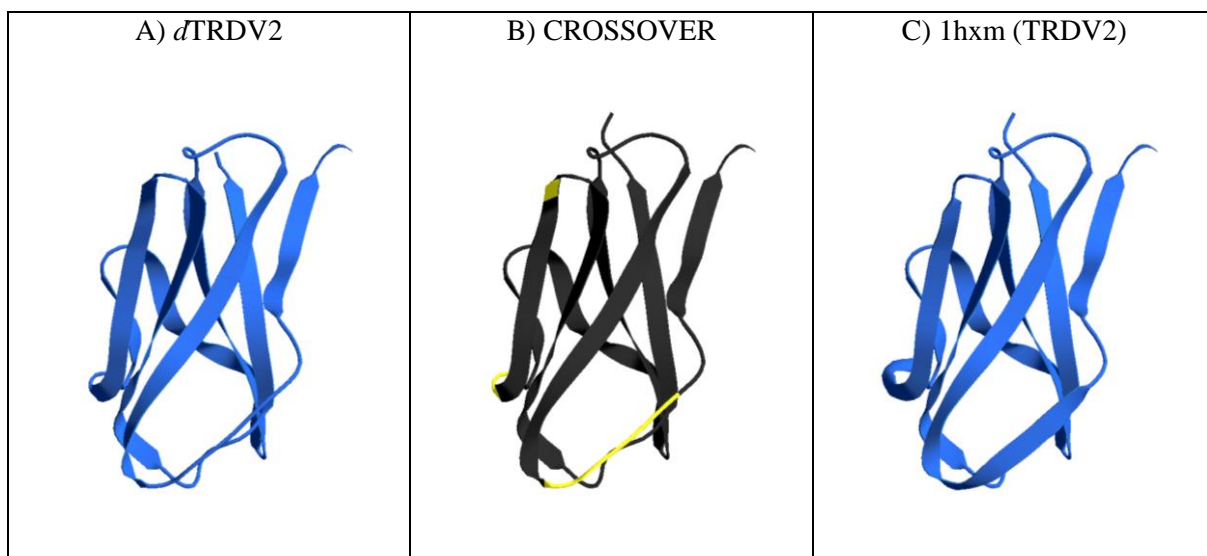


Figura 23. Modelos tridimensionales de la proteína *d*TRDV2 y 1hxm.

Se muestra los modelos generados por el programa *Swiss model* para la proteína *d*TRDV2 obtenida en este trabajo y 1hxm obtenida de PDB (A y C, respectivamente). Además se puede observar en B) las diferencias entre ambos modelos. Los cuales se encuentran marcados en amarillo

Las diferencias encontradas en ambos modelos pueden sugerir y explicar el comportamiento cuando se ha tratado de reconocer a este tipo de moléculas con anticuerpos monoclonales como en el caso de Lathrop y Guerra-Infante^(28,41). El cambio en la estructura secundaria en ambas proteínas puede intervenir en el reconocimiento específico de los anticuerpos utilizados. Sin embargo al incluir el modelo obtenido experimentalmente en el modelo propuesto para el TCR $\gamma\delta$ no se observaron modificaciones estructurales significativas (Figura 24) lo que sugiere que la proteína recombinante puede poseer la misma actividad dentro del receptor como su contraparte humana.

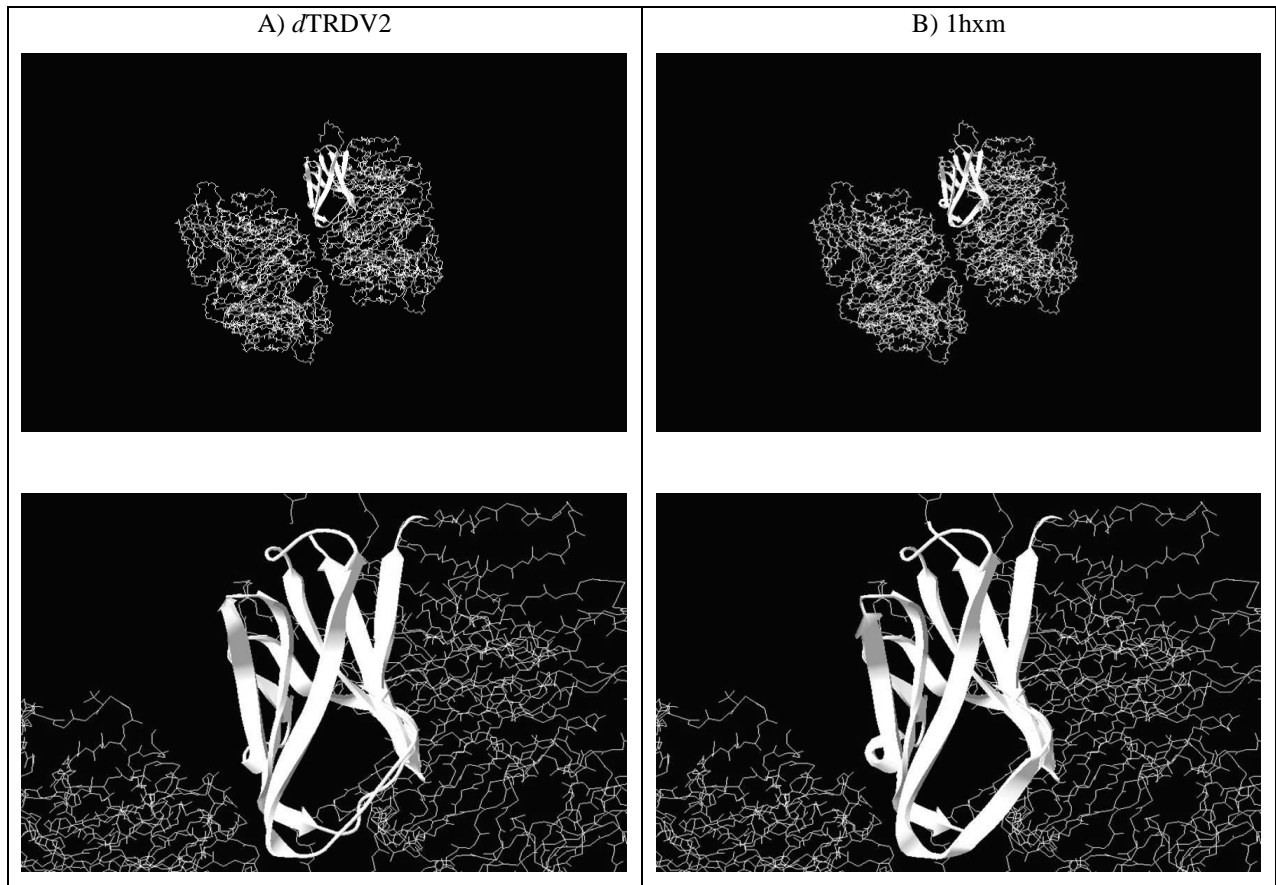


Figura 24. Modelos tridimensionales de la proteína *dTRDV2* y *1hxm* incluidos en el modelo completo del receptor T $\gamma\delta$. Se muestra los modelos generados por el programa *Swiss model* para la proteína *dTRDV2* y *1hxm* acopladas al receptor T $\gamma\delta$ humano.

Con los resultados experimentales y los datos del análisis *in silico* mostrados anteriormente se puede presumir que la proteína obtenida a partir de la clonación y expresión del material génico de armadillo se trata del segmento variable delta 2 del TCR $\gamma\delta$. Así mismo, se puede observar que la estructura teórica de la proteína para *dTRDV2* es estable estereoquímicamente, ya que el estudio de las representaciones de Ramachandran (Figura 25) mostraron que el 97.08% de los aminoácidos que la componen se encuentran en las regiones más favorables (80.58% en regiones favorables, 16.50% en regiones permitidas y solo el 2.91% en regiones comprometidas). Estos valores de rotación ψ que permiten definir la estructura secundaria de la proteína son muy similares a los presentados por el modelo 1hxm (94.17% en regiones favorables, 14.56% en regiones permitidas y 5.82% en regiones comprometidas).

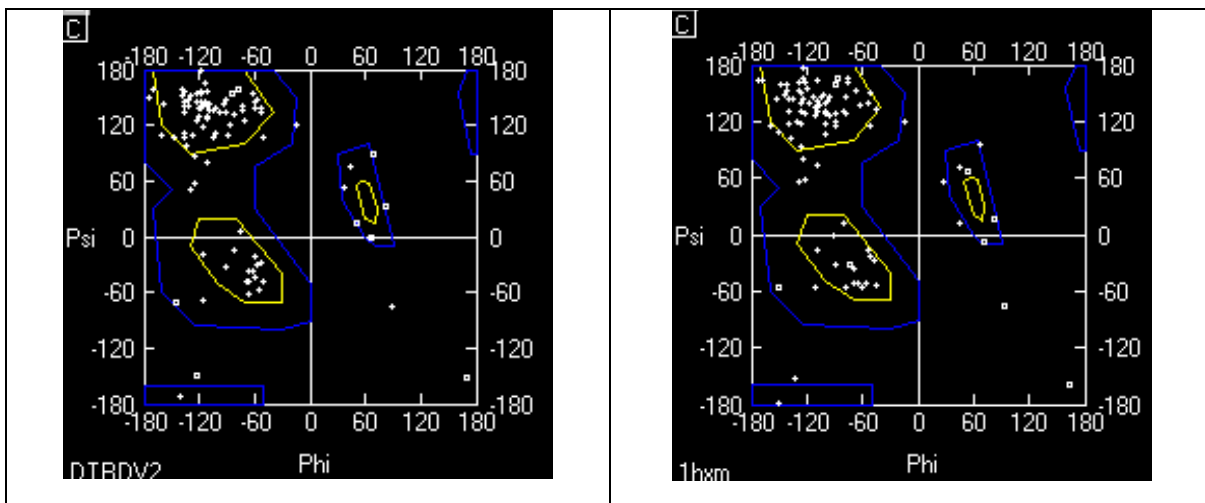


Figura 25. Representación de Ramachandran generada por el programa Swiss-PdbViewer. El análisis de rotación de los enlaces entre aminoácidos y la probable estructura secundaria son descritos en la figura. Se puede observar que la proteína *dTRDV2* presenta un 96.65% de sus conformaciones en regiones favorables al igual que 1hxm con un 94.17%, lo que permite en ambas una estabilidad estereoquímica.

La conservación observada que se presenta en los genes *dtrdv2* y *hdv102s1* y sus productos podría estar relacionada o influir de manera importante en la susceptibilidad hacia la infección por *M. leprae*, como sucede en algunas otras enfermedades bacterianas y antígenos de tipo HLA⁽³⁰⁾, o comprometer la identificación del agente etiológico, y por lo tanto, la respuesta inmune del huésped.

Como se mencionó anteriormente las células T $\gamma\delta$ no solo se encuentran en tejidos como las mucosas sino también en áreas importantes como la piel, en donde se ha observado que en los periodos fetales las células dendríticas poseen este tipo de receptores, además, de que son las únicas

células capaces de activar a linfocitos T inmaduros promoviendo su desarrollo y funcionalidad ^(7,10). La función y la especificidad de las células T que llevan el TCR $\gamma\delta$ es aun poco conocida ^(9,32). Se ha encontrado que la subpoblación de linfocitos T $\gamma\delta$ se encuentra asociada al epitelio intestinal en ratones ^(9,32) y en otras especies, tal como en el humano ⁽²⁶⁾, pollo ⁽¹³⁾, y ovejas ⁽³³⁾. Los linfocitos T $\gamma\delta$ intraepiteliales en el intestino (i-IEL) son timo dependientes ^(6,29) y muchas de estas células expresan la región variables de la cadena γ (V γ 9) ⁽⁶⁶⁾ junto con el homodimero $\alpha\alpha$ del marcador de superficie CD8 ^(6,31). Recientemente, se ha propuesto que debido a su relación y número de población en intestino, las i-IEL desempeñan un papel importante como primera línea de defensa contra microorganismos por destrucción de las células infectadas ⁽³⁷⁾, fenómeno que se puede presentar en todos aquellos tejidos en donde estén presentes las células T $\gamma\delta$. Sin embargo, actualmente, no existe evidencia que apoye esta hipótesis, y el papel biológico de las i-IEL sigue siendo desconocido.

En algunas enfermedades que afectan la piel como es el caso de la lepra, la participación de este tipo celular podría tener un papel relevante actuando en la inmunorregulación de la respuesta inmune y en el control de la infección por *M. leprae*. Actualmente el rol del sistema inmune durante esta infección no ha podido ser revelado aun cuando se tiene como modelo experimental al armadillo de nueve bandas, esto se debe a que ha sido imposible identificar a las poblaciones de linfocitos T en tejidos y en sangre periférica. Es por ello, que el estudio de las poblaciones de linfocitos de armadillo puede ser un precedente importante para conocer la biología y funcionalidad de la respuesta inmune es este animal que permitiría en un futuro sentar las bases de los mecanismos de patogenicidad en algunos padecimientos como en la enfermedad de Hansen.

Los experimentos que han recurrido al uso de anticuerpos para la identificación y fijación de las células T *in vivo* han presentado problemas importantes para mantener los niveles de detección de los linfocitos. Analizando los resultados de ambos trabajos nos podría indicar que los epítopes o determinantes antigénicos, que reconocen los anticuerpos monoclonales comerciales utilizados, son diferentes a los que presentan los TCR de las células T $\gamma\delta$ del armadillo y por lo tanto es imposible reproducir los resultados anteriormente citados. Esta posible hipótesis se puede comprobar de manera teórica al determinar *in silico* los probables sitios o regiones antigénicas en ambas proteínas. Al utilizar el programa *Antigenic program* del Instituto Pasteur (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/antigenic.html>) nos mostró que dTRDV2 presenta tres regiones altamente antigénicas en comparación con TRDV2 que solo posee dos.

Lo significativo de este estudio es que aunque comparten regiones antigénicas tanto la proteína de armadillo como humana existen marcadas diferencias entre sí. En los epitopos 1 y 5 comparten el mismo aminoácido central (Leu84) pero los residuos adyacentes difieren en un 50%. Así mismo, en los epitopos 2 y 3 el aminoácido central es diferente (Ser21 para TRDV2 y Thr19 para *d*TRDV2) con una homología del 45% en las secuencias adyacentes (Tabla 11). Estos datos nos indican que la posible explicación en la nula identificación de los TCR $\gamma\delta$ de *Dasypus* se debe a la diferencia significativa en sus probables epitopos en comparación con el TCR humano.

Tabla 11. Probables regiones antigenicas para las proteínas *d*TRDV2 y TRDV2 obtenidas mediante el método descrito por Kolaskar y Tongaonkar.

Proteínas	Epitope	Secuencia	Posición	Longitud	Score
TRDV2	1	AKNLAVLKILAP	78-89	12	1.183
	2	GVMSAIELVPEHQTVPVSI G V P ATLRCS	4-31	28	1.179
<i>d</i> TRDV2	3	IAMSAIELVLDTHVV T VTVGKSVTLKCS	4-31	28	1.208
	4	SY Y CAC	96-101	6	1.172
	5	RGSVYSSNNLAVL E IREA	72-89	18	1.118

Otra posible hipótesis en la que se puede pensar es que el anticuerpo que se une al TCR $\gamma\delta$ puede activar a las células T $\alpha\beta$ provocando la liberación de citocinas y por tanto generando una respuesta inmunomoduladora ⁽³⁷⁾; este fenómeno involucraría la neutralización de los anticuerpos utilizados *in vivo* o *in vitro* o modificar la activación de otras subpoblaciones celulares que terminaría con el desplazamiento de las células T $\gamma\delta$, lo que podría explicar los resultados encontrados por Guerra-Infante y Lathrop.

El uso de anticuerpos para identificar a las poblaciones celulares no es nuevo, pero los resultados publicados por varios autores no han podido cuantificar a los linfocitos T. Por lo tanto, nuestro objetivo de generar una proteína recombinante (*dtrdv2*) fue principalmente para la obtención de anticuerpos que nos permitieran la identificación de los TCR expresados en la superficie de las células T $\gamma\delta$. La línea de trabajo propuesta arrojó que el 35% de los linfocitos T de sangre periférica de *D. novemcinctus* expresan el receptor T $\gamma\delta$. Estos resultados fueron obtenidos mediante el conteo de las células mononucleares de armadillo que mostró el fenotipo $\gamma\delta$ en sus TCR de superficie celular utilizando la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Resultados que no son nada sorprendidos ya que se conoce que en algunos animales como son los rumiantes y suinos presentan linfocitos T $\gamma\delta$ en un 45 y en un 50% respectivamente ^(33,41), sugiriendo estos resultados de que se trate de células T $\gamma\delta$ tal y como sucede en otras especies incluyendo al humano.

Así mismo, se conoce que la respuesta inmune adquirida se sustenta principalmente en la capacidad de los linfocitos T para reconocer y discriminar entre una amplia gama de diferentes antígenos. Como sucede en los linfocitos B, la enorme diversidad del repertorio de células T se determina por la capacidad para arreglar y modificar los genes que codifican sus receptores de antígeno. Una apreciación de la estructura y función del TCR es esencial para comprender el desarrollo de la célula T y sus complejidades de las respuestas de estas células maduras con el antígeno. Desafortunadamente, no se ha podido identificar a los linfocitos T de armadillo como ha sucedido con las células humanas. Los linfocitos T de humanos han sido identificados por diversas proteínas de superficie como el receptor para eritrocitos de carnero (actualmente denominado como CD2) o los marcadores CD3, CD4, CD8 que reconocen linfocitos T totales, T cooperadores y T citotóxicos, sin embargo en el armadillo no se ha logrado identificar a las células homólogas a estos linfocitos ya sea mediante el uso de técnicas convencionales o el uso de anticuerpos por medio de ensayos de ELISA y/o citometría de flujo ^(28,41).

Los resultados generados en este trabajo indican que el protocolo propuesto para realizar la identificación y reconocimiento de células que expresan el TCR $\gamma\delta$ es adecuado; y que con algunas modificaciones se puede perfeccionar para lograr una mayor expresión de la proteína recombinante, y con ello, la obtención de títulos más elevados de anticuerpos anti-*dtrdv2* que permitan realizar estudios de citometría de flujo para corroborar los porcentajes de las poblaciones de linfocitos en sangre periférica obtenidos en este trabajo, así como también, la identificación de los linfocitos T $\gamma\delta$ en diferentes tejidos mediante técnicas histopatológicas.

