



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL

**SECUENCIA DE cDNA Y EXPRESIÓN DE
β-CAROTENO-OXIGENASA EN BOVINOS**

TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

ADRIANA MORALES TREJO

TUTOR: Armando Shimada Miyasaka

COMITÉ TUTORAL: Ofelia Mora Izaguirre
Mario Antonio Cobos Peralta



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Adriana Morales Trujillo

FECHA: 30 enero 2006

FIRMA: [Handwritten Signature]

Con cariño especial a mi madre y hermanas
que siempre me han acompañado.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por permitirme realizar mis estudios de doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante este posgrado.

A mis tutores Dr. Armando Shimada Miyasaka, Dra. Ofelia Mora Izaguirre y Dr. Mario A. Cobos Peralta por dirigir el presente trabajo.

Al Instituto de Neurobiología de la UNAM, en especial al Dr. Alfredo Varela Echavarría jefe del laboratorio de Diferenciación Neural y Axogénesis, lugar donde se llevó a cabo este trabajo, a las técnicas M.C. Carmen Mejía Viggiano y Dra. Anaid Antaramian por su apoyo en la secuenciación de ADN.

A la M.C. Adriana González Gallardo por el apoyo técnico recibido.

A los miembros del jurado: Dr. José Luis Romano Muñoz (INIFAP), Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera (INB-UNAM), Dr. Víctor Olalde Portugal (CINVESTAV-Irapuato), Dra. Minerva Ramos Gómez (UAQ).

A mis compañeros del Instituto de Neurobiología, especialmente del laboratorio A-03.

Contenido

	Página
Introducción	1
Marco teórico	3
Antecedentes	3
Principales características de los carotenoides	5
Metabolismo del β -caroteno en los bovinos	8
El gen y la proteína de β CO	13
Actividad de la β CO en diferentes especies	15
Estudios de β CO en modelos celulares	16
Otras proteínas involucradas en la ruptura de β -caroteno	16
Mecanismo de acción de β CO	17
Ruptura céntrica vs excéntrica	18
Expresión específica de β CO en tejidos	19
Receptores de membrana para β -caroteno	20
Regulación de la síntesis de vitamina A	20
Hipótesis	22
Objetivos	23
Objetivo general	23
Objetivos específicos	23
Materiales, Métodos y Resultados	24
<i>Bos taurus</i> beta-carotene-15,15'-oxygenase mRNA, complete cds	24

Cloning of the bovine β -carotene-15,15'-oxygenase and expression in gonadal tissues	24
Differences in expression and activity of β,β' -carotene-15,15'-oxygenase between bovine yellow and white fat carcasses	24
Discusión	25
Secuencia de cDNA para β CO de bovino	25
Expresión de β CO de bovino en duodeno e hígado de animales que pigmentaron o no el tejido adiposo de su canal	27
Actividad de β CO de bovino en duodeno e hígado de animales que pigmentaron o no el tejido adiposo de su canal	30
Expresión de β CO de bovino en tejidos gonadales	33
Conclusiones	36
Literatura citada	37
Anexo	44
A Potential Role for β -Carotene in Avian Embryonic development	44
Presentaciones en congresos	45
Técnicas empleadas	47
Purificación de RNA con tiosulfato de guanidina (Trizol, Invitrogen)	47
Purificación de RNA (RNeasy, Qiagen)	48
Purificación de RNAm (Fast track 2.0 kit, Invitrogen)	49
Transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	52
Amplificación de los extremos de cDNA (Gene Racer Kit,	53

Invitrogen)	
Amplificación de los extremos de cDNA	60
RT-PCR Cuantitativa	63
Transformación de células competentes E. coli X-L Blue	64
Clonación en vector y células TOPO (TOPO TA Cloning Kit for Sequencing, Invitrogen)	65
Purificación de DNA con fenol-cloroformo	66
Purificación de DNA de gel (Kit de Concert)	67
Purificación de DNA de plásmido (Miniprep)	68
Purificación de DNA de plásmido (Maxiprep, Qiagen)	69
Electroforesis en geles de agarosa	70
Digestión enzimática del DNA	72
Ligación de DNA	73
Northern Blot	74
Southern Blot	77
Hibridación <i>in situ</i> . Cortes adheridos a portaobjetos	80
Ensayo enzimático para β CO	83

Lista de figuras

		Página
Figura 1	Estructura química de los principales carotenoides	6
Figura 2	Mecanismos de entrada y transformación del β -caroteno y las diferentes formas de vitamina A en los hepatocitos y otras células blanco	12
Figura 3	Mecanismos de reacción propuestos para β C	18

Resumen

La finalización del ganado bovino en pastoreo produce canales con la grasa pigmentada de amarillo debido a un contenido elevado de β -caroteno, compuesto que en el organismo animal es desdoblado para formar retinal por la enzima β,β' -caroteno-15,15'-oxigenasa (β CO). En este trabajo se identificó el cDNA de β CO a partir de mucosa duodenal de bovino. Por hibridación *in situ* y RT-PCR cuantitativa se evaluó la expresión del mensajero para esta proteína en duodeno e hígado de animales que pigmentaron y de animales que no pigmentaron la grasa de su canal, así como la actividad enzimática de β CO en estos órganos. El cDNA de β CO de bovino (GenBank gi: DQ008469) contiene 2130 pb y tanto éste como la proteína guardan una identidad del 75% con sus proteínas homólogas reportadas en otros mamíferos. La expresión del mensajero y la actividad de β CO en duodeno fueron similares en todos los animales, mientras que en hígado los animales que pigmentaron la grasa de su canal mostraron mayor expresión y actividad enzimática en comparación con los animales que no presentaron pigmentación. Se sugiere que la actividad de β CO en el hígado del bovino responde al consumo de β -caroteno en la dieta, el cual está regulado metabólicamente hasta un nivel que le evite problemas por hipervitaminosis A; y que entonces el organismo guarda como reserva el exceso del β -caroteno absorbido del alimento en su tejido adiposo. En conjunto con este trabajo se determinó la expresión de β CO en los tejidos gonadales de bovino, comprobando la importancia del β -caroteno y los retinoides durante los procesos de gametogénesis y esteroidogénesis.

Palabras clave: Bovinos; β,β' -caroteno-15,15'-oxigenasa; β -caroteno; vitamina A; retinal; DNA; grasa amarilla.

Summary

Finishing cattle on pasture results in carcasses with yellowish fat, due to the high β -carotene level in the ingesta, a compound that in the animal is cleaved to retinal by the enzyme β,β' -carotene-15,15'-oxygenase (β CO). In this work, the β CO cDNA was identified in bovine intestinal mucosa. By *in situ* hybridization, and the expression of the messenger for this protein in duodenum and liver from pigmented and non-pigmented animals was evaluated through quantitative RT-PCR, along with the enzymatic activity of β CO in those organs. Bovine β CO cDNA (GenBank gi: DQ008469) contains 2130 bp and the former along with the protein, share a 75% identity with homologous proteins reported in other mammals. The expression of the messenger and enzymatic activity in duodenum were similar in both groups of animals, while in the liver of those that had pigmented fat, both were higher. It is suggested that the activity of β CO in the bovine liver responds to the consumption of dietary β -carotene, and it is metabolically regulated to prevent hypervitaminosis A in the animal; and therefore, the animal can store the excess absorbed carotenoid in its adipose tissue. In addition to this work, the expression of β CO in bovine gonadal tissues was determined, proving the importance of the compound and the retinoids, in the functions of gametogenesis and steroidogenesis.

Key words: Bovine; β,β' -carotene-15,15'-oxygenase; β -carotene; vitamin A; retinal; DNA; yellow fat.

Introducción

En las zonas tropicales del país el ganado es engordado y finalizado en praderas y agostaderos, donde se aprovecha la abundancia de forrajes, mismos que poseen una gran cantidad de compuestos carotenoides. Los carotenoides son precursores de la vitamina A, están presentes en el forraje en concentraciones elevadas y debido a sus características liposolubles, tienden a depositarse en los diferentes tejidos del organismo, incluido el adiposo, confiriéndole una coloración amarilla a las canales de los animales en pastoreo (Morgan *et al.*, 1969). Este problema origina el rechazo de la carne por parte del consumidor y, por ende, pérdidas económicas a los productores.

Se considera que el β -caroteno es el principal responsable de la coloración de las canales bovinas (Mora y Shimada, 2001). En estos animales el β -caroteno se libera a nivel ruminal, pasa al intestino delgado en donde es absorbido por las células de la mucosa intestinal y puede seguir diferentes rutas: a) ser metabolizado dentro del enterocito por la enzima β , β' -caroteno-15,15'-oxigenasa (β CO) y generar dos moléculas de retinal (vitamina A); b) ser transportado al hígado donde se almacena, o es metabolizado a vitamina A por acción de la misma enzima; c) a partir de hígado puede ser transportado para su almacén o metabolismo en diferentes tejidos del organismo (Gottesman *et al.*, 2001). Como consecuencia de su naturaleza liposoluble, el consumo elevado de β -caroteno en la dieta origina su almacenamiento, en conjunto con otros lípidos dentro del tejido adiposo del organismo, causando la pigmentación amarilla de la grasa de la canal (Yang *et al.*, 1992; Mora *et al.*, 2000).

En el presente trabajo se identificó la secuencia del cDNA que codifica para la síntesis de la enzima β CO en el bovino, misma que permitió comprobar molecularmente la síntesis y actividad de esta proteína en hígado y duodeno de bovinos que presentaron pigmentación del tejido adiposo de su canal en comparación con bovinos que no pigmentaron su canal, para responder si la capacidad del bovino para metabolizar el β -caroteno de la dieta depende de su nivel de consumo.

Simultáneamente, y de manera adicional al objetivo general de este trabajo se identificó la expresión de la enzima β CO en gónadas de bovino, además, se discute acerca de la importancia del β -caroteno y de la vitamina A durante la gametogénesis y esteroidogénesis.

Marco teórico

Antecedentes

México es el octavo productor de carne mundial (FAO, 2003), posee un inventario nacional superior a los 29 millones de cabezas de ganado bovino con una producción de 1 503 760 toneladas de carne al año (SIAP, 2005), de los cuales el 38% proviene de las regiones tropicales del país, lo que equivaldría a 543 400 toneladas.

Para alcanzar ese nivel de producción los ganaderos del trópico mexicano engordan y finalizan al ganado en pastoreo empleando pastizales nativos, praderas mejoradas y en algunos casos ofrecen al ganado algún tipo de suplemento durante la época de sequía. Aun así, deben enfrentar muchos problemas entre los que se encuentran contar con suficiente forraje de buena calidad y colocar sus canales al mejor precio en un mercado cada vez más exigente, sobre todo si se toma en cuenta que esta región es la principal proveedora de becerros y carne de abasto para la Ciudad de México y la zona metropolitana.

La finalización del ganado en pastoreo trae como consecuencia la obtención de canales con la grasa pigmentada de color amarillo debido a que los forrajes poseen un elevado contenido de carotenoides. Los carotenoides son nutrientes normales del forraje que dentro del organismo animal cumplen una función de provitamina A. Sin embargo, al ser consumidos en concentraciones elevadas, los carotenoides, y principalmente el β -caroteno, no son metabolizados totalmente por el organismo animal y se depositan en el tejido adiposo (Morgan *et al.*, 1969; Yang *et al.*, 1992).

Aunque la coloración amarilla de la grasa de la canal por efecto de la finalización en pastoreo no afecta el sabor ni el valor nutritivo de la carne, éste es un problema económico importante, ya que dificulta su comercialización y demerita el precio de cerca del 10% de las canales que llegan a rastro (Barrón, 2001), alcanzando una pérdida económica de hasta 100 millones de pesos al año (Mora y Shimada, 2001).