Aunque existen trabajos que han descrito de manera relativa las poblaciones de linfocitos en armadillo, estos no han podido ser reproducibles debido principalmente a que los anticuerpos anti-TCR $\gamma\delta$, utilizados para marcar a las células mononucleares, están dirigidos contra epítomos de moléculas humanas y de ratón, Por lo tanto este trabajo da un precedente inmediato y eficaz que no solo compromete el estudio del sistema inmune de *D. novemcinctus* sino que permitiría profundizar en la relación huésped-parásito que se genera durante la infección por *M. leprae* y a la vez se suma al esfuerzo de otros investigadores que han tratado de abordar el estudio de la inmunología del armadillo mediante el uso de las técnicas de biología molecular ^(21,55,70). Esperando que los datos que se generen puedan llegar a explicar el mecanismo de patogenicidad en la enfermedad de la lepra y el comportamiento de la respuesta inmune en el hombre.

5. CONCLUSIONES

- Los iniciadores trdv2-f y trdv2-r diseñados en este trabajo reconocen la región variable delta 2 del receptor de linfocitos T (*dtrdv2*) de *Dasypus novemcinctus* y producen un amplificado de 319 pb.
- Las secuencias hdv102s1 de humano y *dtrdv2* de *Dasypus novemcinctus*, tienen una homología nucleotídica experimental del 87% y aminoacídica teórica del 56.31%, lo que ratifica su estrecha relación y con la familia de los TCR e inmunoglobulinas.
- La proteína *dTRDV2* recombinante de 11,252.82 Da (12 kDa), con propiedades antigénicas, se expresó en células de *Escherichia coli JM109*.
- En el análisis *in silico* se encontró que la proteína *dTRDV2* es homóloga a la proteína humana en su estructura secundaria (1hxm), estable esteroquímicamente y que además comparten dos regiones antigénicas similares pero que difieren de su sitio activo, hecho que explica la diferencia en su reconocimiento por anticuerpos anti-TCR $\gamma\delta$.
- Los anticuerpos anti-*dTRDV2* reconocen, de manera específica, linfocitos que presentan el receptor celular T δ .
- El 30.82% de la población total de leucocitos en sangre periférica de *Dasypus novemcinctus* pertenecen a la estirpe con TCR δ .

6. REFERENCIAS

- 1 Alexander Steinle, Veronika Groh, Thomas Spies. 1998. Diversification, expression, and $\gamma\delta$ T cell recognition of evolutionarily distant members of the MIC family of major histocompatibility complex I-related molecules. *PNAS*. 95:12510-12515.
- 2 Amezcua M. E., V. Cazares, A. Escobar-Gutierrez. El armadillo *Dasypus novemcinctus* como modelo experimental en la lepra. *Segundo Congreso Nacional de Immunología*. México. 200-229.
- 3 Arden B., J. L. Klotz G. Siu, L. E. Hood. 1985. Diversity and structure of genes of the a family of mouse T-cell antigen receptor. *Nature* 316:783-787.
- 4 Arden B., Clark S. P., Kabelitz D., Mark T. W. 1995. Mouse T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics*, 42:501-530.
- 5 Assali G., Di Dio L. J. The lymphatic system of *Dasypus novemcinctus* and *Dasypus sexcinctus*. *J. Morph.*, 117: 49-72.
- 6 Bandeira A., Itohara S., Bonneville M., Burlen-Defrannoux O., Mota-Santos T., Coutinho A., Tonegawa S. 1991. Helper T cell growth requirements: role of growth factors and specific clonal recognition. *PNAS*. 88: 43-47.
- 7 Befus A. D., Dyck N., Goodacre R., Bienenstock J. 1987. Mast cells from the human intestinal lamina propria. *J. Immunol.* 138:2604-2610.
- 8 Bernard K., Wehrly T. D., Sleckman B. P. 2005. Chromosomal excision of TCR δ chain genes is dispensable for $\alpha\beta$ T cell lineage commitment. *Inter Immunol*, 17 (3):225-232.
- 9 Blustone J. A., Corn R. Q., Barret T. A., Houlden B., Sperling A. I., Dent A., Hedrick S., Rellahan B., Matis L. A. 1991. Peripheral T cell receptor gamma delta variable gene repertoire maps to the T cell receptor loci and is influenced by positive selection. *Immuol. Rev.* 120: 5-33.
- 10 Borivant M., Fuss I., Fiocchi C., Klein J. S., Stong S.A., Strober W. 1996. Hypoproliferative human lamina propria T cells retain the capacity to secrete lymphokines when stimulated via CD2/28 pathways. *Proc. Assoc. Am. Physicians.* 108: 55-67.
- 11 Böyum A. 1966. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21: 77-81.
- 12 Böyum A. 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Seppl.* 97: 77-89.

- 13 Bucy R. P., Chen C. L., H., Cihak J., Losch U., Cooper M. D. 1988. Avian T cells expressing gamma delta receptors localize in the splenic sinusoids and the intestinal epithelium. *J. Immunol.* 141: 2200-2205.
- 14 Burk M. R., Mori L., De Libero G. 1995. Human V γ 9V δ 2 cells are stimulated in a cross-reactive fashion by a variety of phosphorylated metabolites. *Eur. J. Immunol.* 25:2052-2058.
- 15 Chien Y. H., Iwashima M., Kaplan K. B., Elliott J. F., Davis M. M. 1987. A new T-cell receptor gene located within the α locus and expressed early in T-cell differentiation. *Nature.* 327:677.
- 16 Constant P., Davodeau F., Peyrat M. A., Poquet Y., Puzo G., Bonneville M., Fournie J.J. 1994. Stimulation of human $\gamma\delta$ T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science.* 264 (5156):267-270.
- 17 Craig H. Bassing, Robert E. Tillman, Barbara B. Woodman, David Canty, Robert J. Monroe, Barry P. Sleckman, Frederick W. Alt. 2003. T cell receptor (TCR) locus enhancer identity and position are critical for the assembly of TCR and variable region genes. *PNAS*, 100, No. 52, 598-603.
- 18 De libero G. 1997. Sentinel function of broadly reactive human $\gamma\delta$ T cells. *Immunol Today.* 18:22-26.
- 19 Espitia C., Sciutto E., Bottasso O., González-Amaro R., Hernández-Pando R., Mancilla R. 1992. High antibody levels to the mycobacterial fibronectin-binding antigen of 30-31 kDa in tuberculosis and lepromatous leprosy. *Clin. Exp. Immunol.* 87:362-367.
- 20 Fisch P., Malkovsky M., Kovats S., Sturm E., Braakman E., Klein B. S., Voss S. D., Morrissey L. W., DeMars R., Welch W. J. 1990. Recognition by human V γ 9V δ 2 T cells of a GroEL homolog on Daudi Burkitt's lymphoma cells. *Science.* 250: 1269-1273.
- 21 Flores-Medina, S., Díaz-García, F. J., Guerra-Infante, F. M. 2009. Secuenciación de un fragmento de ADNc homólogo a interleucina-1 alfa humana derivado de leucocitos de armadillo (*Dasypus novemcinctus*). *Rev. Vet. Mex.* 39 (3); 341-347.
- 22 Gallagher M., Obeid P., Marche P. N., Jouvin-Marche E. 2001. Both TCR α and TCR δ Chain Diversity Are Regulated During Thymic Ontogeny. *J. Immunol.* 167: 1447-1453.
- 23 Gallagher M., S. Candeias, C. Martinon, E. Borel, M. Malissen, P. N. Marche, E. Jouvin-Marche. 1998. Use of TCR ADV gene segments by the δ -chain is independent of their position and of CD3 expression. *Eur J. Immunol.* 28:3878-3885.
- 24 Gary W. Litman, John P. Cannon, Larry J. Dishaw. 2005. Reconstructing immune phylogeny new perspectives. *Nature. Review.* 5:866-879.

- 25 Gober H. J., Kistowska M., Angman L., Jenö P., Mori L., De Libero G. 2003. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J. Exp. Med.* 197:163-168.
- 26 Groh V., Porcelli S., Fabbi M., Lanier L. L., Picker L. J., Anderson T., Warnke R. A., Bhan A. K., Strominger J. L., Brenner M. B. 1989. Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J. Exp. Med.* 169: 1277-1294.
- 27 Guerra-Infante F. M., Lopez-Hurtado M., Flores-Medina S., Zamora-Ruiz A., De Haro-Cruz Ma. J., 2001. Detection of a tumor necrosis factor like activity in culture supernatants of armadillo leukocytes. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.*, 69:354-357.
- 28 Guerra-Infante F., Quezada P. F., Estrada P. S., Santos A. L. 1996. "Evolution of lymphocytes populations in armadillos (*Dasyus novemcinctus*) inoculated with *M. leprae*." *Int J. Lepr*, 64, 152-158.
- 29 Guy-Grand D., Cerf-Besussan N., Malissen B., Malassis-Seris M., Briottet C., Vassalli P. 1991. Two gut intraepithelial CD8+ lymphocyte populations with different T cell receptors: a role for the gut epithelium in T cell differentiation. *J. Exp. Med.* 173: 471-481.
- 30 Hans-Jürgen G., M. Kistowska, L. Angman, P. Jenö, L. Mori, G. de Libero. 2003. Human T cell receptor, receptor cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J. Exp Me*, 197, No. 2, 163-168.
- 31 Haregewoin A., Soman G., Hom R. C., Finberg R.W. 1989. Human gamma delta+ T cells respond to mycobacterial heatshock protein. *Nature*. 340:309-312.
- 32 Haas W., Pereira P., Tonegawa S. 1993. $\gamma\delta$ T cells. *Ann. Rev. immunol.* 11: 625-673.
- 33 Hein W. R., Mackay C. R. 1991 Prominence of T cells in the ruminant immune system. *Immunol. Today*. 12: 30-34.
- 34 Ito K., Bonneville M., Takagaki Y., Nakanishi N., Kanagawa O., Krecko E. G., Tonegawa S. 1989. Different $\gamma\delta$ T-cell receptors are expressed on thymocytes at different stages of development. *PNAS* 86(2):631-635.
- 35 Itohara S., Nakanishi N., Kanagawa O., Kubo R., Tonegawa S. 1989. Monoclonal antibodies specific to native murine T-cell receptor $\gamma\delta$ analysis of $\gamma\delta$ cells during thymic ontogeny and in peripheral lymphoid organs. *PNAS* 86: 5094-5098.
- 36 James S. P., Kiyono H. 1999. Gastrointestinal lamina propria T cells. In P. Ogra (Ed) *Mucosal Immunol, Academia Press*. 381-397.
- 37 Janeway C. A., Jr. Jones, B., Hayday A. 1988. Specificiy and function of T cells bearing gamma delta receptors. *Immunol Today*. 9: 73-76.

- 38 Jouvin-Marche E., Aude-Garcia C., Candeias S., Borel E, Hachemi-Rachedi S., Gahery-Segard H., Cazenave P. A., Marche P. N. 1998. Differential chronology of TCRADV2 gene use by α - and δ -chains of the mouse TCR. *Eur. J. Immunol*, 28(3):818-827.
- 39 Kirchheimer W. F., Storrs E. E. 1971. Attempts to establish the armadillo (*Dasyus novemcinctus*) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. *Int. J. Leprosy*. 39: 693-701.
- 40 Kirkham P. A., Takamatsu H-H, Parkhouse R. M. E. 1997. Growth arrest of $\gamma\delta$ T cells induced by monoclonal antibody against WC1 correlates with activation of multiple tyrosine phosphatases and dephosphorylation of MAP kinase erk2. *Eur. J. Immunol*. 27:717-725.
- 41 Lathrop G., Scollard D. M., Dietrich M. 1997. "Reactivity of a population of armadillo lymphocytes with an antibody to human t-cells". *Clin immunol*, 82(1): 68-72.
- 42 Lefrancois L., Puddington L. 1999. Basic aspects of intraepithelial lymphocyte immunobiology. Ogra P.L. (Ed). *Mucosal Immunol., Academic Press*. 413-428.
- 43 Lewis J. H., Doyle A. P. 1964. Coagulation protein and cellular studies on armadillo blood. *Compu Biochem, Physiol*. 64:183-192.
- 44 Lewis S. M. 1994. The mechanism of V(D)J joining: lessons from molecular, immunological, and comparative analyses. *Adv Immunol*, 56:27-150.
- 45 Li B., Rossman M. D., Imir T., Oner-Eyuboglu A. F., Lee C. W., Biancaniello R., Carding S. R. 1996. Disease-specific changes in $\gamma\delta$ T cell repertoire and function in patients with pulmonary tuberculosis. *J. Immunol*. 157:4222-4229.
- 46 London S. D., Rubin D. H., Cebra J. J. 1987. Gut mucosal immunization with reovirus serotype I/L stimulates virus-specific cytotoxic T cell precursors as well as IgA memory cells in Peyer's patches. *J. Exp. Med*. 165:830-847.
- 47 Mackay C. R., Hein W. R. 1989. A large proportion of bovine T cells express the $\gamma\delta$ T cell receptor and show a distinct tissue distribution and surface phenotype. *Int. Immunol*. 1:540-545.
- 48 Mackay C. R., Maddox J. F., Brandon M. R. 1986. Three distinct subpopulations of sheep T lymphocytes. *Eur J. Immunol*. 16:19-25.
- 49 Michele C. Kieke, Eric V. Shusta, Eric T. Boder, Luc Teyton, K. Dane Wittrup, David M. Kranz. 1999. Selection of functional T cell receptor mutants from yeast surface-display library. *PNAS*, 96: 5651-5656.
- 50 Morrison W. I., Davis W. C. 1991. Differentiation antigens expressed predominantly on CD4-CD8- T lymphocytes (WC1, WC2). *Vet. Immunol. Immunopathol*. 27:71-76.

- 51 Myriam Capone, Richard D. Hockett Jr, Albert Zlotnik. 1998. Kinetics of T cell receptor β,γ and δ rearrangements during adult thymic development: T cell receptor rearrangements are present in CD44 CD25 pro T thymocytes. *PNAS*, 95: 12522-12527.
- 52 Noëlle Mathieu, William M. Hempel, Salvatore Spicuglia, Christophe Verthuy, Pierre Ferrier. 2000. Chromatin remodeling by the T cell receptor (TCR) B gene enhancer during early t cell development implications for the control of TCR β locus recombination. *J. Exp Med*, 192(5): 625-636.
- 53 P. Lauzurica, Xiao-Ping Zhong, M. S. Krangel, J. L. Roberts. 1997. Regulation of T cell receptor δ gene rearrangement by CBF/PEBP2. *J. Exp Med*, 185(7): 1193-1201.
- 54 Pechhold K., Wesch D., Schondelmaier K. D. 1994. Primary activation of V γ 9-expressing $\gamma\delta$ T cells by *Mycobacterium tuberculosis*. Requirement for Th1-type CD4 T cell help and inhibition by IL-10. *J. Immunol.* 152:4984-4992.
- 55 Peña M. T., Adams J. E., Adams L. B., Gillis T.P., Spencer J.S., Krahenbuhl J. L., Truman R. W. 2008. Expression and characterization of recombinant interferon gamma (IFN-gamma) from the nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*) and its effect on *Mycobacterium leprae*-infected macrophages. *Cytokine*, 43(2):124-31.
- 56 Poupot M., Fournie J. J. 2004. Non-peptide antigens activating human V γ 9V δ 2 T lymphocytes. *Immunol Lett.* 95:129-138.
- 57 Purtilo D. T., Walsh G. P, Storrs E. E., Gannon C. 1975. The immune system of the nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*, Linn). *Anat. Rec.*, 181: 725-733.
- 58 Rajasekar R., Sim G., Augustin A. 1990. Self heat shock and $\gamma\delta$ T-cell reactivity. *PNAS*. 87:1767-1771.
- 59 Ringuelet R. 1970. Fauna latinoamericana. Ed. Noguera, Barcelona. 50-62.
- 60 Rojas R. E., Torres M., Fournie J. J., Harding C. V., Boom W. H. 2002. Phosphoantigen presentation by macrophages to mycobacterium tuberculosis-reactive V γ 9V δ 2 cells: modulation by choloquine. *Infect. Immunol.* 70: 4019-4027.
- 61 Rook G., Steele J., Umar S., Dockrell H. M. 1985. A simple method for the solubilisation of reduced NBT, and its use as colorimetric assay for activation of human macrophages by Interferon- γ . *J. immunol Methods.* 82(19): 161-167.
- 62 Santos-Argumedo L, Guerra-Infante F, Posadas-Lopez A, Quesada-Pascual F, Estrada-Parra S. 1995. Immune response of armadillos (*Dasypus novemcinctus*). I. Use of lectins to identify lymphocyte subpopulations and to evaluate cell proliferation. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 63(4): 546-51.

- 63 Santos-Argumedo L, Guerra-Infante F, Quesada-Pascual F, Estrada-Parra S. 1995. Identification and purification of armadillo (*Dasybus novemcinctus*) immunoglobulins: preparation of specific antisera to evaluate the immune response in these animals. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 63 (1): 56-61.
- 64 Snider D. E., Raviglione M., Kochi A. 1994. Global burden of tuberculosis. In: Bloom B. R. ed. Tuberculosis pathogenesis, protection, and control. Washington, D. C. *ASM Pres pp* 3-11.
- 65 Storrs E. E. 1971. The nine band armadillo: a model for leprosy and other biomedical research. *Int. J. Leprosy.* 39: 703-714.
- 66 Takagaki Y., DeCloux A., Bonneville M., Tonegawa S. 1989. Attributes of $\gamma\delta$ intraepitheliallymphocytes as suggested by their transcriptional profile. *Nature (London).* 339: 712-714.
- 67 Takamatsu H.-H., Kirkham P. A., Michael R., Parkhouse E. 1997. A $\gamma\delta$ T cell specific surface receptor (WC1) signaling G0/GT cell cycle arrest. *Eur J. Immunol.* 27:105-110.
- 68 Tanaka Y., Morita C.T., Nieves E., Brenner M. B., Bloom B. R., 1995. Natural and synthetic nonpeptide antigens recognized by human $\gamma\delta$ T cells. *Nature.* 375:155.
- 69 Tanaka Y., Sano S., Nieves E., De Libero G., Rosa D., Modlin R. L., Brenner M. B., Bloom B. R., Morita C. T. 1994. Nonpeptide ligands for human $\gamma\delta$ T cells. *Immunol Today.* 91:8175-8179.
- 70 Thierry-Pascal B., Vivien H., Nicolas P. I., Fatena B., Denys C., Marie-Paule L., Jouvin-Marche E., Marche P. N., Demongeot J. 2006. IMGT/GeneInfo: T cell receptor gamma TRG and delta TRD genes in database give access to all TR potential V(D)J recombinations. *BMC Bioinformatics,* 7:224-231.
- 71 Van Dyjk M. A., Jong W. W., 2000. *Cabassous unicinctus* parcial tumor necrosis factor precursor, exon 1. Partial cds. Genbank. Cited 2006. accession number AJ286829.
- 72 Walcheck B., Watts G., Jutila M. A. 1993. Bovine $\gamma\delta$ T cells bind E-selection via novel glycoprotein receptor: first characterization of a lymphocyte/E-selectin interaction in an animal model. *J. Exp. Med.* 178:853-863.
- 73 Wang K., Klotz J. L, Kiser G., Bristol G., Hays E., Lai E., Gese E., Kronenberg M., Hood L. 1994. Organization of the V gene segments in mouse T-cell antigen receptor α/d locus. *Genomics* 20:419-428.
- 74 Wilson R. A., Zolnai A., Rudas P., Frenyo L. V. 1996. T-cell subsets in blood and lymphoid tissues obtained from fetal calves, maturing calves and adult bovine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 53:49-60.