En los rumiantes se ha visto que el β -caroteno contenido en el forraje no es afectado por la fermentación ruminal ya que en este sitio únicamente es liberado para pasar intacto a intestino delgado, en donde se absorbe y una parte de este compuesto es convertido por acción enzimática en vitamina A. Sin embargo, la eficiencia de conversión del β -caroteno en vitamina A dentro de la mucosa intestinal varía dependiendo de la especie de que se trate (Tee, 1992). Se ha observado que la actividad intestinal de la enzima que se encarga de catalizar la conversión del β -caroteno en vitamina A es cinco veces menor en bovinos que en caprinos (Mora *et al.*, 2000), de manera que muy probablemente este hecho incrementa la absorción y almacenamiento del β -caroteno en el tejido adiposo y por tanto la coloración amarilla de las canales. El resto del β -caroteno absorbido por las células intestinales que no alcanza a metabolizarse en vitamina A es empaquetado y enviado a la circulación y parte de este llega a depositarse en el tejido adiposo.

Para resolver esta situación algunos productores han empleado diferentes estrategias como finalizar a sus animales en corral durante periodos de 28 a 56 días, logrando una disminución en la coloración de la grasa. En este sentido, Strachan *et al.* (1993) reportaron una reducción en el color de la grasa de 3.9 a 2.4 (en escala del 1 al 10) después de 35 días de alimentación con grano, y establecieron que el cambio de alimentación debe iniciarse 70 días antes del sacrificio para diluir el β -caroteno acumulado previamente. Al parecer el β -caroteno fue removido de la grasa además de haberse diluido por efecto de la dieta (Forrest, 1981).

Otras soluciones que se han sugerido para resolver este problema han sido el empleo de lipoxigenasas de pasta de soya a nivel ruminal para decolorar los carotenoides (Larsen *et al.*, 1993); la comercialización de la carne en cortes; e incluso se ha mencionado que la suplementación con α -tocoferol en ganado en pastoreo también reduce la concentración tisular de β -caroteno, y por tanto el amarillamiento de la grasa de la canal, haciéndolo más aceptable para el mercado (Yang *et al.*, 2002). Sin embargo, éstas no han resultado ser soluciones viables, económicamente hablando.

Principales características de los carotenoides

Como se ha mencionado, el color del tejido adiposo en las canales bovinas depende hasta en un 80% de su contenido de carotenoides, y en especial del β -caroteno. Los carotenoides y principalmente el β -caroteno, son los principales compuestos precursores de vitamina A en el organismo animal; son sintetizados por plantas, hongos y bacterias fotosintéticas; se caracterizan por ser compuestos químicos liposolubles responsables de la coloración amarilla, naranja, roja y púrpura de flores, frutos, aves, insectos y organismos marinos. Los animales los obtienen al alimentarse de estos alimentos para luego metabolizarlos, acumularlos en sus tejidos o emplearlos como fuente de vitamina A (Tee, 1992).

Químicamente, los carotenoides se definen como compuestos formados de ocho unidades isoprenoides cuyo orden es invertido desde la molécula central (Delgado *et al.*, 2000). Estos compuestos se consideran como derivados del licopeno ($C_{40}H_{56}$), originados a partir de diferentes reacciones de hidrogenación, deshidrogenación, ciclización, inserción de oxígeno, migración de dobles enlaces, migración de metilos, elongación o acortamiento de cadena (Goodwin, 1992). En la figura 1, se muestra la estructura química de algunos de los carotenoides más importantes.

Los carotenoides se clasifican en primarios y secundarios. Los carotenoides primarios son compuestos empleados por las plantas durante la fotosíntesis (β -caroteno, violaxantina, neoxantina). Los carotenoides secundarios se localizan en flores y frutas (α -caroteno, β -criptoxantina, zeaxantina, anteraxantina) (Delgado *et al.*, 2000).

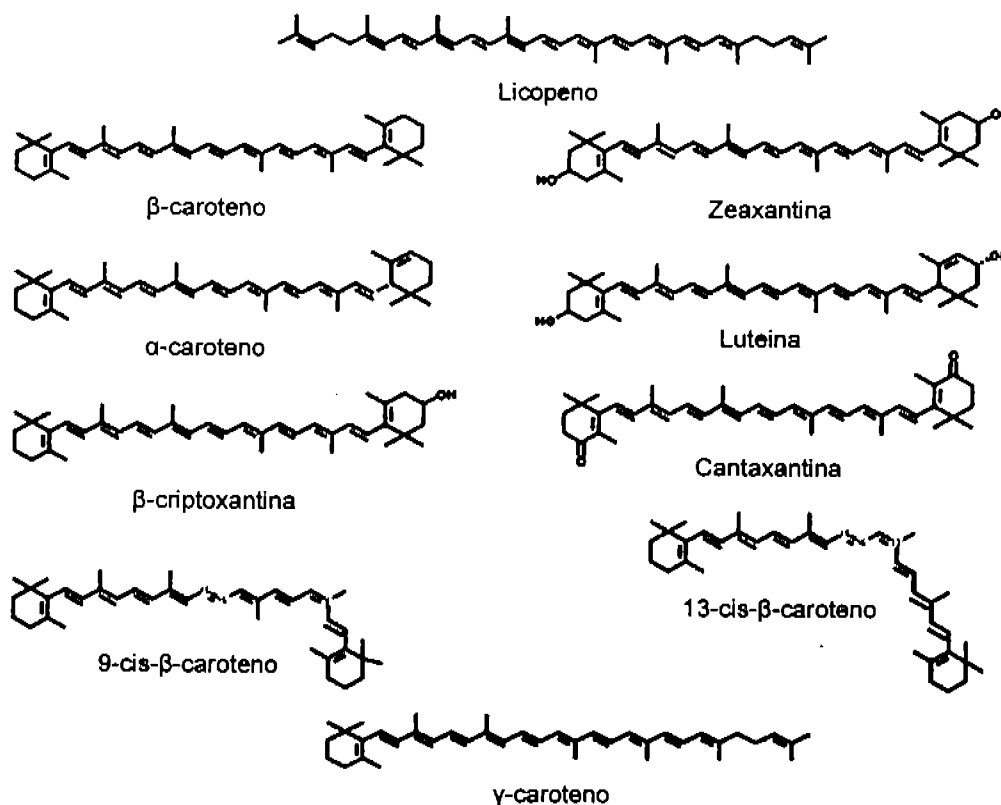


Figura 1. Estructura química de los principales carotenoides.

La coloración de los carotenoides es debida a su cadena de dobles enlaces en posición *trans*. Debido a esta cadena, los carotenoides muestran una baja energía de excitación, de manera que en el espectro de luz visible se

localizan entre los 400 y 500 nm, correspondientes a los colores rojo, naranja y amarillo (Delgado *et al.*, 2000).

Las principales funciones que desempeñan los carotenoides en los vegetales son las siguientes:

- 1) Colorean flores, semillas, frutos y hasta algunos hongos, función que juega un papel importante en la reproducción de tales especies para atraer animales que contribuyen a dispersar polen, semillas y esporas.
- 2) Durante la fotosíntesis actúan como receptores de energía lumínica para luego transferirla a la clorofila.

Los carotenoides son compuestos hidrofóbicos y por tanto se localizan en sitios lipofílicos dentro de las células como las membranas celulares. Para desplazarse por ambientes acuosos dentro de la célula, los carotenoides forman complejos con proteínas, esto ha sido observado principalmente en plantas e invertebrados (Bullerjahn y Sherman, 1986; Zagalski *et al.*, 1991; Jouni *et al.*, 1993). En vertebrados estas asociaciones son bastante limitadas, por ejemplo, en bovinos no se han encontrado proteínas intracelulares ligadoras de β -caroteno (Gugger y Erdman, 1996). En hígado de hurón se reporta una proteína específica ligadora de carotenoides (Lakshman y Rao, 1999) y en humanos una proteína ligadora de xantofila en retina (Yemelyanov *et al.*, 2001). Como alternativa a su solubilización, los carotenoides pueden incluirse dentro de vesículas citosólicas de transporte asociados a lipoproteínas (Gugger y Erdman, 1996).

Estudios epidemiológicos han reportado que el consumo de alimentos ricos en carotenoides se asocia con una reducción en el riesgo de padecer ciertos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y degeneración macular relacionada con la edad (Peto *et al.*, 1981; Ziegler, 1991; van Poppel, 1996). Esos efectos preventivos de los carotenoides se asocian principalmente a su función como precursores de vitamina A, así como a sus características de

antioxidantes, moduladores de la respuesta inmune e inductores de las uniones "gap" de comunicación intercelular (Olson, 1998). A pesar de que no todos los carotenoides tienen el mismo efecto de protección contra enfermedades específicas, sí se consideran seguros para la salud humana a diferencia de la vitamina A, la cual puede causar toxicidad a dosis elevadas. Por tanto, los carotenoides naturales pueden ser utilizados como suplementos alimenticios para prevenir ciertas enfermedades crónicas o en casos de deficiencia de vitamina A.

Metabolismo del β -caroteno en los bovinos

Los bovinos consumen el β -caroteno principalmente en el forraje verde, aunque también puede estar presente en menor cantidad en los concentrados y alimentos balanceados. Antes de su absorción los carotenoides deben ser liberados de la matriz celular de los alimentos o vegetales que los contienen, y esto ocurre durante los procesos físicos y químicos que sufre el alimento antes de ser ofrecido, además de la masticación, la fermentación ruminal y después de su paso por abomaso (Parker, 1996; Furr y Clark, 1997).

Una vez que ha llegado al rumen, el β -caroteno es liberado parcialmente, pero gracias a sus dobles enlaces escapa de manera intacta a intestino delgado (Van Soest, 1994). En este punto, algunos autores mencionan que las pérdidas de β -caroteno en rumen ascienden hasta 20-40% (King *et al.*, 1962; Keating, 1964; Van Soest, 1982). Sin embargo, se ha encontrado que tales pérdidas no son mayores del 10% y que se asocian mejor a la pérdida por incidencia de luz durante la incubación, o por la pérdida de materia orgánica a nivel ruminal más que a su degradación proplamente dicha (Mora *et al.*, 1999).

En el intestino delgado, el β -caroteno junto con los otros carotenoides liberados del alimento se solubiliza por la acción de los componentes biliares y en conjunto con otros lípidos pasa a formar parte de las micelas que el organismo absorbe en las vellosidades intestinales (Goodman *et al.*, 1965). La principal diferencia entre la absorción de los carotenoides y los ácidos grasos de la dieta está en que los primeros requieren incorporarse en micelas por acción de las sales biliares (Hollander y Ruble, 1978), mientras que los ácidos grasos pueden ser absorbidos sin que estén contenidos en micelas (Carey y Hernell, 1992).

Una elevada concentración de β -caroteno en la dieta afecta la absorción de otros carotenoides, así como de la vitamina E (Parker, 1996; Furr y Clark, 1997). Se ha visto que niveles bajos de grasa en la dieta reducen la capacidad de absorción de β -caroteno a nivel intestinal, ya que la grasa provee un medio hidrofóbico para solubilizar los carotenoides, además de que estimula la liberación de sales biliares, y por tanto incrementan la absorción de los carotenoides (Furr y Clark, 1997).

Varios trabajos (Gaziano *et al.*, 1995; Stahl *et al.*, 1995; You *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 1997; During *et al.*, 2002) han demostrado la absorción selectiva de β -caroteno sobre otros carotenoides, lo cual refuerza la teoría acerca de la existencia de un transportador de β -caroteno en la membrana celular de los enterocitos. En este sentido, se ha identificado una secuencia de cDNA en mamíferos homóloga a la de un receptor encontrado en *Drosophila melanogaster*, el cual interviene mediando la entrada de carotenoides a la célula (Kiefer *et al.*, 2002).

Una vez dentro de las células de la mucosa intestinal el contenido de las micelas es liberado. El transporte intracelular del β -caroteno en los bovinos se realiza a través de vesículas o por su unión a proteínas de membrana (Gugger y Erdman, 1996). Dentro del citosol el β -caroteno es expuesto a la actividad de la enzima β CO, siendo éste el primer sitio de actividad de la

enzima formadora de retinal. Las características y actividad de esta enzima se mencionan más adelante. A continuación el retinal recién formado y el β -caroteno que no alcanzó a ser transformado en el enterocito, así como otros carotenoides, apocarotenales y retinoides, son incorporados dentro de los quilomicrones, complejos moleculares que se encargan de su transporte por vía linfática (Goodman y Huang, 1965; Ong, 1993).