- 75 Wjngaard P. L. J., Metzelaar M. J., MacHugh N. D., Morrison W., Clevers H. C. 1992. Molecular characterization of the WC1 antigen expressed specifically on bovine CD4- CD8- $\gamma\delta$ T lymphocytes. *J. Immunol.* 149:3273-3277.
- 76 Wjngaard P. L. J., Metzelaar M. J., MacHugh N. D., Morrison W., Clevers H. C. 1994. Members of the novel WC1 gene family are differentially expressed on subsets of bovine CD4- CD8- $\gamma\delta$ T lymphocytes. *J. immunol.* 152:3476-3482.
- 77 Xiao-Ping Zhong, Juan Caraban, Michael S. Krangel. 1999. Flanking nuclear matrix attachment regions synergize with the T cell receptor δ enhancer to promote V(D)J recombination. *PNAS*, 96(21): 1970-1975.
- 78 Xu Y.W., Yan L., Liu H., Wu Y., Wu B.W. 2008. Bioinformatics analysis of mouse adiponectin receptor-1 and its antibody preparation. *Sheng Li Xue Bao.* 60:156-160.

7. PERSPECTIVAS

El trabajo que se presenta en esta Tesis, es la plataforma necesaria para el descubrimiento y conocimiento del sistema inmunológico de *Dasypus novemcinctus*, ya que hoy en día no se han esclarecido las poblaciones celulares que lo componen y su actividad ante un proceso infeccioso. Como se menciono anteriormente, el armadillo es considerado como el modelo animal por excelencia para el estudio de la lepra, por lo tanto, el esclarecimiento de su fisiología celular y comportamiento inmunológico ante la infección por *Mycobacterium leprae* traerá consigo un mejoramiento significativo en el diagnóstico y mas aun en la terapia, incrementando la calidad de vida del paciente.

8. APENDICE A

8.1 Reporte de la secuencia nucleotídica del receptor *trdv2* humano (*hdv102s1*)



AE000661. Reports Homo sapiens T-ce...[gi:2358060]

LOCUS HUA000661 247877 bp DNA linear PRI 19-DEC-2002

DEFINITION Homo sapiens T-cell receptor alpha delta locus from bases 752679 to 1000555 (section 4 of 5) of the Complete Nucleotide Sequence.

ACCESSION AE000661 AE000521 U85196 U85198

VERSION AE000661.1 GI:2358060

KEYWORDS .

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM Homo sapiens
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 247877)

AUTHORS Koop,B.F., Rowen,L., Wang,K., Kuo,C.L., Seto,D., Lenstra,J.A., Howard,S., Shan,W., Deshpande,P. and Hood,L.

TITLE The human T-cell receptor TCRAC/TCRDC (C alpha/C delta) region: organization, sequence, and evolution of 97.6 kb of DNA

JOURNAL Genomics 19 (3), 478-493 (1994)

PUBMED 8188290

REMARK This citation covers from bases 966383-1064019

REFERENCE 2 (bases 1 to 247877)

AUTHORS Boysen,C., Simon,M.I. and Hood,L.

TITLE Analysis of the 1.1-Mb human alpha/delta T-cell receptor locus with bacterial artificial chromosome clones

JOURNAL Genome Res. 7 (4), 330-338 (1997)

PUBMED 9110172

REFERENCE 3 (bases 1 to 247877)

AUTHORS Boysen,C., Inyoul,L., Smith,T.M., Smit,A., Wang,K., Rowen,L. and Hood,L.

TITLE T-Cell Receptor Alpha Delta Locus Complete Nucleotide Sequence

JOURNAL Unpublished

REMARK This citation covers bases 1-983545 and bases 1064020-1071650

REFERENCE 4 (bases 1 to 247877)

AUTHORS Boysen,C., Lee,I., Smith,T.M., Smit,A., Kai,W., Lee,R. and Leroy,H.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (20-JUL-1997) Department of Molecular Biotechnology, University of Washington, Box 357730, Seattle, Washington 98195, USA

REMARK Complete nucleotide sequence of the human T-cell receptor alpha delta locus

COMMENT On or before Jun 12, 2001 this sequence version replaced gi:2121230, gi:2121232.
Sequencing method: high redundancy shotgun. Interspersed Repeats were identified with RepeatMasker (available from <http://ftp.genome.washington.edu/RM/RepeatMasker.html>) Simple sequence repeats were identified with sputnik (available from <http://serac.mbt.washington.edu/~chrisa/software/sputnik.html>).

FEATURES Location/Qualifiers

gene 176503..177038
/gene="hDV102S1"
join(<176503..176548,176701..>176999)
/gene="hDV102S1"
/product="hDV102S1"
/note="Old name hDV102S1"

mRNA join(176503..176548,176701..>176999)
/gene="hDV102S1"
/standard_name="hDV102S1"
/note="Old name hDV102S1"

CDS /codon_start=1
/product="hDV102S1"

```

/protein_id="AAB69040.1"
/db_xref="GI:2358066"
/translation="MQRISSLIHLSLFWAGVMSAIELVPEHQTVPVSIGVPATLRCSM
KGEAIGNYYINWYRKTQGNMTFIYREKDIYGPFGKDNFQGDIDIAKNLAVLKILAPS
ERDEGSYYCACDT"
V segment
join(176503..176548,176701..>176999)
/gene="hDV102S1"
/standard_name="hDV102S1"
/note="Old name hDV102S1"

```

```

176401 agggactgac ttcctcagtc acaagtgttt cacaagtgtg ttggttcaga ggaaggacca
176461 ggcagaaggt ggttgagagg cagagctgcc cctgagtgag ccatgcagag gatctcctcc
176521 ctcatccatc tctctctctt ctggggcaggt aaggcagacc ccagaacttg ggccaagcaa
176581 gactcagcag caaagaaaca tcaaggctca caggaccttg tactcatgga ctgtgctcct
176641 tactcaatga cctcagcccc cagccctcac tgagcccctc tcttgtgtct tttctctcag
176701 gagtcatgtc agccattgag ttggtgcctg aacaccaaac agtgctgtg tcaatagggg
176761 tccctgccac cctcaggtgc tccatgaaag gagaagcgat cggtaactac tatatcaact
176821 ggtacagгаа gacccaaggt aacacaatga ctttcatata cggagaaaag gacatctatg
176881 gccctggttt caaagacaat ttccaaggtg acattgatat tgcaaagaac ctggctgtac
176941 ttaagatact tgcaccatca gagagagatg aagggtotta ctactgtgcc tgtgacacc
177001 accctgctgc agctctactt ctgagcagct caaaaaccac tgaccaggcg cggtggtca
177061 cacctgtaat ccagcactt tgggagccg aggtgggtgg atcacgaggt caggagatcg
177121 agaccatcct ggctaatacg gtgaaacccc gtccctacta aaaatacaaa aaaaaaaaaat
177181 tagctggtcg tggtggcggg cacctgcagt cggagctact caggaggctg aggcaggaga
177241 atagcgtgaa cctgggaggc ggagcttgca gtgagccgag gtcatgccac tgcaactcag
177301 cctgggagac agagcaagag tccatctcaa aaaaaaaaaa aaaagaacat tgccatccat

```


8.2 Reporte de la secuencia nucleotídica del receptor *trdv2* humano



```
X15207. Reports Human germline TR...[gi:37314]
LOCUS       HSTRDV2                576 bp    DNA        linear    PRI 24-APR-1993
DEFINITION Human germline TRDV2 gene for T-cell receptor variable region delta
            2.
ACCESSION   X15207
VERSION     X15207.1  GI:37314
KEYWORDS    T-cell receptor; T-cell receptor delta; variable region.
SOURCE      Homo sapiens (human)
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
            Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 576)
AUTHORS     Dariavach,P. and Lefranc,M.P.
TITLE       First genomic sequence of the human T-cell receptor delta 2 gene
            (TRDV2)
JOURNAL     Nucleic Acids Res. 17 (12), 4880 (1989)
PUBMED     2526321
REFERENCE   2  (bases 1 to 576)
AUTHORS     Lefranc,M.P.
TITLE       Direct Submission
JOURNAL     Submitted (05-MAY-1989) Lefranc M.-P., Laboratoire
            d'Immunogenetique Moleculaire, Universite de Montpellier II, URA
            CNRS 199 USTL, Place Eugene Bataillon, 34060 Montpellier Cedex 1,
            France
FEATURES             Location/Qualifiers
     source           1..576
                     /organism="Homo sapiens"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /map="chromosome 14q11"
                     /clone="lambda LY67Vdelta 2"
                     /cell_line="LY67"
                     /dev_stage="germ line"
     CDS              join(1..46,197..495)
                     /codon_start=1
                     /product="TRDV2"
                     /protein_id="CAA33277.1"
                     /db_xref="GI:37315"
                     /translation="MQRISLIHLHLSLFWAGVMSAIELVPEHQIVPVSIGVPATLRCSM
                     KGEAIGNYYINWYRKTQGNTITFIYREKDIYGPFGKDNFQGDIDIAKNLAVLKILAPS
                     ERDEGSYYCACDT"
     V_region         join(1..46,197..495)
                     /product="TRDV2"
     idNA             47..196
     misc_feature     496..502
                     /note="heptamer"
     misc_feature     526..534
                     /note="nonamer"
ORIGIN
1 atgcagagga tctcctcct catccatctc tctctcttct gggcaggtaa ggcagacccc
61 agaacttggg ccaagcaaga ctcagcagca aagaaacatc aaggctcaca ggaccttcta
121 ctcattgact gtgtcctta ctcaatgacc tagccccag ccctcactga gccctctct
181 tgtgtcttct tctcaggagt catgtcagcc attgagtttg tgcctgaaca ccaaacagtg
241 cctgtgtcaa taggggtccc tgccaccctc aggtgctcca tgaaaggaga agcgatcgg
301 aactactata tcaactgta caggaagacc caaggtaaca caatcacttt catataccga
361 gaaaaggaca tctatggccc tggtttcaaa gacaatttcc aaggtgacat tgatattgca
421 aagaacctgg ctgtacttaa gatacttgca ccatcagaga gagatgaagg gtcttactac
481 tgtgctgtg acaccaccc tgetgcagct ctactcttga gcagctcaaa aaccactgac
541 caggcgcggt ggctcacacc tgtaatccca gcaactt
//
```

8.3 Resultados de la alineación de la secuencia dtrdv2



Multalin result page

Multalin version 5.4.1
 Copyright I.N.R.A. France 1989, 1991, 1994, 1996
 Published research using this software should cite
 Multiple sequence alignment with hierarchical clustering
 F. CORPET, 1988, Nucl. Acids Res., 16 (22), 10881-10890
 Symbol comparison table: blosum62
 Gap weight: 12
 Gap length weight: 2
 Consensus levels: high=90% low=50%
 Consensus symbols:
 ! is anyone of IV
 \$ is anyone of LM
 % is anyone of FY
 # is anyone of NDQEBZ

MSF: 578 Check: 0..

Name: trdv2 Len: 578 Check: 2842 Weight: 1.00
 Name: hdv102s1 Len: 578 Check: 6467 Weight: 1.00
 Name: Consensus Len: 578 Check: 1264 Weight: 0.00

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
trdv2	-----													
hdv102s1	-----													
Consensus	-----													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
trdv2	-----													
hdv102s1	-----													
Consensus	-----													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
trdv2	-----													
hdv102s1	-----													
Consensus	-----													
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
trdv2	-----													
hdv102s1	-----													
Consensus	-----													
	521	530	540	550	560	570	578							
trdv2	-----													
hdv102s1	-----													
Consensus	-----													

8.4 Resultados del programa Flexi® Vector Primer Design Tool para el desarrollo de los iniciadores trdv2-f y trdv2-r.

Flexi® Vector Primer Design Tool

The following results have been returned:

No in frame stop codon was found in your input sequence. The sequence GTTTAA (Val Stop) was appended to the end of your sequence.

The primer pair which best fit the criteria is shown below.

The Best 5' Primer is 5'-TAAAGCGATCGCCATGAGCGCGATTGAACTGGTGCC-3'

Tm of homology region = 62 : Tm of full primer = 70 : %GC = 56: Length = 36

The Best 3' Primer is 5'- TTGTGTTTAAACGGTATCGCACGCGCAATAATAGCTGCC-3'

Tm of homology region = 64 : Tm of full primer = 70 : %GC = 46: Length = 39

The PCR product will be 319 base pairs long.

After digestion with SgfI and PmeI it will be 304 bases long.

Formatted for easy ordering...

Upstream: 5'-TAAAGCGATCGCCATGAGCGCGATTGAACTGGTGCC-3'

Downstream: 5'- TTGTGTTTAAACGGTATCGCACGCGCAATAATAGCTGCC-3'

You entered the following sequence

This is the sequence that was analyzed

```
1   ATGAGCGCGA TTGAACTGGT GCCGGAACAT CAGACCGTGC CGGTGAGCAT TGGCGTGCCG
61  GCGACCCTGC GCTGCAGCAT GAAAGGCGAA GCGATTGGCA ACTATTATAT TAACTGGTAT
121 CGCAAAACCC AGGGCAACAC CATGACCTTT ATTTATCGCG AAAAAGATAT TTATGGCCCG
181 GGCTTTAAAG ATAACCTTCA GGGCGATATT GATATTGCGA AAAACCTGGC GGTGCTGAAA
241 ATTCTGGCGC CGAGCGAACG CGATGAAAGC AGCTATTATT GCGCGTGCGA TACC
```

Here is amino acid sequence expected from your clone

It is 99 amino acids long.

```
1   GVMSAIELVP EHQTVPVSIG VPATLRCSMK GEAIGNYYIN WYRKTQGNTM TFIYREKDIY
61  GPGFKDNFQG DIDIAKNLAV LKILAPSERD EGSYYCACDT V
```

9. APÉNDICE B

9.1 Medios de cultivo

Medio Luria-Bertani (LB)

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio	10 g

Disolver los componentes en 950 mL de agua desionizada, ajustar el pH a 7.0 con NaOH y aforar a un litro. Esterilizar y agregar el antibiótico necesario a una temperatura de 55° C, mantenerlo a 4° C. Para la preparación de placas se agregan 15 g de agar por cada litro de medio.

Medio SOB

Triptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio	0.5 g
Cloruro de Potasio 2.5mM	100 ml
Cloruro de magnesio 10mM	10 ml

Disolver los componentes en 950 mL de agua desionizada, ajustar el pH a 7.0 con NaOH y aforar a un litro. Esterilizar y mantener a 4° C.

Medio RM con Glucosa

Sales M9 10X	100 ml
Casaminoácidos	20 g
Glucosa al 20%	10 ml
Cloruro de Magnesio 1M	1 ml
Antibiótico	

Disolver los casaminoácidos en 890 ml de agua desionizada y esterilizar en autoclave. Posteriormente agregar cada uno de los componentes restantes previamente esterilizados. Adicionar el antibiótico y conservar en oscuridad a 4° C.

9.2 Soluciones y reactivos

Ácido etilendiamino tetraácético (EDTA) 0.5 M, pH 8.0

EDTA - Sal disódica-2H ₂ O	186.1 g
Agua desionizada	800.0 ml
NaOH	20.0 g (aprox.)

Disolver el EDTA en el agua desionizada y ajustar el pH mediante la adición del hidróxido de sodio. Aforar a 1000 ml, esterilizar en autoclave.

Tris 1 M

Tris base	121.1 g
Agua desionizada	800.0 ml
HCl (concentrado)	40.0 ml (aprox.)

Disolver el Tris base en el agua desionizada y ajustar el pH a 7.0 mediante la adición del ácido clorhídrico. Aforar a 1 litro, esterilizar en autoclave.

Solución de lisis

Tris base (pH 8.0)	10.0 mM
EDTA (pH 8.0)	10.0 mM
NaCl 1M	50.0 mM
SDS	0.2 %
Proteinasa K	200.0 µg/ml

Esterilizar la solución a través de una membrana millipore de 0.2 µm.

Cloruro de sodio 1M

NaCl	2.92 g
Agua bidestilada	50.0 ml

Regulador Tris-EDTA (TE, pH 8.0)

Tris HCl (pH 8.0)	10.0 mM
EDTA (pH 8.0)	1.0 mM

Regulador de carga para electroforesis. Solución 6X.

Azul de bromofenol	0.25 %
Sacarosa	40.0 % (P/V en agua)

Regulador de corrimiento para electroforesis, Tris-Borato-EDTA, (TBE). Solución stock 5X.

(Cantidades por litro)

Tris base	54.0 g
Ácido bórico	27.5 g
EDTA 0.5 M (pH 8.0)	20.0 ml

La solución de trabajo de TBE se prepara a una concentración de 0.5X para la elaboración de los geles de agarosa y su corrimiento.

Bromuro de Etidio (10 mg/ml)

Bromuro de etidio	1.0 g
Sacarosa	100.0 ml

Disolver el colorante y el azúcar en TBE hasta su completa disolución. Almacenar la solución a temperatura ambiente protegido de la luz.