En los enterocitos, al igual que en muchos otros tipos celulares, se ha descrito la presencia de otras enzimas que continúan el metabolismo del β -caroteno, como es el caso de la retinol deshidrogenasa (RoLDH) que convierte el retinal en retinol, y la enzima lecitín-retinol-acil-transferasa (LRAT), que forma ésteres de retinilo a partir de retinol. Todos estos nuevos compuestos también son empaquetados y transportados por vía linfática en los quilomicrones (Paik *et al.*, 2004).

Hasta el momento se desconoce exactamente el mecanismo que regula la incorporación de los carotenoides en los quilomicrones y tampoco se ha resuelto cómo se controla su movilización dentro del enterocito, ya que no se han aislado proteínas específicas que se unan a los carotenoides dentro de estas células (Furr y Clark, 1997).

La mayoría del β -caroteno y retinoides de los quilomicrones son transportados al hígado, aunque alrededor del 25% de estos compuestos pueden continuar su circulación por vía extrahepática (Goodman *et al.*, 1965).

El β -caroteno es liberado de los quilomicrones en el hígado, donde también es alcanzado por la actividad de la β CO dentro de los hepatocitos, siendo éste, el segundo sitio en donde se forma retinal a partir de los carotenoides de la dieta después del duodeno.

En el hígado ocurren varias reacciones que tienen que ver con el metabolismo del β -caroteno y de la vitamina A. La enzima retinaldehído

deshidrogenasa (RALDH) cataliza la conversión del retinal recién formado en retinol (RoI), este compuesto se unirá a la proteína ligadora de retinol (RBP), sintetizada también en el hígado. A su vez, la RBP se une a otra proteína denominada transtiretina (TTR), este complejo RoI-RBP-TTR es el medio de transporte del retinol recién formado para llegar por vía sanguínea a los tejidos blanco en donde es liberado para cumplir con sus funciones específicas (Goodman *et al.*, 1965; Paik *et al.*, 2004). En los hepatocitos también se forma el todo-trans ácido retinoico a partir del retinal y la acción de la RALDH. Este ácido retinoico se une a albúmina para viajar por la circulación sistémica. Otros compuestos formados en los hepatocitos son los ésteres de retinilo a partir del retinol y de la enzima retinil éster hidrolasa (REH), para ser liberados a la circulación los ésteres de retinilo se unen a lipoproteínas (Paik *et al.*, 2004). En la figura 2, se muestran los diferentes mecanismos de llegada y transferencia del β -caroteno y vitamina A en los hepatocitos y otras células blanco a partir de la circulación sanguínea.

Los retinoides unidos a proteínas circulantes son una fuente importante de vitamina A en el organismo. Sin embargo, se ha visto que ratones incapaces de sintetizar adecuadamente RBP obtienen esta vitamina a partir de los carotenoides que reciben en la dieta y movilizan por vía extrahepática unidos a albúmina, sin presentar signos por deficiencia de RBP (Paik *et al.*, 2004).

A pesar de que en el hígado se presenta una actividad enzimática intensa sobre el β -caroteno y sus productos, una parte del β -caroteno, así como de otros carotenoides, no alcanza a ser transformado en retinal, y se une a lipoproteínas de alta y baja densidad para su circulación por vía sanguínea a los diferentes tejidos en donde sea requerido (Paik *et al.*, 2004). De esta manera se ha reportado la presencia de β -caroteno y luteína en cuerpo lúteo de bovino, tejido adiposo, glándulas adrenales, piel, riñón, pulmón, hipófisis, músculo, bazo, estómago, colon, vejiga, cerebro y ojo (Furr y Clark, 1997).

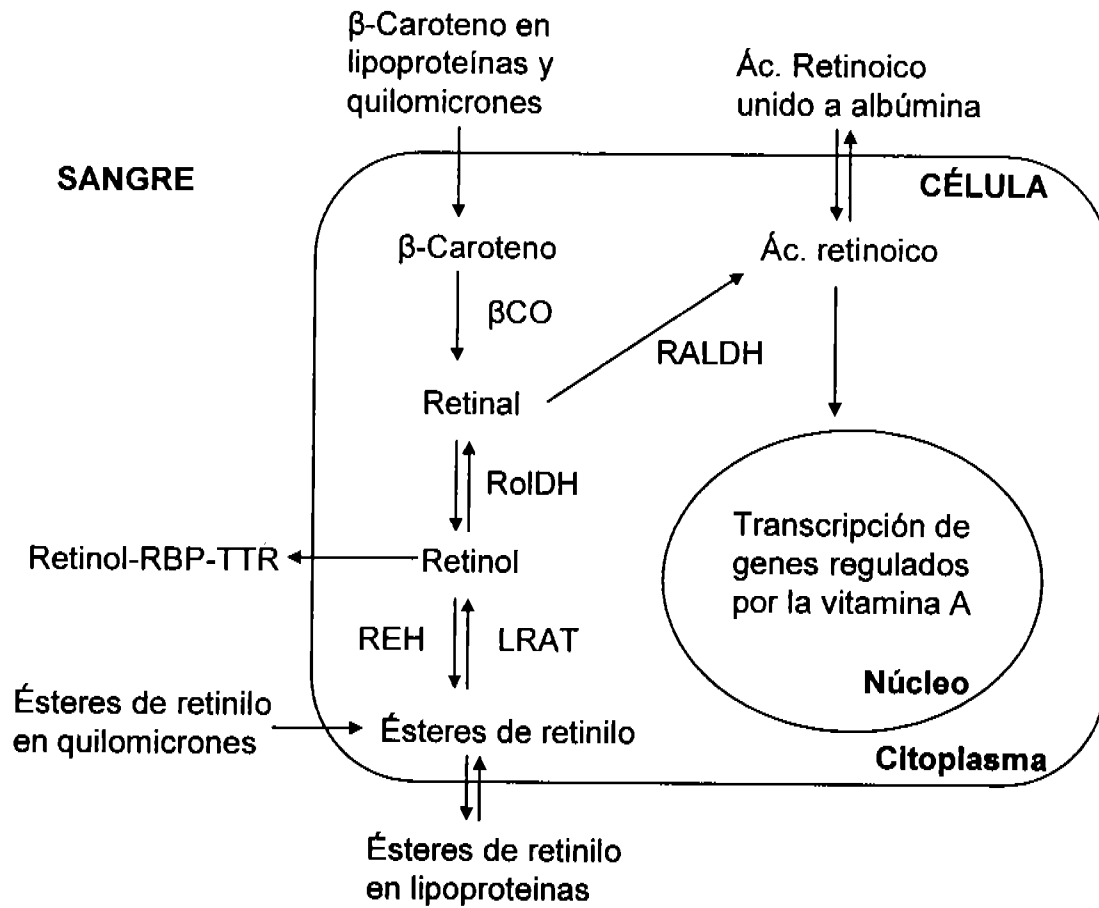


Figura 2. Mecanismos de entrada y transformación del β -caroteno y las diferentes formas de vitamina A en los hepatocitos y otras células blanco. (β CO, β,β' -caroteno 15,15' oxigenasa; RoIDH, retinol deshidrogenasa; REH, retinil éster hidrolasa; LRAT, lecitin-retinol-acil-transferasa; RALDH, retinaldehído deshidrogenasa; RoI, retinol; RBP, proteína ligadora de retinol; TTR, transtiretinina)

En los bovinos el β -caroteno es transportado en plasma unido principalmente a lipoproteínas de alta densidad (HDL), al contrario de lo que sucede en cabras, borregos, e incluso humanos, en donde el β -caroteno es transportado en las fracciones de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Ashes *et al.*, 1984; Yang *et al.*, 1992).

El gen y la proteína de β CO

Debido a su actividad como provitamina A, el carotenoide más importante y abundante en la nutrición animal es el β -caroteno. En el aparato digestivo, así como en muchos otros tejidos del organismo, el β -caroteno es atacado por la enzima β CO que rompe su enlace central (15-15') y produce dos moléculas de retinal.

El estudio de la enzima β CO se remonta hacia 1930 cuando Moore demuestra la conversión de β -caroteno en vitamina A en intestino delgado de mamífero. Pero no fue sino hasta 1965, cuando dos diferentes grupos de investigadores (Goodman y Huang, 1965; Olson y Hayaishi, 1965) caracterizaron su actividad enzimática a partir de un homogenizado de células de intestino delgado, y la denominaron β CO porque observaron que el β -caroteno era cortado en su enlace central 15-15' para formar retinal y que esta actividad requería de oxígeno molecular. Entre las características reportadas para esta proteína se mencionó que es una enzima soluble, con un pH alcalino (7.8 a 8.2), es inhibida por agentes sulfhidrilos y quelantes de hierro, lo que indica su asociación a un cofactor de hierro (Goodman *et al.*, 1966; Fidge *et al.*, 1969).

A partir de trabajos realizados con homogenizados celulares de intestino se pudieron comprobar y determinar otras características de la β CO, entre las que se mencionó su localización en el citosol y actividad específica sobre β -

caroteno para producir dos moléculas de retinal por cada molécula de β C (Devery y Milborrow, 1994). Así mismo se determinó su K_m (2-10 μ M) y V_{max} (0.003-1.7nmol de retinal/mg/hr a 37°C, dependiendo de la especie) (Fidge *et al.*, 1969; Lakshman y Okoh, 1993).

La enzima pudo ser caracterizada en otros mamíferos como el cerdo (Fidge *et al.*, 1969) y se comprobó su especificidad de sustrato sobre β -caroteno al enfrentarla contra algunos de sus isómeros (Nagao *et al.*, 1996).

Recientemente, se logró clonar y reportar la secuencia de DNA complementario (cDNA) de esta proteína originaria de *Drosophila melanogaster* (von Lintig y Vogt, 2000), pollo (Wyss *et al.*, 2000), ratón (Paik *et al.*, 2001) y humano (Yan *et al.*, 2001).

Von Lintig y Vogt (2000) reportaron la clonación de la enzima β CO de *D. melanogaster* en una cepa de *E. coli*, previamente manipulada para producir y almacenar β -caroteno. Estos autores observaron que una vez que las células fueron capaces de producir la proteína, ésta era activa y catalizaba únicamente la ruptura del enlace central de β -caroteno, compuesto conformado por 40 carbonos, y produciendo retinal, cuya molécula consta de 20 carbonos; y que esta reacción era dependiente de hierro.

La evidencia de la actividad *in vivo* de esta enzima formadora de vitamina A fue confirmada por von Lintig *et al.* (2001) quienes encontraron que la mutación en el gen Nina-B de *D. melanogaster* produce individuos ciegos, ya que en este sitio se encuentra la información para la síntesis de β CO.

La clonación del cDNA de pollo fue realizada a partir de una purificación parcial de la proteína β CO de intestino de pollo, para luego determinar su secuencia de aminoácidos y diseñar los oligonucleótidos específicos para generar el correspondiente cDNA mediante PCR. La comparación de esta secuencia con la de *D. melanogaster* reveló varios dominios conservados (Wyss *et al.*, 2000; Wyss *et al.*, 2001).

Posteriormente, la identificación del gen de β CO de mamíferos, específicamente de ratón (Paik *et al.*, 2001) y humano (Yan *et al.*, 2001; Lindqvist y Anderson, 2002), permitieron confirmar algunas de las características de actividad de esta enzima citosólica (von Lintig y Vogt, 2001; Lindqvist y Anderson, 2002).

Recientemente, se ha propuesto que *in vivo* y probablemente por su naturaleza hidrofílica, la β CO requiere interactuar con otras proteínas que se encargan tanto de entregarle el β -caroteno (hidrófobo), así como de recibir y transportar los retinoides que resultan de esta reacción, tal es el caso de las proteínas celulares ligadoras de retinoides (CRBP 1-3) (Vogel *et al.*, 2001). Estas proteínas también permitirían regular el flujo de formación, transporte y almacenamiento de retinal y ácido retinoico en el organismo, sin embargo éste es un tema que aún se encuentra en proceso de estudio.

Actividad de la β CO en diferentes especies

La actividad de β CO varía dependiendo de la especie animal de que se trate, así como también del tipo de dieta y de la cantidad de sustrato a degradar. En general, en los herbívoros la β CO presenta mayor actividad (Lakshman, 2004), mientras en los carnívoros como el gato, puede estar totalmente ausente (Lakshman y Okoh, 1993). En los bovinos la actividad de β CO es bastante limitada en relación a la actividad que muestra en caprinos, y ello predispone a una mayor absorción del β -caroteno y a su almacenamiento en tejido adiposo. En esta especie, la actividad de β CO oscila entre 190 a 415 pmol retinal/mg proteína/h (Mora *et al.*, 2000), mientras que en ratas produce alrededor de 6.3 a 14.9 pmol retinal/mg proteína/h (Parvin y Sivakumar 2000), y en pollo su actividad es de hasta 330 pmol retinal/mg proteína/h (Tajima *et al.*, 1999).

Estudios de β CO en modelos celulares

Sólo en unas cuantas líneas celulares se ha demostrado la expresión de β CO, aun cuando éstas deriven de tejidos que normalmente expresen esta proteína. Estudios en células de adenocarcinoma de colon de humano (Caco-2, cepas PF11 y TC7) demostraron la actividad de β CO y la capacidad para la síntesis de ésteres de retinilo cuando se incubaron con β -caroteno (During *et al.*, 1998). Así mismo, se demostró la expresión del RNA mensajero (RNAm) para β CO en las mismas líneas celulares (Bhatti *et al.*, 2003; Boulanger *et al.*, 2003). Estas líneas celulares han sido utilizadas como modelos *in vitro* para estudiar las características de la enzima.

Se han estudiado diferentes líneas celulares de hígado, pero ninguna ha demostrado actividad de β CO (During y Harrison, 2004). Tampoco se ha encontrado actividad en las líneas celulares de epitelio de retina ARPE-19, D407 y hTERT-RPE1 (Bhatti *et al.*, 2003). Sin embargo, hay que recordar que en este tejido los principales carotenoides utilizados son la luteína, zeaxantina y mesoxantina, ya que sólo se han encontrado trazas de β -caroteno (Landrum y Bone, 2001). En células de riñón de mono Cos-7 se ha demostrado la expresión del mensajero para β CO (Bhatti *et al.*, 2003).

Otras proteínas involucradas en la ruptura de β -caroteno

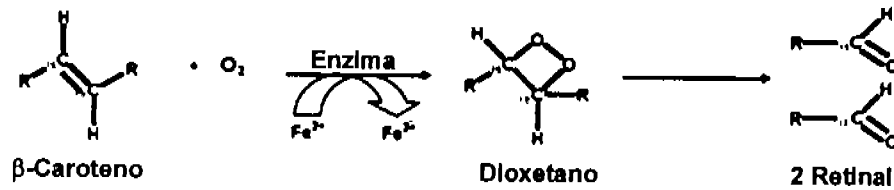
A la par con la investigación en β CO se han estudiado otras proteínas de estructura y secuencia de cDNA similares, involucradas en la síntesis de retinal en el organismo animal. Tal es el caso de β CO2 una enzima caracterizada en ratón y pez cebra (*Danio rerio*). Esta enzima rompe asimétricamente la molécula de β -caroteno el enlace 9'-10', produciendo 10'-apocarotenal y β -ionona (Kiefer *et al.*, 2001). Otra de las proteínas involucradas en la formación de vitamina A es la proteína microsomal específica "Retinal Pigment Epitellium" o RPE65 cuyo cDNA fue

caracterizado en bovino (Hamel *et al.*, 1993). Estudios posteriores demostraron que, la RPE65, forma 11-cis vitamina A, y que es imprescindible para que se lleve a cabo el ciclo visual (Redmond *et al.*, 1998).

Mecanismo de acción de β CO

Hasta la fecha se han propuesto dos mecanismos de acción para la ruptura del enlace central de β -caroteno por la enzima β CO. El primer mecanismo reportado por Olson y Hayaishi en 1965 es el de "dioxigenasa", éste requiere la presencia de oxígeno molecular y produce el intermediario inestable dioxetano, mismo que es rápidamente convertido en retinal. Recientemente, Leuenberger *et al.* (2001) propusieron la reacción de "monooxigenasa". Estos autores mencionan que para lleve a cabo este mecanismo se requiere la presencia de dos átomos de oxígeno de fuentes diferentes (oxígeno molecular y agua) y que el intermediario que se produce es un epóxido. Sin embargo, este segundo mecanismo aún requiere clarificar la naturaleza del complejo que debe formarse con un metal, probablemente hierro, requerido para la epoxidación; así como la extensión en el intercambio de oxígeno de naturaleza molecular o del agua. Por tanto, es necesario continuar los trabajos que permitan esclarecer cual es realmente el mecanismo de la reacción para la ruptura del enlace central del β -caroteno catalizado por la β CO. En la figura 3, se muestran los dos mecanismos de acción propuestos para la actividad de β CO sobre β -caroteno.

1. Reacción de Dioxigenasa (Olson, 1965)



2. Reacción de Monooxigenasa (Leuenberger et al., 2001)

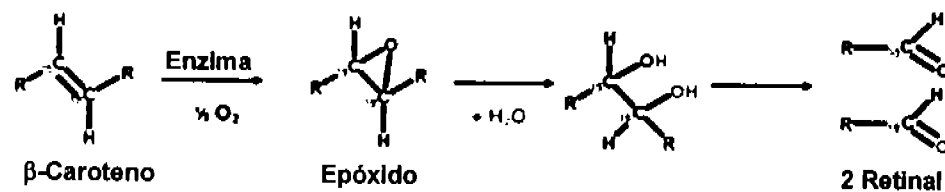


Figura 3. Mecanismos de reacción propuestos para β CO.

Ruptura céntrica vs excéntrica

Hasta ahora ha quedado claro que la β CO se encarga de la ruptura central del β -caroteno para formar retinal, pero la existencia de una β CO2 cuya función es romper de manera excéntrica al β -caroteno es aún un tema de controversia. Existe evidencia de que puede ocurrir la ruptura excéntrica de β -caroteno en homogenizados libres de células (Napoli y Race, 1988) con formación de ácido retinoico. También se ha visto que la célula puede cortar los apocarotenoides de la cadena superior a 20 carbonos hasta formar ácido retinoico por un proceso similar al de la β -oxidación de los ácidos grasos (Sharma *et al.*, 1976; Wang *et al.*, 1996).

En el reporte de Kiefer *et al.* (2001) para la β CO2 mencionan la expresión del mensajero para esta proteína en los mismos tejidos en que se encontró β CO

(hígado e intestino delgado), lo cual explica que en estos sitios también puede ocurrir la ruptura excéntrica del β -caroteno, pero que ocurriría por dos proteínas distintas. Sin embargo, se requiere una mayor investigación sobre β CO2 en cuanto a su actividad bioquímica y propiedades enzimáticas, especificidad de sustrato, localización celular y productos principales.

Expresión específica de β CO en tejidos

En vertebrados el primer sitio de síntesis de vitamina A a partir de β -caroteno es la mucosa intestinal, y de ahí tanto la vitamina recién formada como el β -caroteno absorbido son transportados a hígado para su almacenamiento o distribución a otros tejidos. Algunas de las técnicas mayormente utilizadas para determinar la expresión específica del mensajero de una proteína en tejidos son la hibridación *in situ*, los Northern blots y la RT-PCR. De esta manera, diferentes autores han determinado la expresión β CO en tejidos específicos. En pollo se ha localizado el mensajero para β CO en hígado, microvellosidades de intestino delgado, pulmón y riñón (Wyss *et al.*, 2001). En el ratón se ha visto su expresión principalmente en intestino delgado e hígado, pero también en riñón, testículo, útero, piel y músculo esquelético (Paik *et al.*, 2001; Redmond *et al.*, 2001). En humano se reportó la expresión de este mensajero en el epitelio de la retina (Yan *et al.*, 2001), al igual que en la retina del mono (Bhatti *et al.*, 2003).

La expresión del mensajero para β CO en los diferentes tejidos del organismo demuestra que el β -caroteno es un precursor importante para la formación de retinal en cada uno de estos sitios, y por consiguiente para desempeñar funciones específicas en la visión, la espermatogénesis, el desarrollo embrionario, e incluso para regular la expresión de diferentes genes en casi todos los tejidos del organismo.

Receptores de membrana para β -caroteno

Como el β -caroteno es un compuesto lipofílico, se ha sugerido que en la membrana celular de los vertebrados existen proteínas ligadoras específicas para este compuesto. Estas proteínas pudieran ser del tipo de los receptores "scavenger clase B" (SR-BI) involucrados en el metabolismo de las HDL en mamíferos (Rigotti *et al.*, 1997) y en la captación de carotenoides a partir de las lipoproteínas circulantes. Este hecho fue sugerido al estudiar cepas mutantes de *D. melanogaster* en el gen *ninaD*. Este gen codifica para un receptor de membrana similar a los receptores SR-BI observados en mamíferos. Los individuos portadores de la mutación además de ceguera presentan una distribución atípica de los carotenoides de la dieta, y al medir el flujo de colesterol entre las lipoproteínas y las células blanco se observa abolida su función debido a una mutación sin sentido para el gen que codifica este receptor (Kiefer *et al.*, 2002).

Regulación de la síntesis de vitamina A

La administración de dosis elevadas de β -caroteno en humanos no causa hipervitaminosis. Se ha sugerido que la síntesis de vitamina A por ruptura del β -caroteno debe ser regulada por los niveles de esta vitamina en el organismo (van Vliet *et al.*, 1996; Parvin y Sivakumar, 2000), respondiendo a un sistema de retroalimentación negativa en el cual interviene el ácido retinoico con sus receptores nucleares (Bachmann *et al.*, 2002); así como a otras proteínas dentro y fuera de la célula.

Recientemente, Boulanger *et al.* (2003) mencionaron que la expresión del gen de β CO en el ratón está regulada por un factor de transcripción, el receptor activado para la proliferación de peroxisomas (PPAR γ). Esta proteína asociada con un receptor X de retinoides (RXR) se une al elemento de respuesta a proliferador de peroxisomas (PPRE) en un sitio del DNA

cercano al gen de β CO estimulando su transcripción. Como el RXR se une principalmente a 9-cis-ácido retinoico, se ha sugerido que entonces los carotenoides y retinoides de la dieta afectan la expresión del gen de β CO y por tanto, el PPAR γ juega un papel importante en el metabolismo de los carotenoides, integrándolo entonces en la regulación del colesterol y otros lípidos, en donde los PPARs desempeñan una función importante activando otros genes involucrados en el anabolismo del tejido adiposo (Barak *et al.*, 1999).

Los PPARs y el ácido retinoico también regulan la expresión en intestino delgado de la proteína celular ligadora de retinol II (CRBP2) cuya función es ligar el retinal recién formado por la β CO (Vogel *et al.*, 2001).

Otra enzima inducida por el ácido retinoico de la dieta es la lecitin:retinol aciltransferasa (LRAT). La LRAT es importante en el metabolismo de la vitamina A, y su función es la de catalizar la síntesis de ésteres de retinilo, forma en que la vitamina A es almacenada en el hígado (Zolfaghari y Ross, 2000).

A pesar de que se conoce que las proteínas antes mencionadas contribuyen a la homeostasis de la vitamina A en el organismo, es necesario seguirlas estudiando para determinar con precisión sus mecanismos de acción y esclarecer su intervención en la regulación de la β CO y la síntesis de vitamina A.

Hipótesis

La secuencia de nucleótidos del cDNA que codifica para la enzima β CO de bovino está conservada en relación a las reportadas para otras especies.