9.3 Productos biológicos

Proteinasa K

Protein serin <i>Tritirachium album 2KU</i>	Solubilizar en solución de Tris 50 mM-Acetato de Calcio 2 mM, pH 8.0.	Calbiochem (San Diego, California, USA)
--	---	---

Estuche comercial para PCR

<i>GoTaq polymerase</i>	5U/μl	Promega (Madison Wisconsin, USA)
PCR Nucleotide Mix	10 mM c/dNTP	Boehringer Mannheim Corp. (USA)
Thermophilic DNA Poly buffer	10 X	Promega (Madison Wisconsin, USA)
MgCl ₂	25 mM	Promega (Madison Wisconsin, USA)

Estuche comercial para PCR

<i>Taq polymerase platinum</i>	5U/μl	Roche (USA)
PCR Nucleotide Mix	10 mM c/dNTP	Roche (USA)
Thermophilic DNA Poly buffer	10 X	Roche (USA)
MgCl ₂	25 mM	Roche (USA)

Oligonucleótidos

trdv2-f	1,000 pM	Iniciadores sintetizados por Invitrogen, CA, USA.
trdv2-r	1,000 pM	

Estuche de Clonación y Expresión *pFIK T7 Flexi® Vector*

<i>pFIK T7 Flexi® Vector</i>	100 ng/ μl	Promega (Madison Wisconsin, USA)
------------------------------	------------	----------------------------------

Estuche del Sistema de Transferencia para el vector *pFIK T7 Flexi® (Flexi® System, Entry/Transfer)*

Flexi® Enzyme Blend (<i>SgfI</i> and <i>PmeI</i>)	1X 50 mL	Promega (Madison Wisconsin, USA)
5X Flexi® Ligase Buffer	1mL	
2X Flexi® Ligase Buffer	0.5 mL	
T4 DNA Ligase (HC)	500U	
Nuclease-free Water	1.25 mL	

10. APENDICE C

10.1 Preparación de geles de poliacrilamida

Gel sellador para geles de 7 y 12%.

Método:

1. Se utiliza la unidad para geles verticales de 10 x 10 cm y 0.75 mm de grosor de BIORAD. Se lavan perfectamente las 2 placas de vidrio con detergente neutro. Se enjuaga con agua bidestilada y se sumergen en una solución de metanol al 5% . Se secan los vidrios con algodón y se montan en el dispositivo.
2. Se colocan en un tubo de ensaye de 5 ml los siguientes reactivos:

Reactivos	Cámara chica (0.75 mm)
Solución de monómeros	1 ml
Agua bidestilada	1 ml
Persulfato de amonio al 10%	75 μ l
TEMED	5 μ l

3. Agitar cuidadosamente y verter la mezcla entre los bordes finales de las placas de vidrio para sellar la parte inferior.

Gel separador de 7%

Método:

1. En un vaso de precipitados de 25 ml se colocan los siguientes reactivos:

Reactivos	Cámara chica (0.75 mm)
Solución de monómeros	1.5 ml
Regulador Tris 1.5 M pH 8.8	1.5 ml
SDS 10%	120 μ l
Agua bidestilada	2.7 ml
Aplicar vacío durante 10 minutos	
Persulfato de amonio al 10%	45 μ l
TEMED	3 μ l

2. Agitar vigorosa y cuidadosamente para que no se formen burbujas; se vierte la mezcla entre las placas de vidrio hasta aproximadamente 3.5 cm del borde superior.
3. Colocar inmediatamente 1.0 ml de agua sobre la superficie de la acrilamida, dejándola resbalar suavemente sobre la pared de uno de los extremos. Este paso es muy importante para obtener una superficie plana del borde superior del gel. Cuando la gelificación ocurre se observa una interfase muy definida entre el agua y el gel.
4. Inclinar las placas para remover el agua y lavar la superficie de los geles 3 veces con agua bidestilada.

Gel separador de 12%

Método:

1. En un vaso de precipitados de 25 ml se colocan los siguientes reactivos:

Reactivos	Cámara chica (0.75 mm)
Solución de monómeros	2.4 ml
Regulador Tris 1.5 M pH 8.8	1.5 ml
SDS 10%	120 µl
Agua bidestilada	2.0 ml
Aplicar vacío durante 10 minutos	
Persulfato de amonio al 10%	45 µl
TEMED	3 µl

2. Agitar vigorosa y cuidadosamente para que no se formen burbujas; se vierte la mezcla entre las placas de vidrio hasta aproximadamente 3.5 cm del borde superior.
3. Colocar inmediatamente 1.0 ml de agua sobre la superficie de la acrilamida, dejándola resbalar suavemente sobre la pared de uno de los extremos. Este paso es muy importante para obtener una superficie plana del borde superior del gel. Cuando la gelificación ocurre se observa una interfase muy definida entre el agua y el gel.
4. Inclinar las placas para remover el agua y lavar la superficie de los geles 3 veces con agua bidestilada.

Gel concentrador de 7 y 12%

Método:

1. Eliminar todo el líquido de la superficie de los geles.
2. Colocar en un vaso de precipitados los siguientes reactivos:

Reactivos	Cámara chica (0.75 mm)
Solución de monómeros	330 µl
Regulador Tris 0.5 M, pH 6.8	500 µl
SDS 10%	40 µl
Agua bidestilada	1.22 ml
Aplicar vacío durante 10 minutos	
Persulfato de amonio 10%	25 µl
TEMED	5 µl

3. Agitar cuidadosamente y agregar la mezcla sobre el gel separador. Colocar el peine apropiado de tal manera que no se formen burbujas en la interfase de los 2 geles.
4. Esperar a que gelifique y entonces retirar el peine utilizado.

From: marcela lopez (diaclaro2000@yahoo.com.mx)
To: syramses@yahoo.com;
Date: Tue, October 26, 2010 9:52:42 AM
Cc:
Subject: Rv: Submission Confirmation for Veterinary Immunology and Immunopathology

--- El vie 10-sep-10, VETIMM <vetimm@elsevier.com> escribió:

De: VETIMM <vetimm@elsevier.com>
Asunto: Submission Confirmation for Veterinary Immunology and Immunopathology
A: diaclaro2000@yahoo.com.mx
Fecha: viernes, 10 de septiembre de 2010, 13:39

Title: ENDOCYTIC AND NBT-REDUCTION ACTIVITIES AND TNF
EXPRESSION BY ARMADILLO MONOCYTE-DERIVED MACROPHAGES

Dear M. Sc López Hurtado,

Your submission has been received by the journal
Veterinary Immunology and Immunopathology.

You will be able to check on the progress of your paper by logging onto the Elsevier
Editorial Systems as an Author using the following information:

<http://ees.elsevier.com/vetimm/>

Your username is: marcelalopez

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/VETIMM/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Editorial Office Staff
Veterinary Immunology and Immunopathology

For further assistance, please visit our customer support site at
<http://epsupport.elsevier.com>. Here you can search for solutions on a range of topics,
find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive
tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further
assistance from one of our customer support representatives.

Elsevier Editorial System(tm) for Veterinary Immunology and Immunopathology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: ENDOCYTIC AND NBT-REDUCTION ACTIVITIES AND TNF EXPRESSION BY ARMADILLO
MONOCYTE-DERIVED MACROPHAGES

Article Type: Short Communication

Keywords: armadillo macrophages; Monocyte-derived macrophages: Dasypus novemcinctus
macrophages; NBT reduction; Superoxide anion.

Corresponding Author: M. Sc Marcela López Hurtado,

Corresponding Author's Institution: Instituto Nacional de Perinatología

First Author: Marcos R Escobedo-Guerra, Ph D

Order of Authors: Marcos R Escobedo-Guerra, Ph D; Maria J De haro-Cruz, Ph D; Fernando M Guerra-
Infante, Ph D; Marcela López Hurtado

1 ENDOCYTIC AND NBT-REDUCTION ACTIVITIES AND TNF EXPRESSION BY ARMADILLO
2 MONOCYTE-DERIVED MACROPHAGES
3
4

5 Marcos R. Escobedo-Guerra^a, , María J de Haro-Cruz^a, Fernando M. Guerra-Infante^{a,b} and
6 Marcela López-Hurtado^{b*}
7

8 ^aLaboratorio de Microbiología Veterinaria del Departamento de Microbiología de Escuela Nacional de
9 Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, Plan de Ayala y Prol. Carpio, Col. Casco de Sto
10 Tomás, C.P. 11340, México, D.F., Mexico.

11 ^bLaboratorio de Virología del Departamento de Infectología del Instituto Nacional de Perinatología,
12 Montes Urales 800, Col. Lomas Virreyes, C.P. 11000, México, D.F., Mexico.
13

14 *Corresponding autor. Tel: +55 55209900x261; fax: 55 55209900x209.

15 E-mail address: diaclaro2000@yahoo.com.mx (M. López-Hurtado)
16

17 ABSTRACT

18

19 The endocytosis and germicidal activity of armadillo monocyte-derived macrophages have not yet
20 been evaluated. This report shows that these cells have a high endocytic activity in comparison with
21 monocytes and low superoxide anion production as happens with human macrophages. Besides,
22 armadillo monocyte-derived macrophages produce TNF-like when are stimulated with PMA.

23

24 Keywords: armadillo macrophages; Monocyte-derived macrophages: *Dasypus novemcinctus*
25 macrophages; NBT reduction; Superoxide anion.

26 1. INTRODUCTION

27 Cells that efficiently engulf a wide variety of microbes are termed professional phagocytes (Labro,
28 2000). These cells include monocytes, macrophages, eosinophiles and polymorphonuclear leukocytes
29 (also known as neutrophils). Professional phagocytes play an important role in inflammatory process
30 as the first line of defense against several microorganisms by producing toxic oxygen intermediates
31 and proteolytic enzymes, and by modifying the expression of surface adhesion molecules [Labro,
32 2000].

33 The nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*) is a mammalian of wildlife which is infected by
34 diverse bacteria, fungi, viruses and parasites (Deps, et al., 2007; Bagagli, et al., 2003; López-Hurtado
35 and Guerra-Infante et al., 2006). In healthy armadillos and infected armadillos with microfilariae, the
36 neutrophils and monocytes of peripheral blood display good endocytic capacity against bacteria and
37 yeasts. However, the eosinophils of infected armadillos showed deficiencies in endocytic capacity
38 against yeasts (López-Hurtado, et al., 2005; López-Hurtado and Guerra-Infante 2006; López-Hurtado,
39 et al., 2009). The oxygen dependent bactericidal activity of these cells in infected armadillos is low in
40 comparison with healthy armadillos (López-Hurtado, et al., 2005; López-Hurtado and Guerra-Infante
41 2006; López-Hurtado, et al., 2009). The endocytosis and germicidal activity of armadillo macrophages
42 have not yet been evaluated.

43 Macrophages are involved in a number of key physiological processes and complex responses such
44 as antigen processing and presenting to T cells and proinflammatory cytokine production (Labro,
45 2007; Chang, 2009). Blood monocytes are considered circulating precursors of macrophages and
46 dendritic cells (DC) and, together with the latter, have collectively been termed mononuclear
47 phagocyte system (Labro, 2007; Chang, 2009). When monocytes are cultured in vitro for several days,
48 these cells increase progressively in size, complexity and transform into macrophages (Sutton, et al.
49 1966; Pinet, et al., 2003). Human monocyte-derived macrophages have been shown to retain their
50 ability to ingest particles including latex particles and opsonized sheep erythrocytes (Sasada, et al.,
51 1987), but unlike monocytes, the monocyte-derived macrophages seem to diminish their microbicidal
52 activity (Nakagawara, et a., 1981; Sasada, et al., 1987). The aim of this investigation was evaluated

53 the endocytic and NBT-reduction activities of armadillo monocytes-derived macrophages (armadillo
54 MDM) as well as TNF-like expression when these cells are stimulated with phorbol myristate acetate
55 (PMA).

56 **2.0 Materials and Methods**

57 *2.1. Animals.*

58 The nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*) were captured in the state of Michoacan in
59 Mexico. Twenty milliliters of peripheral blood were collected by means of cardiac puncture from the
60 animals that were previously anesthetized with ketamina base (ketalar 35 mg/kg, 1.5 mL) via
61 intramuscular injection. The blood was collected in plastic tubes with preservative-free heparin.

62 *2.2. Monocytes preparations.*

63 Total leukocytes were isolated by dextran sedimentation and mononuclear cells were purified by ficoll-
64 hypaque technique. Suspension monocytes were prepared as described (Sasada, et al., 1987). In
65 brief, mononuclear cells obtained by ficoll-hypaque density by centrifugation were washed twice in
66 RPMI-1640 culture medium and resuspended to a concentration of 1×10^6 cells/mL with RPMI-1640
67 medium supplemented with 10% of fetal calf serum and antibiotics (RPMI-complete). A one-milliliter
68 sample was added in each well of a 24-wells microplate and incubated for 90 min at 37°C in a
69 humidified 95% air/ 5% CO₂ atmosphere. The microplates were vigorously washed for five times with
70 RPMI-complete to remove non-adherent cells. The adherent cells were then exposed to ice-cold
71 Hank's balanced salt solution (SSBH) added of 0.2% bovine serum albumin and 0.1% EDTA for 30-45
72 sec, and then the adherent cells were gently removed from the surface with rubber policeman. These
73 cells were then washed three times with SSBH. Viability was greater than 95% by trypan blue
74 exclusion. Purity of these preparations was greater than 90% as assessed by Wright stain
75 morphology.

76 *2.3 Monocyte-derived Macrophages (MDM).*

77 A monocyte cell suspension was added into 24-well microplate (5×10^4 /mL for well) contained
78 previously 13 mm glass coverslips. All microplates were incubated at 37°C with 5% CO₂ for 8 days to
79 allow differentiation of monocytes to macrophages. The RPMI-complete was changed every 4 days.

80 *2.4 Endocytosis assay and NBT reduction assay.*

81 The endocytosis assay and nitro-blue tetrazolium reduction were carried out using 5×10^4
82 macrophages in glass coverslips (Rojas-Espinosa, et al., 1996). *Saccharomyces cerevisiae* yeasts
83 were used as endocytic particles. The yeast were previously washed and opsonized with armadillo
84 serum previously inactivated at 56°C for 30 min and adjusted to 300×10^6 cells per mL in saline
85 solution. To opsonize yeast, 1.0 mL of the suspension was centrifuged at $600 \times g \times 5$ min, then the
86 pellet was resuspended in 1.0 mL of heat-inactivated serum, the resuspended suspension was
87 incubated at 37°C for 30 min, centrifuged as before and finally resuspended in 1.0 mL of RPMI culture
88 medium. One mL of RPMI culture medium, 5×10^6 yeast and 0.5 mL of a 0.2% NBT (2,2'-di-p-
89 nitrophenyl-5,5'-diphenyl-3,3'-[3,3'-dimethoxy-4,4'-diphenylene]-ditetrazolium chloride) solution in
90 0.85% NaCl were added to 24-wells microplate containing coverslips with macrophages. The
91 microplate was incubated for 90 min, then the coverslips were removed, rinsed 3 times in
92 physiological saline solution, stained for 10 min with 0.5% safranin in water, rinsed in distilled water, air
93 dried and mounted on glass slides using synthetic resin. The degree of endocytosis and NBT
94 reduction were evaluated by observation under microscopy by counting 200 cells in duplicate
95 preparations.

96 *2.4 Effect of recombinant human interferon-gamma on endocytic and NBT-reduction activities.*

97 One milliliter of RPMI-complete supplemented with recombinant human interferon-gamma (IFN- γ) at 1
98 ng/ml was added to each well of 24-well microplate containing macrophages in coverslip. The
99 microplate was incubated at 37°C with 5% CO_2 for 24 h. Then, the microplate was used for
100 endocytosis and NBT-reduction assays as previously described.

101 *2.5 TNF-like activity detection.*

102 One million of monocytes-derived macrophages into each well of 24-well flat-bottom microplate were
103 stimulated with phorbol myristate acetate (PMA, Sigma). The microplate was incubated at 37°C with
104 5% CO_2 . The culture supernatants were recovered after 24 h and maintained at -70°C until use. The
105 detection of TNF was carried out by cytotoxicity assay using L-929 cells as previously described
106 (Guerra-Infante, et al., 2001). Briefly, 50 μL of the culture supernatants were added in each well in

107 triplicate in 96-well flat-bottom microplates that contained 20×10^3 L-929 cells/well. Then, 50 μ L of
108 RPMI-supplemented with 1 μ g/mL of actinomycin D (Sigma) were added to each well. The microplates
109 were incubated at 37° C with 5% CO₂ for 24 h. Supernatants were aspirated and 100 μ L of methanol
110 were added. After 7 min of incubation, 50 μ L of 2% violet crystal were added. After 10 min, the
111 microplates were washed five times with 200 μ L per well with phosphate buffer solution (PBS). Then,
112 100 μ L of 33% glacial acetic acid was added. Finally, the microplates were read in a microplate reader
113 at 600 nm for absorbance (Ceres 900 Hdi, Bio-Tek instruments, Inc., Winooski, Vermont USA). The
114 results were reported as percentage of cellular cytotoxicity.

115 2.6. Statistical analysis

116 The results were analyzed by non-parametric Mann-Whitney U statistical test; $p < 0.05$ was considered
117 statistically significant.

118

119 3. Results and discussion

120 3.1. Endocytosis and NBT reduction by monocyte-derived armadillo macrophages (MDM).

121 In several animal species, monocytes comprise 4 to 8% from peripheral blood leukocytes (Suzuki, and
122 Eguchi, 1999; Takizawa, et al., 2004), and have the capacity to differentiate into macrophages,
123 dendritic cells, Langerhans cells, multinucleated giant cells or epithelioid cells. The primary functions
124 of these cells are endocytosis of several microorganisms or cell debris (Labro, 2007; Chang, 2009). In
125 this study the purity of armadillo monocytes obtained was 90%. When these cells were incubated for 8
126 days at 37° C in an atmosphere of CO₂ at 5%, they showed morphological changes such as increased
127 size of 5 μ m to 12 μ m approximately, as well as centric and eccentric nucleus, as occur with other
128 animal species macrophages (Sutton, et al. 1966; Pinet, et al., 2003). These cells were considered as
129 macrophages (Figure 1)

130 Endocytic activity of MDM was assessed by the engulfment of *S. cerevisiae* yeast (Table 1). The
131 results showed that armadillo MDM have a greater capacity of endocytosis (71.77 ± 4.11 , $p < 0.001$)
132 than monocytes recently purified (60.66 ± 6.9). With regard to the ability of armadillo MDM for carried

133 out the NBT reduction, this activity was identical to that shown by monocytes recently purified (Table 1
134 and Figure 1). These cells (monocytes and MDM) showed low NBT reduction capacity compared with
135 armadillo neutrophils (López-Hurtado, et al., 2005; López-Hurtado, et al., 2009).