La expresión del RNA mensajero y la actividad enzimática de β CO de bovino en duodeno e hígado, varía entre animales que presentan o no pigmentación del tejido adiposo de la canal.

La enzima β CO se encuentra expresada en las gónadas del bovino.

Objetivos

Objetivo general

Determinar la secuencia de nucleótidos del cDNA que codifica para la enzima β CO de bovino e identificar su expresión y actividad en intestino delgado e hígado de animales con pigmentación amarilla del tejido adiposo de la canal en comparación con animales cuya canal no presentó pigmentación del tejido adiposo.

Objetivos específicos

1. Identificar la secuencia de nucleótidos del cDNA que codifica para la enzima β CO de bovino.
2. Identificar y comparar la expresión de β CO en duodeno e hígado de animales cuya canal presentó pigmentación amarilla del tejido adiposo en comparación con aquellos que no hayan presentado pigmentación por hibridación *in situ* y RT-PCR cuantitativa.
3. Comparar la actividad enzimática de β CO en duodeno e hígado de animales cuya canal presentó pigmentación del tejido adiposo con aquellos que no hayan pigmentado su canal.
4. Identificar la expresión de β CO en ovario y testículo de bovino.

Materiales, Métodos y Resultados

Al final de esta tesis se anexan las principales técnicas empleadas durante el desarrollo del trabajo, y en la siguiente sección se incorporan los siguientes productos de investigación:

***Bos taurus* beta-carotene-15,15'-oxygenase, complete cds**

Morales A., González A., Antaramian A., Varela-Echavarría A., Shimada A., Mora O.

GenBank, accession number: DQ008469

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query>

Cloning of the bovine β -carotene-15,15'-oxygenase and expression in gonadal tissues

Adriana **Morales**, Antonio Rosas, Adriana González, Anaid Antaramian, Alfredo Varela-Echavarría, Armando Shimada, Ofelia Mora

Artículo en prensa por: *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*.

Differences in expression and activity of β , β '-carotene-15,15'-oxygenase between yellow and white bovine fat carcasses

Adriana **Morales**, Adriana González, Alfredo Varela-Echavarría, Armando Shimada, Ofelia Mora.

Artículo enviado a: *Animal Feed Science and Technology*.



PubMed Nucleotide



Protein Genome Structure



PMC Taxonomy

OMIM

My NCBI

[Sign In] [Register]

Books

Search Nucleotide

for

Go

Clear

Limits

Preview/Index

History

Clipboard

Details

Display GenBank

Show 5

Send to

Range: from begin

to end

Reverse complemented strand

Features: SNP CD

1: [DQ008469](#). Reports *Bos taurus* beta-c...[gi:62999033]

Links

LOCUS DQ008469 2130 bp mRNA linear MAM 07-MAY-2005
 DEFINITION *Bos taurus* beta-carotene-15,15'-oxygenase mRNA, complete cds.
 ACCESSION DQ008469
 VERSION DQ008469.1 GI:62999033
 KEYWORDS .
 SOURCE *Bos taurus* (cattle)
 ORGANISM *Bos taurus*
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Ruminantia;
 Pecora; Bovidae; Bovinae; *Bos*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 2130)
 AUTHORS Morales,A., Rosas,A., Gonzalez,A., Antaramian,A.,
 Varela-Echavarria,A., Shimada,A. and Mora,O.
 TITLE Cloning of the bovine beta-carotene-15,15'-oxygenase and expression
 in gonadal tissues
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 2130)
 AUTHORS Morales,A., Gonzalez,A., Antaramian,A., Varela-Echavarria,A.,
 Shimada,A. and Mora,O.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (14-APR-2005) Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan,
 Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Blvd. Bernardo Quintana
 514-D Suite 23-141, Queretaro 76140, Mexico
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..2130
 /organism="Bos taurus"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:9913"
 CDS 135..1925
 /note="BCO"
 /codon_start=1
 /product="beta-carotene-15,15'-oxygenase"
 /protein_id="AAY25023.1"
 /db_xref="GI:62999034"
 /translation="MEIIFGRNKKEQLEPVRARVTGKIPAWLQGILLRNGPGMHTVGE
 TRYNHWF DGLALLHSFTIRDGEVYYRSKYLRSDTYTANIEANRIVVSEFGTMAYPDPC
 KNIFSKAFSYLSHTIPDFTDNCLINIRRCGEDFYATTETS YIRRINPQTLETLEKVD
 RKYVAVNLATSHPHYDAAGNVLVNVTGSIIVDKGKTKYVIFKIPAPVPGGRKEGRSPLK
 TEVFC SIAAHSLLSPSYH SFGVSENYIIFLEQPFKLDILKMATAYIRGVS WASCLAF
 HGEDKTHIHIIDRRTRKPVPTKYHTDPMVVFHVNAYEEDGCLLEFDVITYEDGSLYQL"

FYLANLNEDFKENSRLTSMPTLKRFLVPLHVDKNAEVSNLIKLSSTTARALKEKDDQ
VYCQPELLCEGLELPHINYAHNGQPYRYIFAAGVQWSPRPLIYAAIRLAKSSLTWKEE
HCWPAEPLFVPTPGAKDEDDGIILSAIVSTDPQKSPFLLVLDARTFTELARASVDVEM
HLDFHGLFIPDAGRDPGKQAPSQEAPARAAAAGRAAPRTDSLEALVLTSSAQLTAVPA
PGEGRESGPSFHFAHLSAAALSQNSSETET"

ORIGIN

1 agagatccca agccctcgca gtgccatctg aagggagggg gatgtaaagg aagctgcagg
61 gaggggaagac aaggagtggc caagagcagt ccctgaacac ggacgagcat cgctctcgct
121 cagagccctg cacaatggaa ataatatctg gcagaaataa gaaggagcaa ctggagcctg
181 tgagggccag agtaacaggc aagattccag cctggctgca ggggatcctg ctccgcaatg
241 ggccctgggat gcacacgggtg ggcgagacca gatacaacca ctggttcgat ggccctggcct
301 tgcctccacag cttcaccatc agagatgggtg aagtctacta caggagcaaa tacctgagaa
361 gtgataccta cactgccaac atcgaagcaa acaggattgt ggtgtcagaa ttcggaacaa
421 tggcctatcc agaccctgc aaaaacatat ttccaaaagc tttctcctac ctgtcccaca
481 ctatccccga tttcacagac aactgtctga tcaacatcag gaggtgcgga gaagacttct
541 acgcgaccac agagaccagt tacatcagga ggaatcaacc ccagaccctg gaaaccctg
601 agaaggttga ttttcgtaaa tatgtggctg taaatctggc aacttcacat cctcactag
661 acgctgctgg aaatgttctc aatgttggca cgtccatcgt ggacaagggg aagacaaaat
721 acgtgatctt taagatccct gccccagtc cagggggcag gaaggagggc cggagcccc
781 tgaaggacac ggaggtcttc tgcctccatg ccgcccactc cctcctctcc ccgagctatt
841 accacagctt cggagtcagc gagaactaca tcattttcct cgagcagcct ttcaagttgg
901 acatcctcaa gatggccacg gcttacatc ggggtgtgag ctgggcttcc tgccctggcct
961 tccacgggga ggacaagact cacatccaca tcatcgaccg aaggacggg aagcccgtgc
1021 cgaccaagta tcacacggac cccatggtgg tatttcacca cgtcaatgcc tacgaggagg
1081 acggtgctt cctgctcgat gtcacacct acgaggacgg cagcctctac cagctctct
1141 acttggccaa cctgaacgag gactttaagg agaactccag gctcacctcc atgcccacc
1201 tcaagaggtt cgtgcttccc ctccacgtgg acaagaatgc agaagtggg tccaatttaa
1261 tcaaactgtc gtctacaaca gcacgagccc taaaggaaaa agatgaccag gtctactgtc
1321 agccggagtt gctctgtgaa ggcttagaac tgctccat caattatgcc cacaatgggc
1381 agccataccg ctatatcttt gctgctggag tccagtggag ccctaggcca ttgatttacg
1441 ccgcgattcg ccttgccaag tcctccttga cgtggaaaga ggagcactgc tggccggcgg
1501 agcccctgtt cgtgcccaca ccagtgcca aggacgagga tgatgggatt atcttatcgg
1561 ccatagtctc taccgatccc cagaagtcgc cttttctgct ggttctcgat gccagaactt
1621 ttacggaact ggcccgcgcg tccgtcgatg tggagatgca cctggatttc cacgggctgt
1681 tcatcccaga tgcaggcagg gaccgggga agcaggcccc ttcccaggag gcgcccggca
1741 gggctgccgc cggacgtgcg gcccgaagaa ctgacagcct ggaggcttg gtccctgggga
1801 ccagctccgc ccagctcacg gctgtccccg ccccggggga agggcgagg agtggctctt
1861 cgttccattt cgcacatatt ctttccgcag ctgcttgag tcaaattct gaaacggaaa
1921 cataagtgcg aatcgatgtg tatctttct tggcgaatct tttggcctg aggactatcc
1981 ttgactgagg ttaatattac ttggctaate tggcctactc tagcctggt agaagtctcg
2041 gtgcattcca caaacaccg gaactaacgt agccggggcc aagatgatat attatcgtg
2101 ccgecttctg gaaactgcc ggaaccggc

//

Disclaimer | Write to the Help Desk
NCBI | NLM | NIH

Dec 8 2005 13:13:13

Cloning of the Bovine β -Carotene-15,15'-Oxygenase and Expression in Gonadal Tissues

Adriana Morales¹, Antonio Rosas¹, Adriana González¹, Anaid Antaramian², Alfredo Varela-Echavarría², Armando Shimada¹ and Ofelia Mora¹

¹ Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Blvd. B. Quintana 514-D, Arboledas, Querétaro, Qro. México, CP 76140.

² Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 1-1141, Querétaro, Qro. México, CP 76001.

Received for publication: April 26, 2005; Accepted for publication: September 9, 2005

Abstract: Beta-carotene-15,15'-oxygenase (β CO), found mainly in intestinal mucosa and liver, is the enzyme responsible for cleaving β -carotene into retinal, which can be used or stored at these sites or carried by the bloodstream to different target cells within the body. We isolated the cDNA for bovine β CO and demonstrated its expression in gonadal tissues. A cDNA of 2130 base pairs (bp) was obtained by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE), using degenerate oligonucleotides; the deduced protein shared an identity of 75% with its homologues from other mammalian species. In order to evaluate the expression of this enzyme, we performed RT-PCR and *in situ* hybridizations in the ovary and testis of bovines. RT-PCR showed the expression of β CO in testis, ovary, and cultured granulosa cells. *In situ* hybridization of complete ovary and testis revealed expression in granulosa cells and the corpus luteum in the ovary and in germinal and interstitial cells in the testis. These results suggest that β -carotene could act as a local source of retinoids, which have been shown to be important during proliferation, differentiation, and maturation of both female and male germinal cells.

Key words: β -carotene, β -carotene oxygenase, bovine, testis, ovary, cDNA, vitamin A.

Introduction

The administration of vitamin A is a common procedure used to increase the reproductive performance of cattle and other species. The effect and specific function of the vitamin on the reproductive tract, however, has not thus far been elucidated.

Beta-carotene, the precursor of vitamin A, is a component of the forages consumed by herbivores; it is cleaved into two molecules of retinal by β -carotene-15,15'-oxy-

genase (β CO) in the intestinal mucosa and the liver [1, 2], where retinal and uncleaved β -carotene can be used, stored, or carried by the bloodstream to different target tissues in the body [3]. Retinal can then be converted into retinol and retinoic acid, the active forms of vitamin A, by the enzymes retinal dehydrogenase and alcohol dehydrogenase [4].

The first studies of β CO were conducted 40 years ago by Olson and Hayaishi [5], who observed that in the intestinal mucosa of rats, β -carotene was converted enzy-

matically into retinal; molecular oxygen and iron were required as cofactors. Other authors have demonstrated that intravenously injected vitamin A in rats is distributed to different tissues throughout the animal, including liver, kidneys, fat, plasma, small intestine, lungs, and adrenal glands [1].

In recent years, the role of β CO on vitamin A metabolism has been re-evaluated. Many researchers have confirmed that β CO is the main enzyme that cleaves β -carotene [2, 6]. Nevertheless, it has also been proposed that there are other enzymes that are able to cleave β -carotene at excentric linkages, yielding different apocarotenals which can also be converted into retinal [7, 8]. Biochemical studies performed on several species revealed that β CO is a cytosolic protein of 64–66 kDa with an optimum pH range of 7.8–8.2 [9, 10]. The activity of β CO is present in the intestine of rats [5, 11], chicks [12], humans [13], and bovines [14]. Studies in humans have also demonstrated the presence of β CO activity in pigmented retinal epithelium, liver, kidney, brain, and testis, where β -carotene could act as a local source of retinoids [15].

The main functions of vitamin A are related to vision, embryonic development, differentiation, and other processes such as the protection of membranes and mucosa [16]. Moreover, it seems that in tissues with steroidogenic activity, β -carotene has a special importance. In females, the compound reaches the ovary through the bloodstream coupled to high-density lipoproteins (HDL) [17], where it is stored in the corpus luteum. In bovines, the concentration of β -carotene in the corpus luteum rises to 60 μ g/g tissue [18]; however, an increase to 400 ng/g between the 6th and 16th days of the estrous cycle has also been reported, giving the tissue its characteristic yellow color [19].

Storage and metabolism of β -carotene, retinal, and retinoids are well regulated in the ovary. Gawienowski *et al* [20] and Sklan [21] have reported the synthesis of retinal from β -carotene in ovary and granulosa cells. On the other hand, Brown *et al* [22] and Mohan *et al* [23] demonstrated the expression of a retinoid receptor in these cells. In experiments with luteal cultures, β -carotene was reported to disappear from the medium during the synthesis of progesterone [17], several authors have suggested that β -carotene acts as an antioxidant during steroidogenesis [24, 25]. It has been proposed that β -carotene captures oxygen radicals generated during the cholesterol conversion to steroids by the cytochrome P450, hence decreasing peroxidation of lipidic mitochondrial membranes, thus protecting the cell proteins from oxidative damage and increasing steroid synthesis [26, 27].

In the testis it is known that retinoids are able to act on Sertoli and Leydig cells during cell differentiation and testosterone secretion [4]. Beta-carotene in the testis is

converted into retinoic acid, where it induces the regeneration of epithelium and the proliferation of spermatogonia at the seminiferous tubules [28, 29]. Retinoids are involved in the production of specific proteins such as androgen-binding protein, transferrin, and fibronectin [30] and the expression of multiple transcription factors [4].

In recent years, several authors have reported the isolation of β CO cDNAs of different species and their expression analysis [6, 15, 31, 32]), but this has not been reported in bovines. In the present work we cloned the cDNA for bovine β CO and detected its expression in ovaries and testis, where β -carotene and its products (retinoids) play their roles in cell proliferation and differentiation during gametogenesis.

Materials and Methods

All biological samples were taken from bovines at time of slaughter at Querétaro State municipal abattoir.

Isolation of cDNA for β CO

Samples of duodenal mucosa from bovine were homogenized in TRIzol (Invitrogen Life Technologies; Carlsbad, CA, USA) and transported on ice to the laboratory, where total RNA was isolated followed by a second purification of total mRNA using the Fast-Track kit (Invitrogen).

Based on the cDNA sequence for β CO from chicks and humans [6, 15], two degenerate oligonucleotides were designed, as follows:

Sense:

5' ATGGC(A/G/C/T)TA(C/T)CC(A/G/C/T)GA(C/T)CC(A/G/C/T)TG(C/T)AA(A/G)3'

Antisense:

5' TT(A/G/C/T)ACCG(A/G/C/T)(A/G/C/T)AC(A/G)TA(C/T)TT3'

A reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed, and a 251-base pair (bp) product was obtained. This product was cloned into TOPO 4.0 (Invitrogen) and sequenced in an automatic sequencer (ABI Prism, 310 Genetic Analyzer). Based on the sequence of this product, specific oligonucleotides were designed to direct the amplification of the cDNA 5' and 3' ends:

Sense: 5' CGAATGTAAGCCGTGGCCATCTT3'

Antisense: 5' TTCGGAGTCAGCGAGA3'

Further oligonucleotides were designed until the complete sequence was obtained using the Marathon cDNA amplification kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA) and Gene Race kit (Invitrogen) protocols. Vector NTI Suit 7.0 and 2.2.1 Blast program (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) were used for sequence analyses.

Analysis of β CO expression by RT-PCR

Total RNA was extracted from ovary, testis, and granulosa cells, using the RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany). The concentration of the isolated total RNA was determined spectrophotometrically, and its integrity was confirmed by visualizing the 16S and 28S ribosomal RNA bands on 1% denaturing formamide-agarose gels.

Cellular cultures from six ovaries of different Holstein cows were prepared in order to isolate total RNA from granulosa cells. Ovaries were washed and transported to the laboratory in saline physiological solution (SPS) at 30°C. The follicles were dissected and the membrane and follicular liquor were separated into cells through a syringe in phosphate-buffered saline (PBS). Cells were collected by centrifugation at 1000 rpm at 22°C for 10 minutes and resuspended in PBS; the centrifugation was repeated once and cells were finally resuspended in granulosa cell growth medium (GCGM). Granulosa cells (5×10^4 – 7.5×10^4 cells) were cultured in 10-mL Petri dishes at 37°C with 5% CO₂ for 48 hours [33]. Total RNA was extracted from these cells using the RNAEasy kit (Qiagen). Total RNA from ovary, testis, and granulosa cells was used for RT-PCR using the following oligonucleotides:

Sense: 5'TGGAGAAGACTTCTACGCGACCC3'

Antisense: 5'CTCCACTGGACTCCAGCAGCAA3'.

PCR conditions were 2 minutes at 94°C; 40 cycles of 94°C/45 seconds and 65°C/1 minute; and an extension of 72°C/1 minute; using a HiFi Taq polymerase (Invitrogen) with 1 mM MgCl₂, and the buffer recommended by the manufacturers. A PCR product of 892 bp was confirmed by agarose gel electrophoresis. The PCR product was cloned into TOPO vector following the manufacturer's protocol (Invitrogen) and sequenced.

In situ hybridization

The sense 5'CCCTGGAGAAGGTTGATTTTCGTAA3' and antisense 5'CTCCACTGGACTCCAGCAGCAA3' oligonucleotides were used for RT-PCR amplification of a β CO cDNA fragment of 826 bp (from nucleotides 641–1467). This PCR product was inserted into TOPO 4.0

(Invitrogen). Sense and antisense digoxigenin-labeled probes for β CO were derived from the resulting vector using the restriction enzymes Not I and Spe I, and T3 and T7 RNA polymerases, respectively.

In situ hybridizations were performed with tissue samples from ovary and testis obtained from Holstein cattle (eight females and eight males) immediately after slaughter. Samples were washed with SPS, cut into 0.5 cm³ pieces and placed in 3.5% paraformaldehyde for 24 hours. Samples were cryoprotected and frozen sections were obtained and dried at –20°C for 12 hours. *In situ* hybridization was performed as previously described [34]. Sense and antisense digoxigenin-labelled probes for β CO were used.

Results and Discussion

Cloning of β CO cDNA

Since it is well known that in different species β CO is expressed at high levels in the duodenum and liver [35–37], we decided to use the equivalent tissue to clone the bovine β CO cDNA. Using mRNA from bovines, we were able to clone a 2130 bp fragment and the complete sequence of the β CO cDNA was obtained. The bovine cDNA revealed an identity of 75% with human, mouse, and rat; and a low identity with the cDNAs from chick and *Drosophila* (41% and 52%, respectively) (Figure 1). This sequence was submitted to the Gene-Bank and its accession number is DQ008469.

The bovine cDNA sequence showed a putative initiation codon at position 135 and an open reading frame (ORF) of 1788 bp, which is on average 135 bp longer than those from other mammal species. The *in silico* translation of the cDNA sequence yielded a protein of 596 amino acids with an estimated molecular weight of 66.6 kDa. The deduced amino acid (aa) sequence of this protein was aligned with the homologous sequences from other vertebrate species (Figure 2). The bovine β CO presents 74% identity with other mammal species, and 59% identity with chick. Among the mammalian sequences analyzed, several well-conserved regions were observed (from aa 47–60, 83–129, 162–184, and 229–245).

Kloer *et al* [38], reported the crystal structure of the apocarotenoid-15,15'-oxygenase (ACO) from *Synechocystis* sp. as a model for this family of retinal forming enzymes. The model shows an Fe²⁺-4-histidine arrangement at the axis of seven-bladed β -propeller chain fold covered by a dome formed by six large loops. Based on this model we depicted the β -strands and the β -helix in our alignment (Figure 2), and found the conserved histidines in the bovine protein at positions 172, 237, 308,

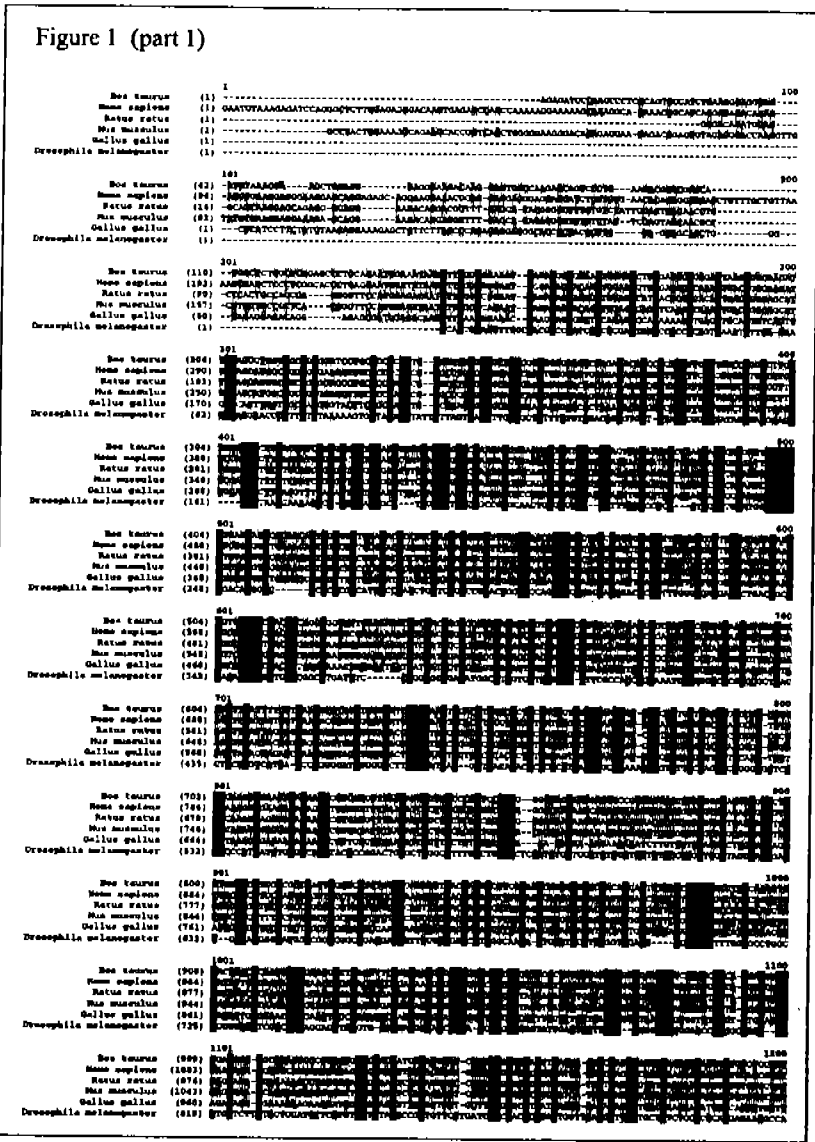


Figure 1a, b: Comparative alignment of cDNA sequences for β CO from *Bos taurus*, *Homo sapiens*, *Rattus rattus*, *Mus musculus*, *Gallus gallus*, and *Drosophila melanogaster*. Black color corresponds to identical nucleic acids and gray to conserved nucleic acids among sequences.

and 513 of the aa sequence. Finally, the comparison between bovine and *Synechocystis* aa sequences present several conserved acidic residues in the β -stands that are associated to the electron transfer during catalysis [39]. The β 20, β 24, and β 28 strands are among the most conserved regions through all species, and show a total of four conserved glutamic acid residues; the β 6 has a conserved aspartic acid in all species except *Synechocystis*, this feature is also present in the β 32 strand; and the β 10 shows an aspartic acid moved one position in *Synechocystis*.