136 The NBT is a dye that evaluates the NADPH oxidase system, which involves a molecular complex
137 protein (p22, p47, p67, gp91 and Cyt B558) whose function is to capture and transform chemically the
138 oxygen to generate reactive oxygen species such as superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl
139 radicals and singlet oxygen which are the oxygen-dependent microbicidal arsenal of phagocytes
140 (Ostanin, et al 2007). In particular the NBT dye is reduced and precipitates when macrophages and
141 monocytes produces the superoxide anion (Ostanin, et al 2007). A low NBT reduction activity of
142 monocytes and macrophages from armadillo indicates that these cells produce low levels of
143 superoxide anion.

144 The fact that armadillo MDM produce low levels of superoxide anion is not surprising since studies by
145 Schlesinger in 1984 (Schlesinger, et al., 1984) proved that macrophages and multinucleated giant
146 cells derived from human monocytes of peripheral blood have a decreased ability to reduce NBT
147 (Schlesinger, et al., 1984). Despite this, several researchers have reported that human MDM show a
148 decrease in antimicrobial activity compared with freshly isolated monocytes, this decrease is due to
149 oxygen radicals such as superoxide anion, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals that are produced
150 in very small quantities when monocytes are incubated for three days or more (Nakagawara, et a.,
151 1981; Sasada, et al., 1987). Similarly, Nakagawara, et al. in 1981 reported that macrophages
152 stimulated with PMA or opsonized zymosan showed diminish of 60% in concentration of superoxide
153 anion and hydroxyl radicals when were incubated for 3 days (Nakagawara, et a., 1981).

154 *3.2 Effect of recombinant human interferon- γ on endocytic and NBT reduction activities of MDM*

155 In the early 80's it was established that gamma interferon was the most common signal for activation
156 of macrophages (Young, and Hardy, 1995). In this study, we investigated the effect of recombinant
157 human interferon- γ on endocytic and NBT reduction activities of armadillo MDM. The results showed
158 that these macrophages had an increased in endocytosis and NBT reduction activities (89.92 ± 6.17

159 and 36.42 ± 4.31 , $p < 0.001$, respectively) compared with unstimulated macrophages (Table 1). It is
160 known that interferon- γ is a macrophage activating factor that induces a greatest antimicrobial activity
161 in macrophages; this activity is due to nitric oxide synthesis (James, 1995). Nitric oxide is a product of
162 the conversion of arginine to citrulline and is carried out by the enzyme nitric oxide synthase (NOS)
163 (James, 1995). It is reported that NBT reduction also correlates with the presence of the NOS enzyme
164 in neurons, macrophages and neutrophils, because all NOS isoforms catalyse superoxide anion
165 formation under particular conditions (Smith, et al 1998; Yoneyama, et al., 2001). This phenomenon
166 would explain why there is an increased NBT reduction by armadillo MDM when are stimulated with
167 the recombinant human gamma interferon. Besides, this result also suggests that recombinant human
168 interferon- γ can induce transcription of genes of the NOS enzyme in armadillo MDM. Recently, the
169 interferon- γ genes from armadillo has been cloned and over-expressed in *Escherichia coli*. The
170 sequence of amino acids of interferon- γ from armadillo showed homology of 62% with the human
171 interferon- γ amino acids (Peña, et al., 2008). However, we ignore the extent to which interferon
172 armadillo could stimulate NBT reduction activity of armadillo MDM. This would require measuring nitric
173 oxide levels in the culture medium in the form of nitrates and nitrites.

174 3.3 Presence of TNF-like in supernatants culture of armadillo MDM stimulates with PMA.

175 We also evaluated the ability of armadillo MDM to produce TNF-like when these cells were stimulated
176 with PMA. These macrophages were stimulated with PMA at 50 to 500 pg / ml for 24 h. After
177 incubation period, the culture supernatants of these cells were recovered and showed a cytotoxic
178 activity on L-929 cells of 15% to 45% that suggest the presence of TNF-like. These cytotoxicity
179 percentages depended of PMA concentration used (Figure 2). Finally, in this investigation we showed
180 that armadillo MDM can to produce TNF-like with cytotoxic activity on L929 cells. This is similar to
181 what happens with the armadillo neutrophils when are stimulated with PMA (López-Hurtado and
182 Guerra-Infante, 2006; Guerra-Infante, et al., 2001).

183 4. Concluding remarks

184 We conclude that armadillo macrophages have good endocytic activity as well as of TNF production.
185 However, these cells show a low production of superoxide anion compared with neutrophils, but this
186 deficiency is reverted with presence or addition of interferon gamma.

187

188 **References**

189 Bagagli, E., Franco, M., Bosco, S.M., Hebel-Barbosa, F., Trinca, L.A., Montenegro, M.R.,
190 2003. High frequency *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus*
191 *novemcinctus*): an ecological study. *Med. Mycol.* 41, 217-223.

192

193 Chang, Z-L., 2009. Recent development of the mononuclear phagocyte system: In memory of
194 Metchnikoff and Erlich on the 100th anniversary of the 1908 Nobel prize in physiology or medicine.
195 *Biol. Cell.* 101, 709-721.

196

197 Deps, P.D., Antunes, J.M., Tomimori-Yamashita, J., 2007. Detection of *Mycobacterium leprae*
198 infection in wild nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*) using the rapid ML flow test.
199 *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 40, 86-87.

200

201 Guerra-Infante, F.M., López-Hurtado, M., Flores-Medina, S., Zamora-Ruiz, A., de Haro-Cruz, M.J.,
202 2001. Detection of a tumor necrosis factor-like activity in culture supernatants of armadillo leukocytes.
203 *Inter J Lepr. Other Mycobacter. Dis.* 69, 354-357.

204

205 James, S.L., 1995. Role of oxide nitric in parasitic infections. *Microbiol. Rev.* 59, 533-547.

206

207 Labro, M.T., 2000. Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: Immunomodulation or
208 "immuno-fairy tales?". *Clin. Microb. Rev.* 13, 615-650.

209

- 210 López-Hurtado, M., Flores-Medina, S., Díaz-García, F.J., Guerra-Infante, F.M., 2005. Partial
211 characterization of phagocytic activity in neutrophils of the nine-banded armadillo *Dasyus*
212 *novemcinctus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 106, 269-275.
- 213
- 214 López-Hurtado, M., Guerra-Infante, F.M., 2006. Functional characterization of neutrophils from nine-
215 banded armadillos (*Dasyus novemcinctus*; Edentata, Dasypodidae) infected with microfilariae. *Am. J.*
216 *Anim. Vet. Scien.* 1, 5-7.
- 217
- 218 López-Hurtado, M., Arteaga-Troncoso, G., Escobedo-Guerra, M.R., Guerra-Infante, F.M., 2009.
219 Evaluation of endocytic capacity and NADPH-oxidase activity from armadillo (*Dasyus novemcinctus*)
220 eosinophiles infected with microfilariae. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 127, 181–185.
- 221
- 222 Nakagawara, A., Nathan, C.F., Cohn, Z.A., 1981. Hydrogen peroxide metabolism in human
223 monocytes during differentiation in vitro. *J. Clin. Invest.* 68, 1243-1252.
- 224
- 225 Ostanin, D.V., Barlow, S., Shukla, D., Grisham, M.B., 2007. NADPH oxidase but not myeloperoxidase
226 protects lymphopenic mice from spontaneous infections. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355, 801–
227 806.
- 228
- 229 Peña, M.T. , Adams, J. E., Adams, L. B., Gillis, T. P., Williams, D. L., Spencer, J. S., Krahenbuhl, J. L.,
230 Truman, R.W., 2008. Expression and characterization of recombinant interferon gamma (IFN- γ) from
231 the nine-banded armadillo (*Dasyus novemcinctus*) and its effect on *Mycobacterium leprae*-infected
232 macrophages. *Cytokine.* 43, 124–13.
- 233
- 234 Pinet, F., Dupont, A., Bencherif, N., Guihot, A.L., Quatannens, B., Amouyel, P., 2003. Morphology,
235 homogeneity and functionality of human monocytes-derived macrophages. *Cell Mol. Biol.* 49, 899-905.
- 236

237

238 Rojas-Espinosa, O., Valderrama-Godoy, S., Arce-Paredes, P., 1996. NADPH-oxidase activity
239 triggered by endocytosis of yeast in circulating phagocytes of nine-banded armadillos
240 (*Dasypus novemcinctus*). Inter. J. Lepr Other Mycobacter. Dis. 64, 329-332.

241

242 Sasada, M., Kubo, A., Nishimura, T., Kakita, T., Moriguchi, T., Yamamoto, K., Uchino, H., 1987.
243 Candidacidal activity of monocyte-derived human macrophages: relationship between candida killing
244 and oxygen radical generation by human macrophages. J. Leukocyte Biol. 41, 289-294.

245

246 Schlensinger, L., Musson, R.A., Johnston, R.B., 1984. Functional and biochemical studies of
247 multinucleated giant cells derived from the culture of human monocytes. J. Exp. Med. 159, 1289-1294

248

249 Smith, S.D., Wheeler, M.A., Weiss, R.M., 1998. Detection of urinary tract infections by reduction of
250 nitroblue tetrazolium. Kidney Int. 54, 1331-1336.

251

252 Sutton, J.S., Weiss, L., 1966. Transformation of monocytes in tissue culture into macrophages
253 epithelioid cells, and multinucleated giant cells. J. Cell Biol. 28, 303-332.

254

255 Suzuki, S., Eguchi, N., 1999. Leukocyte differential analysis in multiple laboratory species by laser
256 multi-angle polarized light scattering separation method. Exp. Anim. 48, 107-114.

257

258 Takizawa, M., Chiba, J., Haga, S., Asano, T., Yamamoto, N., Honda, M., 2004. The normalization of
259 guinea pig leukocyte fractions and lymphocyte subsets in blood and lymphocyte tissues using flow
260 cytometric procedure. Exp. Anim. 53, 321-329.

261 .

262 Yoneyama, H., Yamamoto, A., Kosaka, H., 2001. Neuronal nitric oxide synthase generates superoxide

263 from the oxigenase domain. *Biochem. J.* 360, 247-253.

264

265 Young, H.A., Hardy, K.J., 1995. Role of interferon- γ in immune cell regulation. *J. Leuk. Biol.* 58, 373-

266 381

Table 1. Percentage of endocytosis and NBT reduction of monocytes and monocyte-derived macrophages (MDM) from armadillo (*Dasypus novemcinctus*)

Cell types	Percentage of Endocytosis	Percentage of NBT ^c
Monocytes n=5	60.66 ± 6.9 ^b	17.66 ± 4.08
MDM n=5	71.77 ± 4.11*	16.57 ± 4.79
MDM-stimulated ^a n=5	89.92 ± 6.17*	36.42 ± 4.31*

^aMonocyte-derived armadillo macrophages stimulated with recombinant human interferon- γ b 24 h

^bMedian and standard deviation

^cPercentage of nitroblue-tetrazolium reduction.

*Significant difference compared to armadillo monocytes by U-Mann-Whitney test $p < 0.001$

Figure

[Click here to download high resolution image](#)

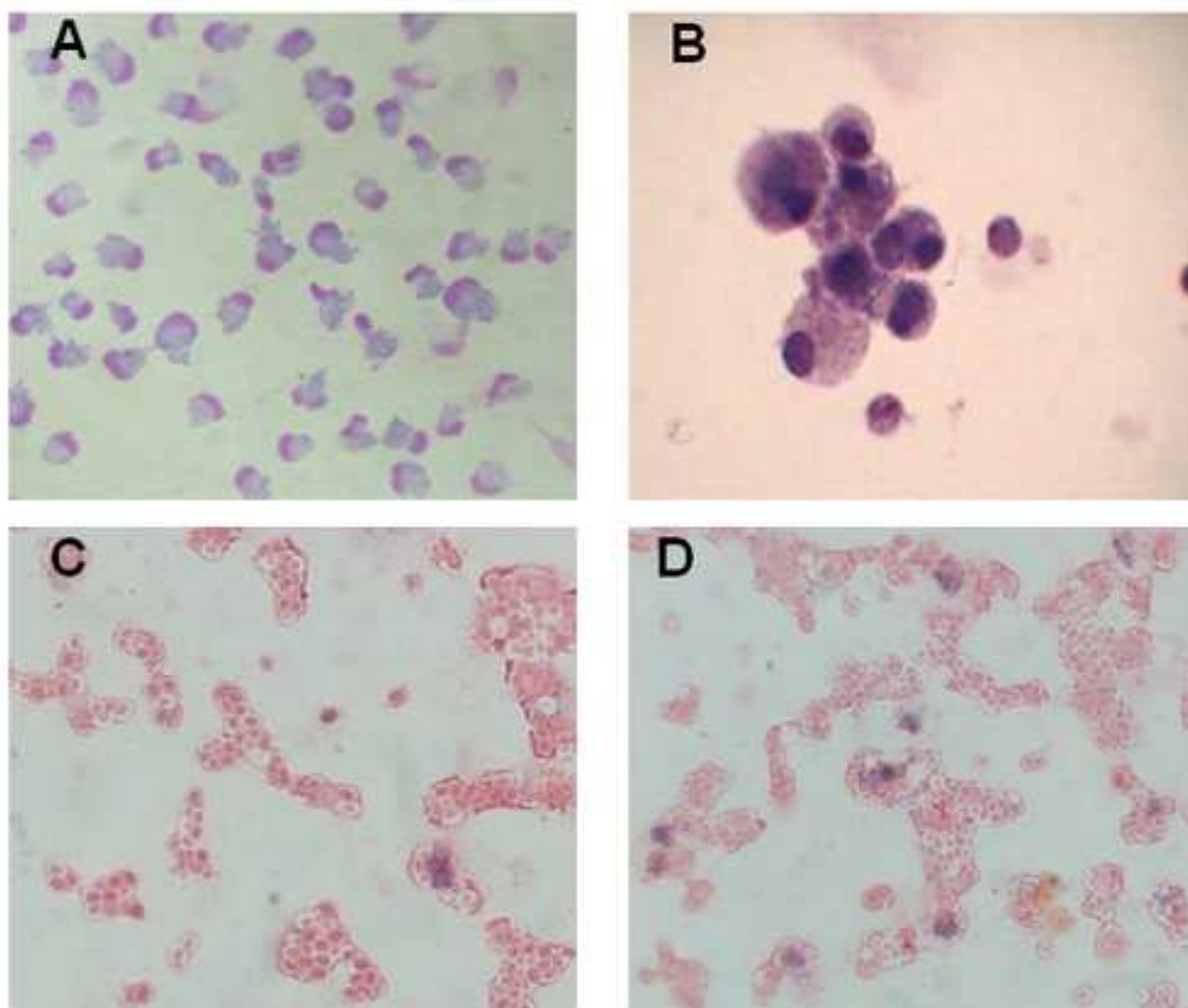


Figure 1. Endocytosis and NBT reduction activities of monocyte-derived armadillo macrophages. A) Armadillo monocytes incubated at 37° C in 5% of CO₂ by 24 h. B) Armadillo monocytes incubated at 37° C in 5% of CO₂ by 8 days, these cells were considered as monocyte-derived macrophages (MDM). C) Armadillo MDM carried out engulf yeast and NBT reduction. D) NBT reduction activity of armadillo MDM previously incubated with recombinant human interferon- γ by 24 h.

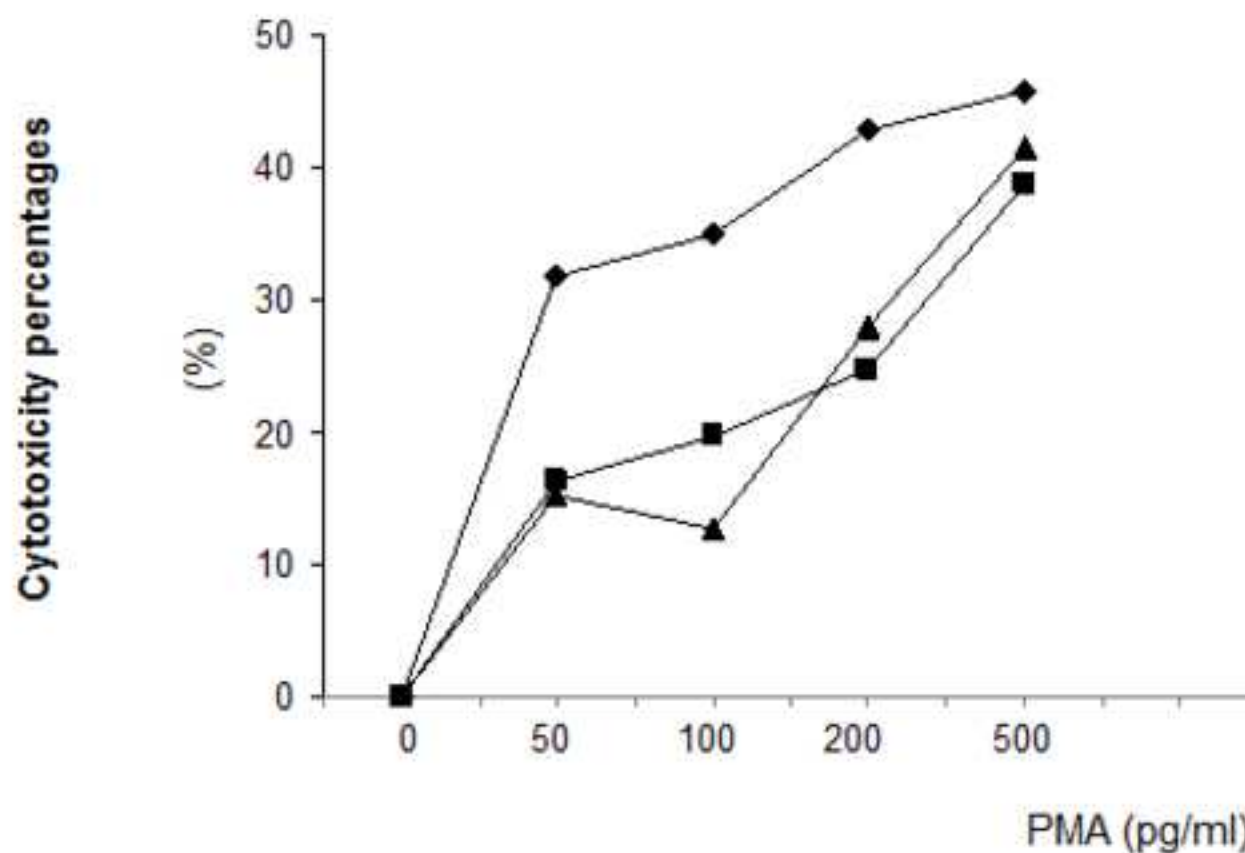


Figure 2. Effect of PMA on TNF-like release by armadillo MDM. Armadillo MDM were incubated with different concentrations of PMA. After 18 h incubation, culture supernatants of 3 armadillos were collected and TNF-like release was measured by bioassay with L929 cells.