Expression of β CO in gonadal tissues

To assess the β CO expression in ovary, testis and cultured granulosa cells, we performed RT-PCR and detected an 892-bp β CO fragment in all the tissues analyzed (Figure 3). The RT-PCR product from the testis was similar to others found in mouse [32] and human [15] tissues. Further analysis was performed by *in situ* hybridization in ovary, corpus luteum, and testis. Expression of β CO was detected in granulosa cells and corpus luteum in the ovary, and in Leydig and Sertoli cells in the testis (Figure 4). Simi-

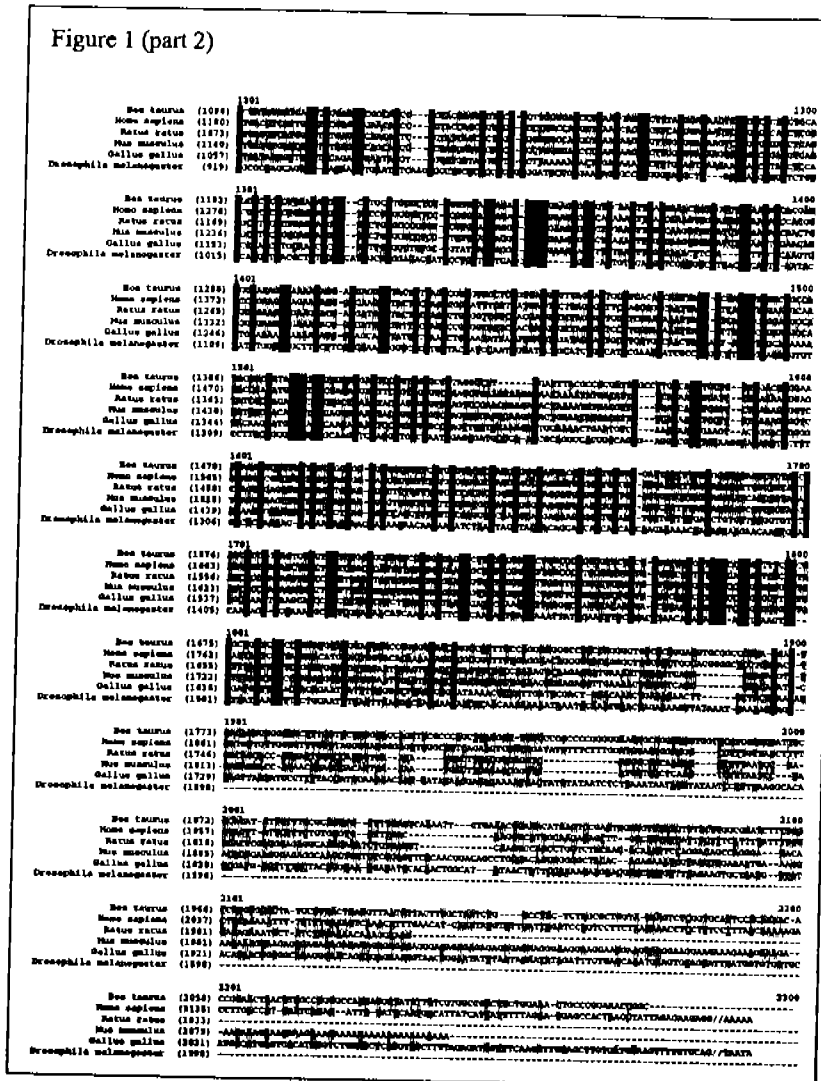


Figure 1b

lar results have been reported in human ovaries specifically in granulosa cells and the theca interna [40]. To date, there have been no reports regarding the accumulation of β -carotene in granulosa cells, but it is known that this compound is present in the follicular liquor [41, 42]. Our results suggest that granulosa cells could use the β -carotene as a source of retinoids, which could be important for cellular proliferation and differentiation into luteal cells.

Our analysis in the corpus luteum revealed β CO expression in luteal cells hence suggesting that β -carotene could be used as a local source of retinoids. For almost 30 years, several authors have suggested the possible cleavage of β -carotene into vitamin A in the corpus luteum [20, 21, 25]. It has also been shown that the β -carotene-cleav-

ing enzymatic activity in this structure during ovulation is twice as high as in the intestine [21]. The potential relevance of β -carotene as a source of retinal in this structure is consistent with the presence of retinal and retinoic-acid-binding proteins in corpus luteum and granulosa cells [22, 23].

As well as its potential relevance as a source of retinal in the corpus luteum, it is known that β -carotene plays an important role as an antioxidant during steroidogenesis [17, 27, 43]. Beta-carotene reaches the ovary and corpus luteum through the bloodstream coupled to HDL [17] and is stored in luteal cells bound to cytosolic and membrane proteins [19]. Luteal levels of β -carotene change during the estral cycle, are positively correlated with the size of

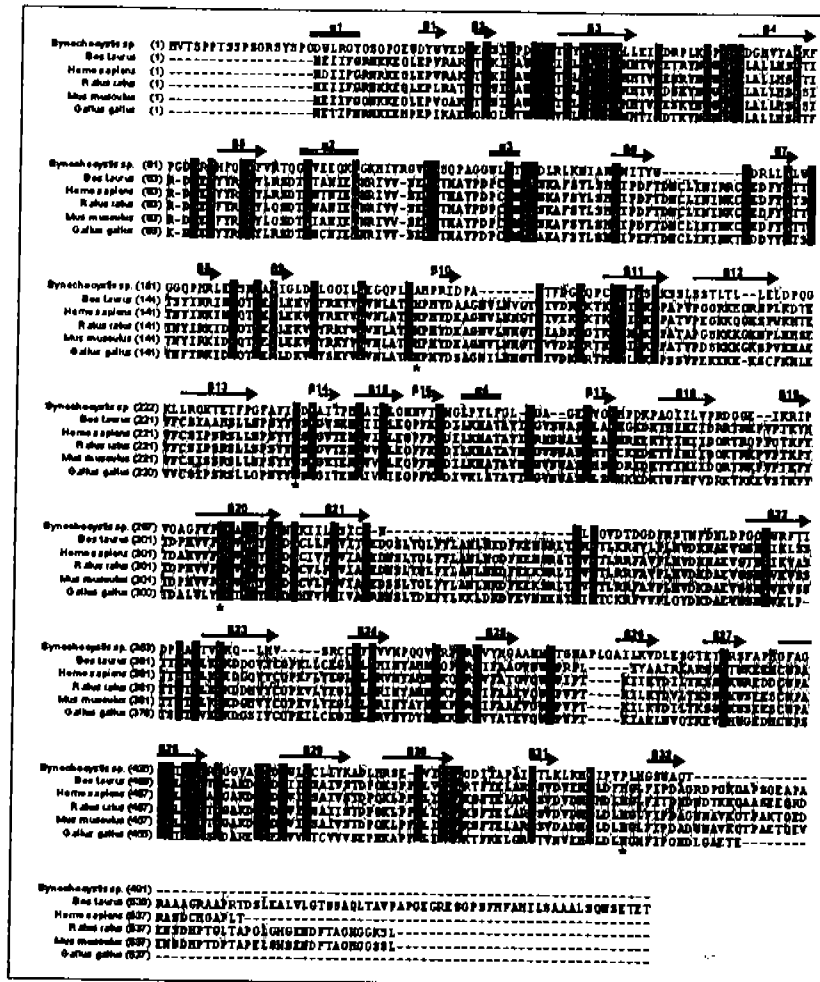


Figure 2: Comparative alignment of deduced (CO aa sequences from *Bos taurus*, *Homo sapiens*, *Rattus rattus*, *Mus musculus*, *Gallus gallus*, and (ACO) from *Synechocystis sp.* Black color corresponds to identical amino acids and gray to conserved amino acids among sequences. Arrows and double lines indicate the β -strands and the α -helices of the model for these enzymes. Asterisks correspond to the four conserved histidine residues related to Fe^{2+} binding site.

the corpus luteum, and have been implicated in progesterone production [25,42,44].

In the testis, the results of *in situ* hybridization showed the expression of β CO in Leydig and Sertoli cells. Similar results on the expression of this protein in chick, mouse, and human testis have been reported previously [8, 15, 32, 36, 38, 40]. In mouse testis, Paik *et al* [32] found high expression of β CO and suggested that β -carotene acts as an important source of retinoids to maintain testicular function. The presence of different retinol-binding proteins in the testis, which play important roles in spermatogenesis and steroidogenesis, has also been demonstrated [45, 46]. In Sertoli cells, retinoids promote the synthesis of specific proteins that participate in their proliferation and differentiation into sperm cells [30]. Furthermore, a deficiency of vitamin A induces the cessation of spermatogenesis and the degeneration of germ cells [4], whereas the

administration of vitamin A to vitamin A-deficient rats causes the regeneration of the seminiferous epithelium and the proliferation and differentiation of spermatogonia to elongated spermatids [28]. In Leydig cells, retinoids help to maintain and stimulate the basal secretion of testosterone, and they may also reduce the expression of luteinizing hormone (LH) receptors and increase the expression of certain enzymes involved in steroidogenesis [4, 45].

Conclusions

In this study we report the cloning of bovine β CO cDNA and demonstrate mRNA β CO expression in bovine gonadal tissues. The presence of β -carotene and β CO in granulosa cells, in the corpus luteum, and in Leydig and Ser-

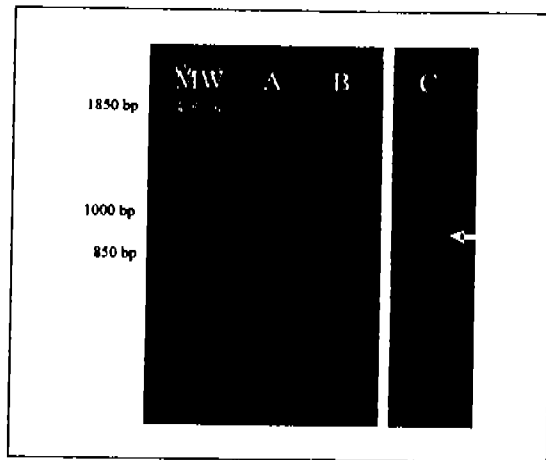


Figure 3: Agarose gel electrophoresis of 892 bp RT-PCR product (white arrow) from gonadal bovine β CO cDNA. Lanes: MW. Molecular weight DNA ladder, A. bovine ovary, B. testis and C. granulosa cells culture (line C was cut and aligned from its original gel).

toli cells suggests an important role of carotene in reproductive functions. This role could be dual, as β -carotene is known to be an important antioxidant and, as our results suggest, it could be a source of retinal and hence of other retinoids, which are also involved in gametogenesis and in steroidogenesis.

Acknowledgments

Adriana Morales expresses gratitude to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)-México for granting a Ph.D. scholarship at Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. This work was supported by a grant from the CONACYT-México (J31295B). We thank Nancy Boston for editing the manuscript.