From: BioMed Central Editorial (editorial@biomedcentral.com)
To: syramses@yahoo.com;
Date: Tue, April 27, 2010 11:45:15 PM
Cc:
Subject: Your article, MS: 1633324633856536 Molecular characterization of the delta-2 chain of t cell receptor from armadillo(Dasyus novemcinctus) lymphocytes

Dear Dr Escobedo-Guerra,

The files for your manuscript have been received by BMC Immunology. You will shortly receive a further e-mail that will provide you with links to the PDF that is now being generated and will be used for assessing it. At any time, you may log in to My BioMed Central (<http://www.biomedcentral.com/my/>) to view the status of the manuscript, or you can bookmark the URL of your manuscript:

http://www.biomedcentral.com/manuscript/login/man.asp?txt_nav=man&txt_man_id=1633324633856536

If you have any questions, please visit the BioMed Central Support Center (<http://www.biomedcentral.com/support/>) or e-mail us at editorial@biomedcentral.com.

Questionnaire

Thank you for submitting your research to BMC Immunology. To help us understand what is important to our authors, please take a minute to complete our simple online questionnaire by following this link:

<http://www.biomedcentral.com/survey/login/9251146911271151/1633324633856536/AS1/>

You may be prompted to log on when you follow this link.

Regards

The BioMed Central Editorial Team

Tel: +44 (0) 20 3192 2013

e-mail: editorial@biomedcentral.com

Web: <http://www.biomedcentral.com/>

Tue, April 27, 2010 11:45:15 PM
Article processing charge for manuscript submitted to BMC Immunology
From: BioMed Central Accounts
<payment@biomedcentral.com>
Add to Contacts
To: syramses@yahoo.com

MS: 1633324633856536
Molecular characterization of the delta-2 chain of [t cell receptor](#)
from armadillo (*Dasypus novemcinctus*) lymphocytes
Marcos R Escobedo-Guerra, Marcela López-Hurtado, Maria J de Haro-Cruz,
Miguel AA Ibañez-Hernández, [Aida V Rodríguez-Tovar](#) and Fernando M
Guerra-Infante
BMC [Immunology](#)

Dear Dr Escobedo-Guerra

Thank you for your recent submission to BMC Immunology. I would like to update you regarding your status with respect to the article processing charge that is normally due if a manuscript is accepted.

You have agreed to pay an article processing charge of GBP 1,125/USD 1,720/EUR 1,295 if your manuscript is accepted. Since you are based in [Mexico](#), you will be charged the price of GBP 1,125. Submissions from EU countries are subject to VAT at 17.5%.

Payment will become due if your manuscript is accepted for publication by the editors. We allow payment by credit card or invoice. Invoice payments are subject to an administrative charge of £50.00. The article processing charge must be paid before the manuscript will be published.

Kind regards,

BioMed Central Accounts Team
236 Gray's Inn Road
London
WC1X 8HL
Tel: +44 (0) 20 3192 2009
e-mail: payment@biomedcentral.com

Tue, April 27, 2010 11:46:15 PM

1633324633856536 Molecular characterization of the delta-2 chain of t cell receptor from armadillo (*Dasypus novemcinctus*) lymphocytes

From: BioMed Central Editorial <editorial@biomedcentral.com>
Add to Contacts
To: Marcos Ramses Escobedo-Guerra <syramses@yahoo.com>

Cc: Marcos Ramses Escobedo-Guerra <syramses@yahoo.com>; Marcos R Escobedo-Guerra <syramses@yahoo.com>; Marcela López-Hurtado <diacclaro2000@yahoo.com.mx>; Maria J de Haro-Cruz

<deharoc@yahoo.com.mx>; Miguel AA Ibañez-Hernández
<mibanez_01@hotmail.com>... more

Article title: Molecular characterization of the delta-2 chain of t
cell receptor from armadillo(Dasypus novemcinctus) lymphocytes
MS ID : 1633324633856536
Authors : Marcos R Escobedo-Guerra, Marcela López-Hurtado, Maria
J de Haro-Cruz, Miguel AA Ibañez-Hernández, Aida V Rodríguez-Tovar and
Fernando M Guerra-Infante
Journal : BMC Immunology

Dear Dr Escobedo-Guerra

Thank you for submitting your article. This acknowledgement and any
queries below are for the contact author. This e-mail has also been
copied to each author on the paper, as well as the person submitting.
Please bear in mind that all queries regarding the paper should be
made through the contact author.

A pdf file has been generated from your submitted manuscript and
figures. We would be most grateful if you could check this file and
let us know if any aspect is missing or incorrect. Any additional
files you uploaded will also be sent in their original format for
review.

http://www.biomedcentral.com/imedia/1633324633856536_article.pdf
(367K)

For your records, please find below link(s) to the correspondence you
uploaded with this submission.

http://www.biomedcentral.com/imedia/1746154588385671_comment.pdf

If the PDF does not contain the comments which you uploaded, please
upload the [cover letter](#) again, click "Continue" at the bottom of the
page, and then proceed with the manuscript submission again. If the
letter will not upload, please send a copy to
editorial@biomedcentral.com.

We will assign [peer reviewers](#) as soon as possible, and will aim to
contact you with an initial decision on the manuscript shortly. The
submitting author can check on the status of your manuscript in [peer
review](#) at any time by logging into 'My BioMed Central'
(<http://www.biomedcentral.com/my>).

In the meantime, if you have any queries about the manuscript you may
contact us on editorial@biomedcentral.com. We would also welcome
feedback about the online submission process.

Best wishes,

The BioMed Central Editorial Team

Tel: +44 (0) 20 3192 2013

e-mail: editorial@biomedcentral.com

Web: <http://www.biomedcentral.com/>



**MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE DELTA-2 CHAIN OF T CELL
RECEPTOR FROM ARMADILLO (*Dasybus novemcinctus*) LYMPHOCYTES**

**Marcos R Escobedo-Guerra^{1,2}, Marcela López-Hurtado¹, Maria J de Haro-Cruz²,
Miguel AA Ibáñez-Hernández³, Aida V Rodríguez-Tovar⁴, Fernando M Guerra-
Infante^{1,§}.**

¹Laboratorio de Virología, Depto. de Infectología e Inmunología Perinatal, Instituto Nacional de Perinatología. Montes Urales No. 800, Col. Lomas Virreyes, 11000, D.F., Mexico.

²Laboratorio de Microbiología Veterinaria, Depto. de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. Plan de Ayala y Prol. de Carpio, Col. Casco de Sto. Tomás, 11340, D.F., Mexico.

³Laboratorio de Biomembranas, Depto. de Bioquímica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. Plan de Ayala y Prol. de Carpio, Col. Casco de Sto. Tomás, 11340, D.F., Mexico.

⁴Laboratorio de Micología Médica, Depto. de Microbiología Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. Plan de Ayala y Prol. de Carpio, Col. Casco de Sto. Tomás, 11340, D.F., Mexico.

*These authors contributed equally to this work

§Corresponding author

Email addresses:

MREG: syramses@yahoo.com

MLH: diaclaro2000@yahoo.com.mx

MJHC: deharoc@yahoo.com.mx

MAAIH: mibanez_01@hotmail.com

AVRT: avrodriguez@hotmail.com

FMGI: fguerra_96@yahoo.com

Abstract

Background: The armadillo is considered the most suitable experimental model to study leprosy. However, its immunological response is scarcely known and T lymphocytes have not been identified.

Results: Bioinformatics results shows that δ -2 chain of TCR $\gamma\delta$ from armadillo (DTRDV2) is very similar than the human (TRDV2). The nucleotide and aminoacidic sequences present a homology value of 87% and 56% respectively. Furthermore, they share antigenic sites but with significant differences. Also the third structure analysis predicted that the model created is possible and stable. Anyway, this research was aimed at obtaining antibodies able to recognize the armadillo lymphocytes as biological assay about likeness with human delta-2 chain. A recombinant protein was obtained from an armadillo DNA sequence that is homologous to the variable region of gene *trdv2* that encodes the human $\gamma\delta$ T receptor. The region was amplified and inserted in the clonation vector *pFIK T7 Flexi*®. The protein was purified and inoculated intraperitoneally into BALB/c mice. The mice serum recognized 30 to 35% of the lymphocytes from peripheral blood of *Dasyus novemcinctus* and only 1% of the human lymphocytes by flow cytometry.

Conclusion: In conclusion, peripheral blood of the armadillo reveals a subpopulation of lymphocytes with a δ chain that is homologous to the human δ -2 chain of TCR $\gamma\delta$; this cell population corresponds probably to $\gamma\delta$ T lymphocytes.

Background

It is known since 1971 that the nine-banded armadillo is susceptible to experimental infection with *Mycobacterium leprae*, suggesting that this mammal could be a model to study the relation host-parasite of this mycobacterium and the armadillo [1,2]. However, the research on this relation has not progressed because the immunological response of the armadillo is not known completely. One of the most important aspects is to identify and quantify the lymphocytes of peripheral blood, but this has only been achieved with B lymphocytes [3], whereas it is not known at all how to identify T lymphocytes. The literature presents reports that suggest the presence of lymphocytes in the peripheral blood of the armadillo showing the receptor for sheep erythrocytes, but their percentage is lower than that reported for human T lymphocytes (<49%) [4]. It has also been documented that there is cross-reactivity of monoclonal antibodies against $\gamma\delta$ receptor of human T cell (TCR $\gamma\delta$) that recognize armadillo lymphocytes [5]. However, these results have not been conclusive, since our research group has been unable to identify this cellular population by using different monoclonal antibodies against human TCR $\gamma\delta$ (unpublished data).

To this moment, it has been reported that all mammalian species show lymphocytes with TCR $\gamma\delta$ [6], suggesting the possible presence of these subpopulations in the armadillo. According to evolutionary studies, $\gamma\delta$ -chain of T cell receptor pertain to the immunoglobulins family and derive from a common ancestor [7]. Has been demonstrated that the human anti-IgG and anti-IgM sera are able to recognize armadillo immunoglobulins, confirming the

possible cross-reactivity that exists between the human proteins and those from the armadillo [8]. In addition, a large homology among the cytokines of both mammals has been demonstrated [9]. Based on the aforementioned, the objective of this research was to characterize molecularly by mean bioinformatics analyses the likeness between the human δ -2 chain and armadillo δ -2 chain as well as to identify lymphocytes with this δ -2 chain in the peripheral blood of the armadillo by biological assay using mice antibodies against recombinant protein from armadillo δ -2 chain obtained by clonation in *Escherichia coli* JM109 cells.

Results

Analysis of nucleotide sequences

The identities percentage determination of the *dtrdv2* gene of *Dasypus novemcinctus* and *trdv2* gene of *Homo sapiens* is presented in the Fig. 1. Nucleotide sequence analysis of the amplified fragment showed a high degree of homology (87%) to the sequences reported in Genbank, human *trdv2* gene. These sequences were also analyzed with the *ClustalW2* (European Bioinformatics Institute) and *MultAlin* program (Multiple Sequence Alignment with Hierarchical Clustering vers. 5.4.1, Copyright I.N.R.A. France 1989, 1991, 1994, 1996), which confirmed the previously obtained homology between sequences of *trdv2* from human and armadillo (87%).

The phylogenetic relationships among major evolutionary lineage of some vertebrates (*Macaca mulata*, *Aotus spp*, *Sus scrofa*, *Gallus gallus*, *Isoodon spp*, *Epipedobates spp*, *macropus spp*, *Ovis aries*, *Bos Taurus*, *Equus spp*, *Rattus rattus*, *Mus musculus*, *Oryctolagus cuniculus*, *Dasypus novemcinctus* and *Homo sapiens*) were investigated using partial sequences of *trdv2* reported previously for these vertebrates animals. The phylogenetic trees

were generated by different programs (Multalin, Bioedit and MAFFT), and position of *D. novemcinctus* not change and appeared to be stable (Figure 2). The armadillo's sequence was including in the cluster of *Aotus*, *Macaca* and *Homo sapiens* sequences. Also, several clusters formed according to the main typical of the different analyzed species (Fig. 2).

Molecular analysis of the DTRDV2 protein

The peptide translated from the open reading frame found in the 319 bp fragment shares 56.31% of identity with the TRDV2 proteins of Human (Fig. 1).

We have obtained the first low resolution structure of the native protein of *D. novemcinctus* (DTRDV2). This protein was created by homology modeling of vertebrate protein using as template the 2.0 Å resolutions of human TRDV2 proteins. The template was chosen after a careful analysis of the degree of homology between the TRDV2 proteins of several vertebrates reported in the Protein Data Bank (PDB). The aminoacid sequence of the native protein of *Dasypus* was alignment with the Swiss-Model program. A high homology of native protein of *D. novemcinctus* was obtained when it was compared with the crystal structure of a human Vgamma9/Vdelta2 T cell receptor (PDB:1hxm).

The first crude structure of DTRDV2 was generated using the database of the Swiss-PdbViewer program and the whole structure refined using the GROMOS 96 43b1 force field program in a conditions of dielectric constant of 81.04 (water) and 4.0 (protein). The final structure possesses 8 strand-twisted β -sheets and several extended loops, which it is similar to human 1hxm protein. Three different structures in both were determinate: The first was in the section that includes the Val18 aminoacid to Val22 aminoacid where the β -sheet of armadillo DTRDV2 protein is smaller than 1hxm. The second difference is located in the residue Gln68

to Ser69 where exists a α -helix motif in 1hxm. And finally, the third difference is located in the residue Ser77 where the β -sheet of DTRDV2 is more extended than 1hxm (Figure 3).

The 1hxm structure (template) obtained by analysis of the Ramachandran diagram Φ - Ψ plots was used to compare the overall stereochemical quality of DTRDV2 protein structures against template solved by biocrystallography. The DTRDV2 aminoacids present over 97.08% of the residues in the most favorable regions (Fig. 4). The same analysis for crystallographic structure present 80.58% of residues in the favorable regions, 16.50% additional allowed regions and 2.91% disallowed regions, which strongly indicates that the molecular models present good overall stereochemical quality. The values obtained for DTRDV2 are very similar to the obtained ones for 1hxm (94.17% in the most favorable regions, 80.58% in favorable regions, 14.56% in allowed regions and 5.82% in disallowed regions).

Antigenic prediction

The immunogenicity analysis using the Antigenic program indicated that TRDV2 protein has 2 epitopes (1 and 2 epitopes classification) while DTRDV2 protein has 3 epitopes (3-5 epitopes classification) they are distributed throughout the protein (Table 1). In epitopes 1 and 5 according to epitopes classification show the same Leu84 aminoacid which owns the greater score protein antigenicity prediction, however aminoacid sequences are different between 1 and 5 epitopes (50%). Also, 2 and 3 epitopes are included in the same region but with aminoacid sequences different for example the aminoacids with the highly score are in different position Ser21 and Thr19 respectively. Furthermore the sequences present/display a homology of the 45% (Table 1).

Biological demonstration of *Dasyurus novemcinctus* dtrdv2 gene

The open reading frame of *D. novemcinctus* dtrdv2 coding gene was amplified by PCR, using genomic DNA as template and oligonucleotides encompassing a *SfgI* and a *PmeI* site besides the 5' and 3' end coding regions. The trdv2 gene was identified by means of PCR amplification of the 319 bp product in both human and armadillo DNA (Fig. 5). The PCR products were sequenced and analyzed with *BLASTn* software of the NCBI server. A 87% homology in nucleotide sequences was observed between nucleotide and aminoacidic sequences present a homology value of 87% and 56% respectively

One strategy was used to clone the PCR product into the expression vector *pF1K T7 Flexi*®; a direct cloning of amplified product into the *SfgI* and *PmeI* sites. The construction was used to transform *E. coli* (JM-109) cells. The initial detection of DTRDV2 produced by transformants was performed by SDS-PAGE. The electrophoresis analysis showed the presence of a band with concentration major the expected size. Eight *E. coli* JM109-positive clones for the DTRDV2 protein confirmed the presence of one band of approximately 11 kDa (Fig. 5), *in silico* value similar calculated by the *Compute pI/Mw* software (5.26 isoelectric point / 11258.84 daltons). Recombinant protein was then purified and concentrated by electroelution (BIORAD, USA) and *Microcon*® *Centrifugal Filter Devices* (Millipore, USA), respectively.

Biological assay

For demonstration of the utility of DTRDV2 recombinant protein in identification of armadillo lymphocytes, this protein was inoculated in BALB/c mice with aim obtain antibodies against DTRDV2 protein. The mice sera were used for the identification and quantification of armadillo lymphocytes with the homologous delta T cell receptor. Figure 6

depicts the recognition of armadillo lymphocytes by these sera as assessed by flow cytometry. The percentage of lymphocytes identified by the mice sera against DTRDV2 protein was of 30 to 35% for armadillo lymphocytes and of 1% for human lymphocytes. In other assay, a monoclonal antibody against human TCR $\gamma\delta$ of Immunotech Coulter (FL, USA) identified only 5 to 8% of human lymphocytes and 0% of armadillo lymphocytes (Fig. 6).

Discussion

T lymphocytes with the $\gamma\delta$ receptor (TCR $\gamma\delta$) constitute a subpopulation of lymphocytes that have been identified as predominate cells in the peripheral blood of some mammals [10,11], in humans, the percentage of these cells is low [12]. The presence of these cells with the TCR $\gamma\delta$ in armadillo has also been confirmed by monoclonal antibody TCR δ 1 against human at different proportions (5.7-27%) depending on the analyzed tissues [5]. However, not all monoclonal antibodies anti-TCR $\gamma\delta$ against human have been useful for the identification of this cell population, as observed by our research group (data not shown).

During lymphocytes maturation, the variable gene segments, for diversity and binding (V-D-J) [13], of the TCR become organized to create both the genetic and structural diversity [14,15]. The analyses on the tridimensional structure of the TCR $\gamma\delta$ revealed that the *trdv2* gene is included in the A, C, E, and G chains of this receptor with the V γ 9V δ 2 phenotype [16]; these data have been ratified in the tridimensional models reported in the Protein Data Bank (PDB). The *in silico* analysis revealed that the *trdv2* gene presents a lower variability than the genes reported for the human *trdv1*, *trdv3*, *trdv4*, and *trdv5* subgroups, therefore it was decided to use the gene *trdv2*. In addition, by means of phylogenetic analyses, it is known that there are differences among the *trdv* subgroups of diverse animal species, whereas for the *trdv2* gene the genetic variations are minimal among mice, humans, bovines, pigs, and birds

[17]. In this research, we demonstrated that the *dtrdv2* gene from the armadillo is homologous to the human *trdv2* gene, which synthesizes the variable region 2 of the delta chain of human T lymphocytes. Sequencing of the bases of the armadillo *dtrdv2* gene revealed an 87% homology with the human *trdv2* gene, with a molecular size of 319 bp, the sequence was identical to that of the human *trdv2* gene, hence. The amino acids sequence of the armadillo gene evidenced a 56.31% similitude with the aminoacid sequences of the human TRDV2 protein.

The structure of armadillo DTRDV2 aminoacid sequences was evaluated by Swiss-model program. According with model prediction the armadillo DTRDV2 aminoacid sequences have similar structure that human TRDV2 protein, however we can observe three conformational changes that may be involved in the recognition by the antibodies used. In the same context, we evaluated the potential utility of the *in silico* methods for the structure prediction and the determination of immunogenic regions in the DTRDV2 protein of *Dasypus novemcinctus*.

In the actual study, we have used the Antigenic program (Pasteur institute) which is based on amino acid frequencies in antigenic domains and typical chemistry, to foretell potentially immunogenic regions in a protein [18]. The application of this method to a large number of proteins allowed an accuracy of 75%. The immunogenicity prediction according to the full length TRDV2 protein warns that the epitopes are distributed throughout the protein. The latter was found in experimentally immunized mice in this work.

The antigenic prediction analysis of armadillo DTRDV2 aminoacid sequences was evaluated by Antigenic Prediction program. According to the prediction of antigenicity DTRDV2 like TRDV2 presented similar antigenic regions, however in the epitopes 1 and 5, the aminoacid sequences around them are 50% different. Also, in epitopes 2 and 3 on site

with the highest score of antigenicity differed in the amino acid and its position. This would explain why the several monoclonal antibodies anti- $\delta\gamma$ TCR against human are not able to recognize to armadillo lymphocytes.

The epitope prediction by means of immunoinformatic software and databases has been a useful tool to simplify epitope design that could be synthesized as peptides and used instead of the antigen in antibody production against this epitope [19,20]. Recent studies have found a high titer and a good specificity of the anti-mouse AdipoR-1 antibodies, following immunization using the selected peptides by bioinformatics analysis [21].

This homology of genes and proteins between humans and the armadillo is not unexpected. In 1979, was observed that rabbit antibodies against human proteins can recognize immunoglobulins of armadillo [8]. Likewise, some cytokine genes have been identified recently in the armadillo DNA that depict a great similitude with the sequences of nucleotides and of amino acids of human cytokine genes. Other studies demonstrated the presence of a molecule with similar activity to that of the alpha-tumor necrosis factor (α -TNF) in the supernatant of a leukocytes culture of *D. novemcinctus* [9]. In addition, De Jong *et al.* [22] cloned and sequenced a fragment of the TNF gene in another armadillo species (*Cabassous unicinctus*), which presented an 88% homology with its human counterpart [22]. Has recently been made the amplification and identification of the mRNA of IL-1 from armadillo leukocytes stimulated with phorbol myristate acetate (PMA); the sequence of bases obtained showed a 99% similitude with the sequences of bases reported for the human IL-1 α [23]. Similar studies have been performed with INF- γ by obtaining a recombinant molecule of this cytokine [24].

The 12 kDa DTRDV2 protein obtained from the heterologous expression of this gene revealed antigenic activity that it was able to induce production of antibodies in the inoculated

mice. The sera from these mice recognized lymphocytes from the peripheral blood of armadillo at a 30 to 35% proportion; this percentage is higher than reported data by Lathrop *et al.* [5], they describing that the anti-TCR delta-1 human monoclonal antibody from “T-cell Diagnostics Enterprise” (USA) is able to recognize from 5.7 to 27% of the lymphocytes from the peripheral blood of armadillos infected or not with *M. leprae*. This monoclonal antibody is specific to quantify human T cells presenting the TCR $\gamma\delta$, as well as lymphocytes of some non-human primate species [6]. The difference in percentage obtained between mouse anti-DTRDV2 antibody and the monoclonal anti-delta chain-1 antibodies is probably due to the presence of different epitopes that recognized each of the antibodies [25,26].

Another important aspect on the selection of the trdv2 gene is that the V γ 9V δ 2 phenotype of the T $\gamma\delta$ cells is able to recognize non-peptidic phosphated compounds, such as isopentyl pyrophosphate (IPP), which is a natural ligand isolated from mycobacteria [27,28,29,30], as well as from recognizing dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP) and the geranyl pyrophosphate (GPP) of oncological origin [31,32]. Likewise, T-cells with $\gamma\delta$ -receptor exhibit a high reactivity with the TUBag 1-4 phosphoantigens present in mycobacteria [33,34], which could be useful to study the association between *Mycobacterium* antigens and lymphocytes from *M. leprae*-infected armadillos, as has been reported with human V γ 9V δ 2 lymphocytes [34].

On the other side, the use of a anti-human TCR $\gamma\delta$ monoclonal antibody against armadillo lymphocytes not identify these cells (0%), whereas for human lymphocytes was of 5 to 7%. When assessing the activity of the mouse anti-armadillo DTDRV2 sera was able to recognize 2% of human lymphocytes, this difference to come to probably in the recognition site and in the structural conformation of the epitope.

In this work, we demonstrate that the DTRDV2 protein is homologous to human TRDV2. Furthermore, this protein is antigenic and can induce antibodies that recognize to armadillo lymphocytes that could be T-lymphocytes with $\gamma\delta$ receptors; this antibody could be a potential tool for the purification and identification of lymphocytes able to recognize pathogens of the *D. novemcinctus* armadillo, which would allow for in-depth studies on the host-parasite relation generated during the infection by these pathogens.

References

1. Kirchheimer WF, Storrs EE: **Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus*) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo.** *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1971, **39**: 693-702
2. Storrs EE: **The nine band armadillo: a model for leprosy and other biomedical research.** *Int J Lepr Other Mycobact* 1971, **39**: 703-714
3. Santos-Argumedo L, Guerra-Infante F, Posadas-Lopez A, Quesada-Pascual F, Estrada-Parra S: **Immune response of armadillos (*Dasypus novemcinctus*). I. Use of lectins to identify lymphocyte subpopulations and to evaluate cell proliferation.** *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1995, **63**: 546-551
4. Escobar-Gutierrez A, Amezcua ME: **El armadillo: un nuevo animal de experimentación para el estudio de la zoonosis.** *Cien Vet* 1998, **3**: 200-224
5. Lathrop G, Scollard DM, Dietrich M: **Reactivity of a population of armadillo lymphocytes with an antibody to human T-cells.** *Clin Immunol* 1997, **82**: 68-72

6. Steinle A, Groh V, Spies T: **Diversification, expression, and $\gamma\delta$ T cell recognition of evolutionarily distant members of the MIC family of major histocompatibility complex I-related molecules.** *Proc Natl Acad Sci* 1998, **95**: 12510-12515
7. Litman GW, Cannon JP, Dishaw LJ: **Reconstructing immune phylogeny new perspectives.** *Nature Rev Immunol* 2005, **5**: 866-879
8. Negassi K, Closs O, Harboe M: **Cross-reactions between serum proteins and water soluble liver tissue antigens of the nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn.) and man.** *Clin Exp Immunol* 1979, **38**: 135-147
9. Guerra-Infante FM, Lopez-Hurtado M, Flores-Medina S, Zamora-Ruiz A, De Haro-Cruz Ma. J: **Detection of a tumor necrosis factor like activity in culture supernatants of armadillo leukocytes.** *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 2001, **69**: 354-357
10. Mackay CR, Hein WR: **A large proportion of bovine T cells express the $\gamma\delta$ T cell receptor and show a distinct tissue distribution and surface phenotype.** *Int Immunol* 1989, **1**: 540-545
11. Hein WR, Mackay CR: **Prominence of T cells in the ruminant immune system.** *Immunol Today* 1991, **12**: 30-34
12. Jitsukawa S, Faure F, Lipinski M, Triebel F, Hercend T: **A novel subset of human lymphocytes with a T cell receptor-gamma complex.** *J Exp Med* 1987, **166**: 1192-1197
13. Zhong XP, Carabana J, Krangel MS: **Flanking nuclear matrix attachment regions synergize with the T cell receptor δ enhancer to promote V(D)J recombination.** *Proc Natl Acad Sci* 1999, **96**: 1970-1975

14. Kohr B, Wehrly TD, Sleckman BP: **Chromosomal excision of TCR δ chain genes is dispensable for $\alpha\beta$ T cell lineage commitment.** *Int Immunol* 2005, **17**: 225-232
15. Thierry-Pascal B, Vivien H, Nicolas PI, Fatena B, Denys C, Marie-Paule L, Jouvin-Marche E, Marche PN, Demongeot J: **IMGT/GeneInfo: T cell receptor gamma TRG and delta TRD genes in database give access to all TR potential V(D)J recombinations.** *BMC Bioinformatics* 2006, **7**: 224-230
16. Allison TJ, Winter CC, Fournie JJ, Bonneville M, Garboczi DN: **Structure of a human gamma delta T-cell antigen receptor.** *Nature* 2001, **411**: 820-824
17. Antonacci R, Lavane C, Del Faro L, Vaccarelli G, Ciccarese S, Massari S: **Artiodactyl emergence is accompanied by the birth of an extensive pool of diverse germline TRDV1 genes.** *Immunogenetics* 2005, **57**: 254-266
18. Kolaskar AS, Tongaonkar PC: **A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens.** *FEBS Lett* 1990, **276**: 172-174
19. Leinikki P, Lehtinen M, Hyoty H, Parkkonen P, Kantanen ML, Hakulinen J: **Synthetic peptides as diagnostic tools in virology.** *Adv Virus Res* 1993, **42**: 149-186
20. Tirola T, Jaakkola A, Bloigu A, Paldanius M, Sinisalo J, Nieminen MS, Silvennoinen-Kassinen S, Saikku P, Jauhiainen M, Leinonen M: **Novel enzyme immunoassay utilizing lipopolysaccharide-binding protein as a capture molecule for the measurement of chlamydial lipopolysaccharide in serum.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006, **54**: 7-12
21. Xu YW, Yan L, Liu H, Wu Y, Wu BW: **Bioinformatics analysis of mouse adiponectin receptor-1 and its antibody preparation.** *Sheng Li Xue Bao* 2008, **60**: 156-160

22. De Jong WW, van Dijk MAM, Poux C, Kappé G, van Rheede T, Madsen O: **Indels protein-coding sequences of Euarchontoglires constrain the rooting of eutherian tree.** *Mol Phylogenet Evol* 2003, **28**: 328-340
23. Flores-Medina S, Díaz-García FJ, Guerra-Infante FM: **Secuenciación de un fragmento de ADNc homólogo a interleucina-1 alfa humana derivado de leucocitos de armadillo (*Dasyus novemcinctus*).** *Rev Vet Mex* 2009, **39(3)**: 341-347
24. Peña MT, Adams JE, Adams LB, Gillis TP, Spencer JS, Krahenbuhl JL, Truman RW: **Expression and characterization of recombinant interferon gamma (IFN-gamma) from the nine-banded armadillo (*Dasyus novemcinctus*) and its effect on *Mycobacterium leprae*-infected macrophages.** *Cytokine* 2008, **43**: 124-131
25. Lewis SM: **The mechanism of V(D)J joining: lessons from molecular, immunological, and comparative analyses.** *Adv Immunol* 1994, **56**: 127-150
26. Bassing CH, Tillman RE, Woodman BB, Canty D, Monroe RJ, Sleckman BP, Alt FW: **T cell receptor (TCR) locus enhancer identity and position are critical for the assembly of TCR and variable region genes.** *Proc Natl Acad Sci* 2003, **100**: 598-603
27. Constant P, Davodeau F, Peyrat MA, Poquet Y, Puzo G, Bonneville M and Fournie JJ: **Stimulation of human $\gamma\delta$ T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands.** *Science* 1994, **264**: 267-270
28. Tanaka Y, Morita CT, Nieves E, Brenner MB, Bloom BR: **Natural and synthetic nonpeptide antigens recognized by human $\gamma\delta$ T cells.** *Nature* 1995, **375**: 155-158
29. Gober HJ, Kistowska M, Angman L, Jenó P, Mori L, De Libero G: **Human T cell receptor gamma delta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells.** *J Exp Med* 2003, **197**: 163-168

30. Poupot M, Fournie JJ: **Non-peptide antigens activating human V γ 9V δ 2 T lymphocytes.** *Immunol Lett* 2004, **95**: 129-138
31. Gallagher M, Obeid P, Marche PN, Jouvin-Marche E: **Both TCR α and TCR δ Chain Diversity Are Regulated During Thymic Ontogeny.** *J Immunol* 2001, **167**: 1447–1453
32. Hans-Jürgen G, Kistowska M, Angman L, Jenö P, Mori L, de Libero: **Human T cell receptor, receptor cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells.** *J Exp Med* 2003, **197**: 163-168
33. Haregewoin A, Soman G, Hom RC, Finberg RW: **Human gamma delta+ T cells respond to mycobacterial heat shock protein.** *Nature* 1989, **340**: 309-312
34. Rojas RE, Torres M, Fournie JJ, Harding CV, Bomm WH: **Phosphoantigen presentation by macrophages to mycobacterium tuberculosis-reactive V γ 9V δ 2 cells: modulation by chloroquine.** *Infect Immunol* 2002, **70(8)**: 4019-4027
35. Ahmad NN, Unjeing AB, Donoso LA: **Modification of standard proteinase K/phenol method for DNA isolation to improve yield and purity from frozen blood.** *J Med Genet* 1995, **32**: 129-130
36. Zor T. and Selinger Z: **Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies.** *Anal Biochem* 1996, **236**: 302-308
37. Bjellqvist B, Basse B, Olsen E, Celis JE: **Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions.** *Electrophoresis* 1994, **15**: 529-539

Methods

Bioinformatics analysis

We designed specific primers based on the *in silico* analysis of human TCR $\gamma\delta$ using the *blastn* program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and Multalin software. In the first place, we identified the region in where the sequence were of least variability, being this variable 2-region of the δ chain. The analysis was made with the sequences reported for the gene *trdv2* (Genbank:AE000661, gi: 2358060), this gene is part of the TCR $\alpha\delta$ or TCRAD locus. The primers *trdv2-f* (5'...TAAAGCGATCGCCATGTCAGCCATTGAGTTGGTGCC...3) and *trdv2-r* (5'...GACGGTTTAAACGGTGTCACAGGCACAGTAGTAAGACCC...3') were designed by *Flexi*® *Vector Primer Design Tool* to amplify the region between 176,698 and 176,999 bp (Genbank:AE000661.1) of the human TCR $\alpha\delta$ locus and obtaining a 319 bp amplification product.

Amplification of a DNA fragment of gene *dtrdv2* from *D. novemcinctus*

The DNA purification from armadillo was performed according to the method described by Ahmad [35]. The homologous armadillo *dtrdv2* gene was amplified by PCR using 50 ng of either armadillo or human DNA with the GoTaq protocol (Promega, USA). Amplification conditions were: 94°C for 5 min, 35 denaturing cycles at 94°C for 1 min, alignment at 60°C for 1 min, polymerization at 72°C for 1.5 min, and a final polymerization cycle at 72°C for 10 min, using a PTC-100 thermocycler (MJ Research Inc., USA). PCR products were separated on 2% agarose gels and purified with the *QIAquick*™ *Gel Extraction Kit* system (QIAGEN, Germany).

Clonation and analysis of the *dtrdv2* gene of armadillo

The 319 bp fragment of the *dtrdv2* gene was cloned in the *pFIK T7 Flexi*® vector and the plasmid was propagated in *Escherichia coli JM109* cells following the *Technical Manual Flexi*® *Vector Systems* protocol. Plasmidic DNA was isolated from each clone with the *GFX*™ *Micro Plasmid Prep* kit (Amersham Pharmacia Biotech, USA). Clones were confirmed by amplifying the cloned fragment using primers *trdv2-f* and *trdv2-r*, under the above described conditions, aside from sequencing them to confirm their presence.

The analyzed clones were cultivated in LB medium supplemented with kanamycin (50µg/mL) for peptide expression. Transformant cells were lysed adding 500 µL of the lysis buffer (50 mM K₂HPO₄, 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10% glycerol, 0.5% Triton X-100) and subjecting them to a thermal shock at 42°C to -150°C in liquid nitrogen. The protein profile of each clone was observed through 12% SDS-PAGE under reducing conditions and the recombinant protein was identified by comparing the protein pattern of the negative control (non-transformed *E. coli JM109*) against the positive clones.

The protein band was purified by electro-elution (BIORAD, USA) using a membrane with a higher than 10 kDa exclusion limit. The concentration of the DTRDV2 protein was adjusted by means of *Microcon*® *Centrifugal Filter Devices* columns (Millipore, USA). Protein concentration was determined by the micro-Bradford technique [36].

Molecular analysis

The 319 bp PCR products were sequenced using the *SEQ4x4 Personal Sequencer System* (Amersham, Biosciences, USA) and the *ABI PRISM*® *310 Genetic Analyzer PE* (Applied Biosystems, USA). The *dtrdv2* sequence was analyzed to compare their relationship with other reported sequences of vertebrate animals with different programs (Multalin, Bioedit and MAFFT).

The 319 bp amplification product was translated to aminoacidic sequence (<http://expasy.ch/tools/dna.html>). Additionally, the molecular weights (Mw) of the selected regions were determined by the computer pI/Mw tool http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html [37].

Alignments of the homologous TRDV2 protein of armadillo (DTRDV2) and determination of percentage identity TRDV2 protein sequences of human were retrieved from the NCBI database in FASTA format. The Needle program was used to perform global pair wise alignments of sequences for determining identities percentage between TRDV2 proteins and/or peptides (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>). TRDV2 was used as the reference sequence for all alignments performed. The ClustalW2 program was used to construct multiple aminoacid sequence alignments using the default parameters (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>) [16].

Likewise, we use the Swiss-Model program to generate a potential model for the tertiary structure of the DTRDV2 protein by comparing the amino acid sequence with the structures published in the Protein Data Bank (PDB).

Antigenicity prediction

Antigenicity prediction was performed using the Antigenic program of the Pasteur Institute (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/antigenic.html>). This program predicts potentially antigenic regions of a protein, using the method of Kolaskar and Tongaonkar [18].

BalB/c mice immunization

Five BALB/c mice were intraperitoneally inoculated with 100 µg of the recombinant protein (DTRDV2) with complete Freund's adjuvant. Five days thereafter, 200 µL of peripheral blood

were collected and we assessed the presence of anti-DTRDV2 antibodies through flow cytometry using armadillo or human lymphocytes.

Flow cytometry

Armadillo or human lymphocytes ($1 \times 10^6/\text{ml}$) purified [3] was placed in special assay tubes for flow cytometry (BD, Falcon 352058). One of the assay tubes was supplemented with 20 μL of the serum from the DTRDV2 protein-inoculated mice, another tube was supplemented with serum of the non-inoculated mice (negative control) and other tube 20 μL of monoclonal antibody against human $\text{TCR}\gamma\delta$ conjugated to FITC (Immunotech Coulter, FL, USA) were added, these antibodies were used as control to identify the human cells with this receptor. After washing, 10 μL of goat anti-mouse IgG antibodies-FITC (Zymed, CA, USA) was added at first and second tubes. Tubes were incubated at room temperature for 20 min in the dark. After the incubation time, cells were washed twice with PBS-azide-FCS. After the last washing, cells were resuspended in 1 mL of PBS-azide-formaldehyde solution (PBS-azide supplemented with 10% formaldehyde). Cells were then quantified through flow cytometry (EPICS ALTRA, Coulter Corporation. Miami, Florida USA).

Figures

Figure 1 Alignments of nucleotide and aminoacid sequences of delta 2 chain of the TCR $\gamma\delta$.

Analysis was performed using the Blosum62 matrix from the *ClustalW2* program from EMBL-EBI; A) An 87% homology was observed between the genes sequences. B) A 56.31% homology was observed between both aminoacid sequences: "*" means that the residues or nucleotides in that column are identical in all sequences in the alignment, ":" means that conserved substitutions have been observed, according to the COLOUR table above and "." means that semi-conserved substitutions are observed.

Figure 2 Phylogenetic tree generated with the Multalin server.

The analysis showed the associations generated by programs from the sequences reported in the NCBI and the sequences obtained experimentally of the gene *dtrdv2* of armadillo.

Figure 3 Three-dimensional models of the proteins DTRDV2 and 1hxm.

In the graph appear the models generated by the Swiss-PdbViewer program (A and C). Also, in the image B) they are possible to be observed that differences between both models (marked with yellow).

Figure 4 Ramachandran plot generated using the Swiss-PdbViewer program.

The aminoacid analysis showed 95.65% have conformations in the allowed regions of the plot for the DTRDV2 protein, indicating that our model is reliable. The 1hxm model presents a value of 94.17% in the same study.

Figure 5 Results of dtrdv2 amplification and DTRDV2 expression of *Dasyus novemcinctus*.

A) Primers trdv2-f and trdv2-r amplified a 319 bp product corresponding to the dtrdv2 gene from *D. novemcinctus*; well 1) 50 bp molecular marker (Promega, USA), well 2) DNA from hepatic tissue of *D. novemcinctus*, well 3) DNA from *Escherichia coli*, (negative control) and well 4) DNA from human leukocytes; Agarose (2%) gel. B) The figure shows the presence of an 11 kDa band that represents the recombinant DTRDV2 protein. Well 1) Molecular weight marker Multimark® (Invitrogen, CA, USA); well 2) cytochrome oxidase with a 13 kDa molecular weight. Wells 3) to 8) Clones with plasmid dtrdv2; well 9) *Escherichia coli JM109* without plasmid dtrdv2. SDS-PAGE gel at 12%, stained with Coomassie blue.

Figure 6 Lymphocytes quantification with the anti-DTRDV2 mouse serum and human anti-T γ δ monoclonal antibody.

We analyzed 5000 events in each experiment; In A) and B); 20 μ L of the anti-DTRDV2 mouse serum (1:50) were deposited in each experiment to identify mouse antibodies, using a goat anti-mouse IgG antibody-FITC (Zymed, CA, USA). A) Armadillo lymphocytes (30.82%) and B) human lymphocytes (1.14%). Also, for C) and D), we used monoclonal antibody anti-T γ δ from Immunotech [Coulter, FL, USA]. C) Armadillo lymphocytes (0.17%) and D) human lymphocytes (7.62%).

Tables

Table 1 The antigenicity prediction was performed using the Antigenic program.

^a: Epitope location in the TRDV2 and DTRDV2 proteins, ^b: Epitope classification according to the antigenicity prediction of the proteins, ^c: Aminoacid sequences of the epitope, the residue in bold is the amino acid with the highest score in the antigenicity prediction, ^d: Epitope position in the full length human TRDV2 protein or armadillo TRDV2 protein (DTRDV2).

A)

```

hdv102s1      TCTTTTCTCTCAGGAGTCATGTCAGCCATTGAGTTGGTGCCTGAACACCAAACAGTGCCT 60
dtrdv2        -TCTTTAAAGCGATCGCCATGTCAGCCATTGAGTTGGTGCCTGAAAAGCAAGTAGTGACC 59
              *** * * * ***** * ** ** *
hdv102s1      GTGTCAATAGGGGTCCCTGCCACCCTCAGGTGCTCCATGAAAGGAGAAGCGATCGGTAAC 120
dtrdv2        GTGACTGTGGGAAAGTCTGTCCACCCTCAAGTGCTCCATGGAAGGAGGAGCGATCGGTAAC 119
              *** * * ** * * ***** ***** ***** ***** *****
hdv102s1      TACTATATCAACTGGTACAGGAAGACCCCAAGSTAACACAATGACTTTC-ATATACCGAGA 179
dtrdv2        TACTACATGAAGTGGTACCGGACGACCCAGGACAGTACACTGACTTTCATATACCGAGA 179
              ***** ** ***** * * ***** * * ** ***** *****
hdv102s1      AAAGGACATCTATGGCCCTGGTTTCAAAGACAATTTCCAAGGTGACATTGATATTGCAA 239
dtrdv2        AGGGGGCAAGTATGGCCCTGGTTTCCAGAGCAGGTTCCCGTGGCACACTTTATAGTTCAA 239
              * ** * * ***** * ** **** ** ** * * **
hdv102s1      GAACCTGGCTGTACTTAAGATACTTGCACCATCAGAGAGAGATGAAGGGTCTTACTACTG 299
dtrdv2        CAACCTGGCTGTACTCGAGATTCGTGAGGCATCACTGAAAGATGAAGGGTCTTACTACTG 299
              ***** ***** * ** ***** ** *****
hdv102s1      TGCCTGTGACACCCACCCTGCTGCAGCTC 328
dtrdv2        TGCCTGTGACACCGTTTAAACCGTCAAAC 328
              ***** * * *

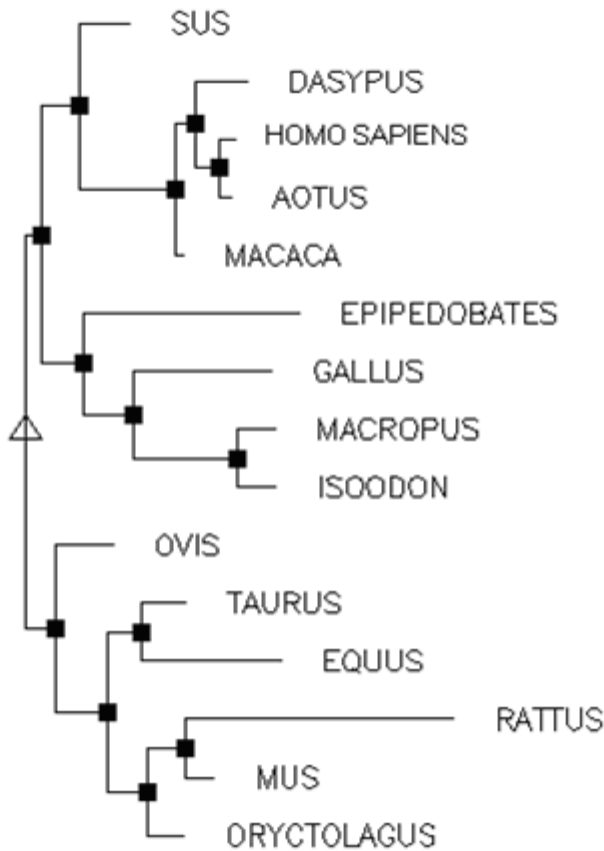
```

B)

```

TRDV2         MQRISLIHLHLSLFWAGVMSAIELVPEHQTVPVSVIGVPATLRCSMKGEAIGNYYINWYRKT 60
DTRDV2        -----FKAIAMSAIELVLDTHVVTVTVGKSVTLKCSMEGGAMRNYMNYRRT 48
              * * .***** : :.*.:* ..*:*:* * : **:*:*.*
TRDV2         QGNTITFIYREKDIYGPFGKDNFQGDIDIKNLAVLKILAPSERDEGSYYCACDT- 115
DTRDV2        QDSTLTFIYREGGKSGPGFQSRFRGSVYSSNNLAVLEIREASLKDEGSYYCACDTV 104
              *..*:****** . ****:..*.:* : :*****: * . * :*****

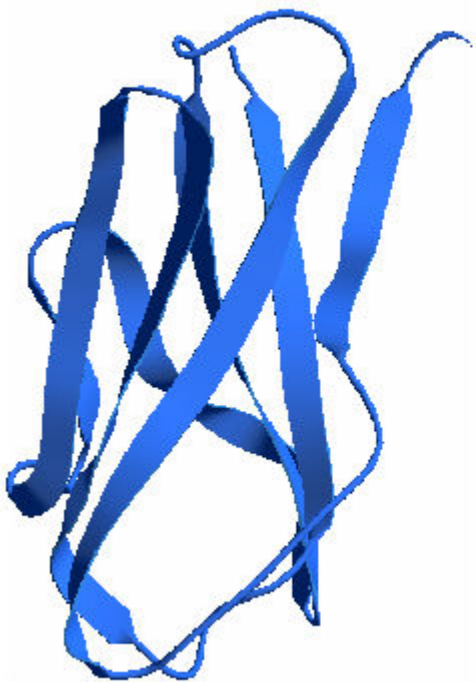
```



10 PAM

Figure 2

A) DTRDV2



B) CROSSOVER



C) 1 hxm (TRDV2)

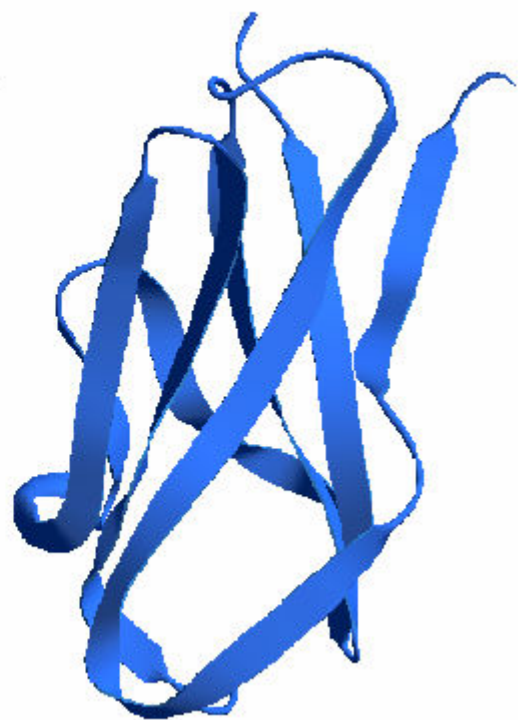


Figure 3

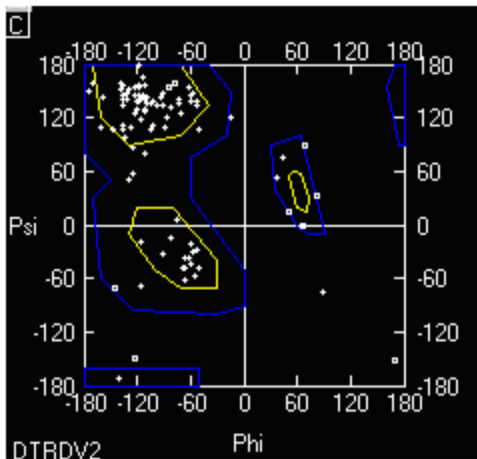
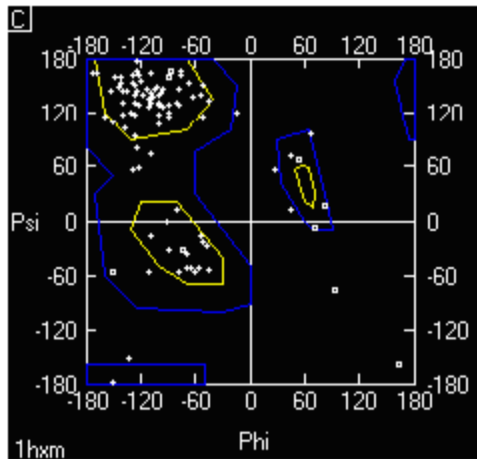


Figure 4

Armadillo



Human

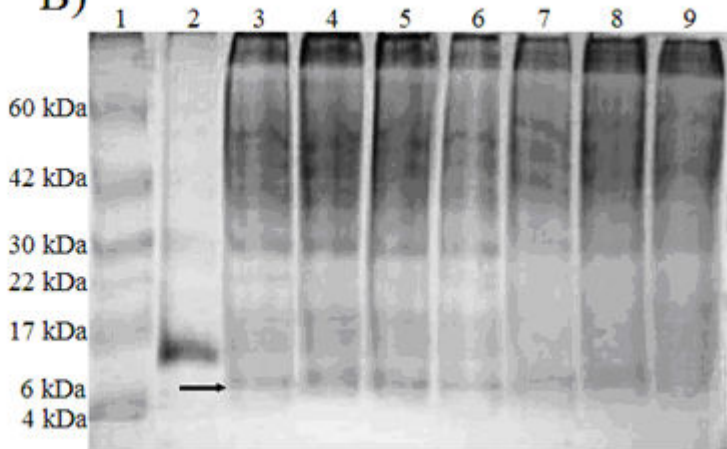
A)**B)**

Figure 5

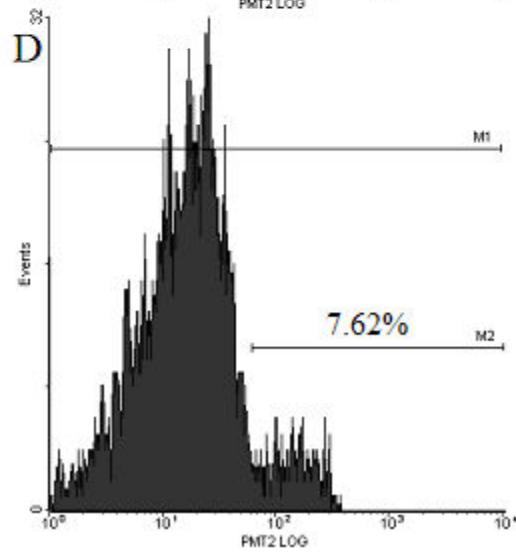
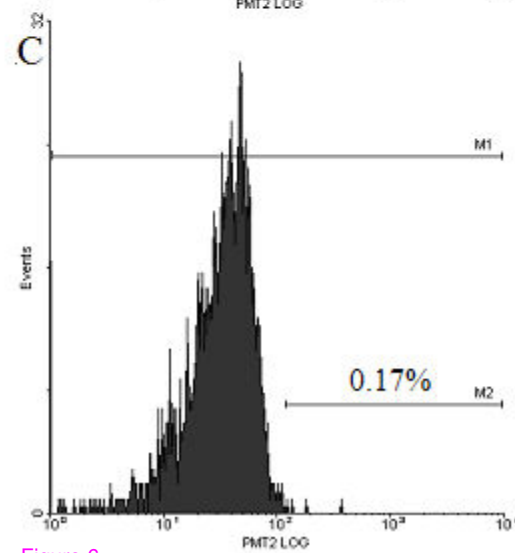
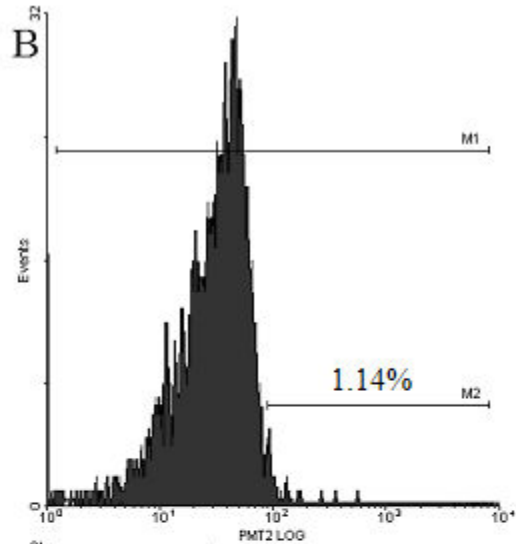
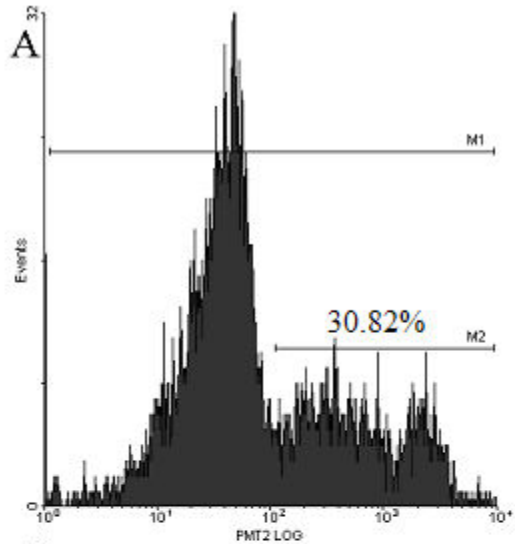


Figure 6

Additional files provided with this submission:

Additional file 1: table1.doc, 34K

<http://www.biomedcentral.com/imedia/1094614413385694/supp1.doc>