References

1. Goodman, D. S., Huang, H. S., Kanai, M. and Shiratori, T. (1965) Tissue distribution and metabolism of newly absorbed vitamin A in the rat. *J. Lipid Res.* 6, 390-396.
2. Barua, A. B. and Olson, J. A. (2000) β -Carotene is converted primarily to retinoids in rats *in vivo*. *J. Nutr.* 130, 1996-2001.
3. Gottesman, M. E., Quadro, L. and Blaner, W. S. (2001) Studies of vitamin A metabolism in mouse model systems. *BioEssays* 23, 409-419.
4. Livera, G., Rouiller-Fabre, V., Pairault, C., Levacher, C. and Habert, R. (2002) Regulation and perturbation of testicular functions by vitamin A. *Reproduction* 124, 173-180.
5. Olson, J. A. and Hayaishi, O. (1965) The enzymatic cleavage of β -carotene into vitamin A by soluble enzymes of rat liver and intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 54, 1364-1370.
6. Wyss, A., Wirtz, G., Woggon, W., Brugger, R., Wyss, M., Friedlein, A., Bachmann, H. and Hunziker, W. (2000) Cloning and expression of β , β -carotene 15,15'-dioxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271, 334-336.
7. Wang, X.-D. and Krinsky, N. I. (1997) Identification and quantification of retinoic acid and other metabolites from β -carotene excentric cleavage in human intestine *in vitro* and ferret intestine *in vivo*. *Methods Enzymol.* 282, 117-130.
8. Kiefer, C., Heasel, S., Lampert, J. M., Vogt, K., Lederer, M. O., Breithaupt, D. E. and von Lintig, J. (2001) Identifi-

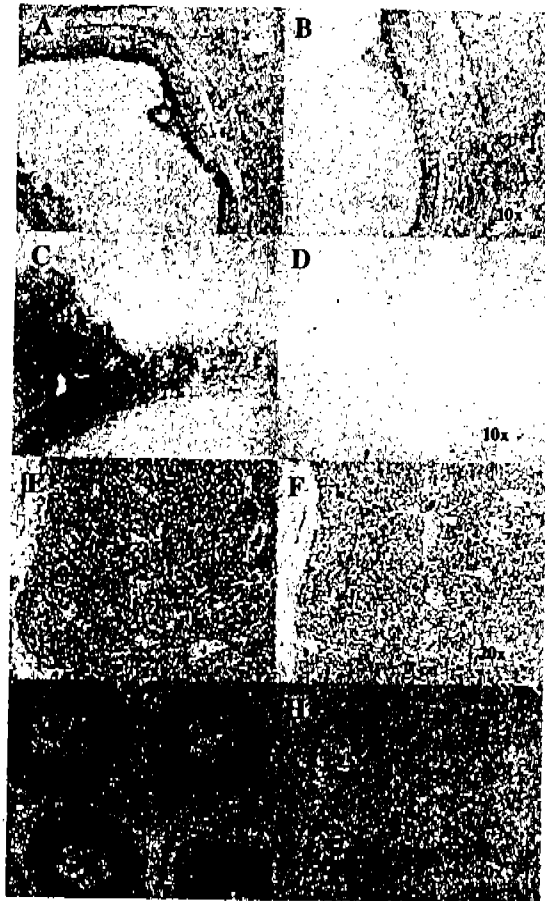


Figure 4: *In situ* hybridizations for detection of β CO expression on gonadal tissues. A. Ovary antisense probe (10 \times), shows expression on granulosa cells into follicle. B. Ovary sense probe (10 \times). C. Ovary antisense probe (10 \times), shows expression on cells from corpus luteum in regression. D. Ovary sense probe (10 \times). E. Ovary antisense probe (20 \times), shows expression on cells from active corpus luteum. F. Ovary sense probe (20 \times). G. Testis antisense probe (20 \times) shows expression on Sertoli (s) and Leydig (l) cells. H. Testis sense probe (20 \times).

- cation and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A. *J. Biol. Chem.* 276, 14110-14116.
9. Fidge, N.H., Smith, F.R. and Goodman, D.S. (1969) Vitamin A and carotenoids: the enzymatic conversion of β -carotene into retinal in hog intestinal mucosa. *Biochem. J.* 114, 689-694.
 10. Lakshman, M.R. and Okoh, C. (1993) Enzymatic conversion of all-trans- β -carotene to retinal. *Methods Enzymol.* 214, 256-269.
 11. During, A., Nagao, A. and Terao, J. (1998) β -carotene 15,15'-dioxygenase activity and cellular retinol-binding protein type II level are enhanced by dietary unsaturated triacylglycerols in rat intestines. *J. Nutr.* 128, 1614-1619.
 12. Sklan, D. (1983) Carotene-cleavage activity in chick intestinal mucosa cytosol: association with a high-molecular-weight lipid-protein aggregate fraction and partial characterization of the activity. *Br. J. Nutr.* 50, 417-425.
 13. Lakshman, M.R., Johnson, L.H., Okoh, C., Attlesey, M., Mychkovsky, I. and Bhagavan, H.N. (1993) Conversion of all trans β -carotene to retinal by an enzyme from the intestinal mucosa of human neonates. *J. Nutr. Biochem.* 4, 659-663.
 14. Mora, O., Romano, J.L., González, E., Ruiz, F. and Shimada, A. (2000) Low cleavage activity of 15,15'-dioxygenase to convert β -carotene to retinal in cattle compared with goats, is associated with the yellow pigmentation of adipose tissue. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.* 70, 199-205.
 15. Yan, W., Jang, G-F., Haeseleer, F., Esumi, N., Chang, J., Kerrigan, M., Campochiaro, M., Campochiaro, P., Palczewski, K. and Zack, J.D. (2001) Cloning and characterization of a human β , β -carotene 15,15'-dioxygenase that is highly expressed in the retinal pigment epithelium. *Genomics* 72, 193-202.
 16. Napoli, J.L. (1996) Retinoic acid biosynthesis and metabolism. *FASEB J.* 10, 993-1001.
 17. Arkan, S. and Rodway, R.G. (2000) Effects of high density lipoprotein containing high or low β -carotene concentrations on progesterone production and β -carotene uptake and depletion by bovine luteal cells. *Anim. Reprod. Sci.* 62, 253-263.
 18. Austern, B.M. and Gawienowski, A.M. (1969) The isolation of retinal from the bovine corpus luteum. *J. Reprod. Fert.* 19, 203-205.
 19. O'Fallon, J.V. and Chew, B.P. (1984) The subcellular distribution of β -carotene in bovine corpus luteum. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 177, 406-411.
 20. Gawlenowski, A.M., Stacewicz-Sapuncakis, M. and Longley, R. (1974) Biosynthesis of retinal in bovine corpus luteum. *J. Lipid Res.* 15, 375-379.
 21. Sklan, D. (1983) Carotene cleavage activity in the corpus luteum of cattle. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.* 53, 23-26.
 22. Brown, J.A., Eberhardt, D.M., Schrick, F.N., Roberts M.P. and Godkin, J.D. (2003) Expression of retinol-binding protein and cellular retinol-binding protein in the bovine ovary. *Mol. Reprod. Dev.* 64, 261-269.
 23. Mohan, M., Thirumalapura, N.R. and Malayer, J. (2003) Bovine cumulus-granulosa cells contain biologically active retinoid receptors that can respond to retinoic acid. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1, 104.
 24. Dembinski, Z. and Bronicki, M. (1994) Progesterone P-4 level in blood and the values of select fertility indexes in cows fed various doses of carotene. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 38, 115-118.
 25. Rapoport, R., Sklan, D., Wolfenson, D., Shaham-Albalancy, A. and Hanukoglu, I. (1998) Antioxidant capacity is correlated with steroidogenic status of the corpus luteum during the bovine estrous cycle. *Biochim. Biophys. Acta* 1380, 133-140.
 26. Hornsby, P.J. (1980) Regulation of cytochrome P-450-supported 11 β -hydroxylation of deoxycortisol by steroids, oxygen, and antioxidants in adrenocortical cell cultures. *J. Biol. Chem.* 255, 4020-4027.
 27. Young, F.M., Luderer, W.B. and Rodgers, R.J. (1995) The antioxidant β -carotene prevents covalent cross-linking between cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 and its electron donor, adrenodoxin, in bovine luteal cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 109, 113-118.
 28. van Pelt, A.M. and de Rooij, D.G. (1991) Retinoic acid is able to reinitiate spermatogenesis in vitamin A-deficient rats and high replicate doses support the full development of spermatogenic cells. *Endocrinology* 128, 697-704.
 29. Gaemers, I.C., van Pelt, A.M., van der Saag, P.T. and de Rooij, D.G. (1996) All-trans-4-oxo retinoic acid: a potent inducer of *in vivo* proliferation of growth-arrested A spermatogonia in the vitamin A-deficient mouse testis. *Endocrinology* 137, 479-485.
 30. Cavazzini, D., Catizone, A., Galdieri, M. and Ottonello, S. (2003) Vitamin A metabolism in cultured somatic cells from rat testis. *Mol. Cell. Biochem.* 252, 165-171.
 31. von Lintig, J. and Vogt, K. (2000) Filling the gap in vitamin A research: molecular identification of an enzyme cleaving β -carotene to retinal. *J. Biol. Chem.* 275, 11915-11920.
 32. Palk, J., During, A., Harrison, E.H., Mendelsohn, L.C., Lai, K. and Blaner, W.S. (2001) Expression and characterization of a murine enzyme able to cleave β -carotene: the formation of retinoids. *J. Biol. Chem.* 276, 32160-32168.
 33. Marsters, P., Kendall, N.R. and Campbell, B.K. (2003) Temporal relationships between FSH receptor, type I insulin-like growth factor receptor, and aromatase expression during FSH-induced differentiation of bovine granulosa cells maintained in serum-free culture. *Mol. Cell. Endocrinol.* 203, 117-127.
 34. Varela-Echavarría, A., Pfaff, S.L. and Guthrie, S. (1996) Differential expression of LIM homeobox genes among motor neuron subpopulations in the developing chick brain stem. *Mol. Cell. Neurosci.* 8, 242-257.
 35. van Vliet, T., van Schalk, F., Schreurs, W.H. and van der Berg, H. (1996) *In vitro* measurement of β -carotene cleavage activity: methodological considerations and the effect of the other carotenoids on β -carotene cleavage. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.* 66, 77-85.
 36. Wyss, A., Wirtz, G.M., Woggon, W.-D., Brugger, R., Wyss, M., Friedlein, A., Riss, G., Bachmann, H. and Hunziker, W. (2001) Expression pattern and localization of β , β -carotene 15,15'-dioxygenase in different tissues. *Biochem. J.* 354, 521-529.

37. Lindqvist, A. and Andersson, S. (2002) Biochemical properties of purified recombinant human β -carotene 15,15'-monooxygenase. *J. Biol. Chem.* 277, 23942-23948.
38. Kloer, D., Ruch, S., Al-Babli, S., Beyer, P. and Shulz G. (2005) The structure of a retinal forming carotenoid oxygenase. *Science* 308, 267-269.
39. Redmond, T.M., Gentleman, S., Duncan, T., Yu, S., Wiggert, B., Gantt, E. and Cunningham, F.X., Jr. (2001) Identification, expression, and substrate specificity of a mammalian β -carotene 15,15'-dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 276, 6560-6565.
40. Lindqvist, A. and Andersson, S. (2004) Cell type-specific expression of β -carotene 15,15'-mono-oxygenase in human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 52, 491-499.
41. Chew, B.P., Holpuch, D.M. and O'Fallon, J.V. (1984) Vitamin A and β -carotene in bovine and porcine plasma, liver, corpora lutea, and follicular fluid. *J. Dairy Sci.* 67, 1316-1322.
42. Haliloglu, S., Baspinar, N., Serpek, B., Erdem, H. and Bulut, Z. (2002) Vitamin A and β -carotene levels in plasma, corpus luteum and follicular fluid of cyclic and pregnant cattle. *Reprod. Dom. Anim.* 37, 96-99.
43. Rodgers, R.J., Lavranos, T.C., Rodgers, H.F., Young, F.M. and Vella, C.A. (1995) The physiology of the ovary: maturation of ovarian granulosa cells and a novel role for antioxidants in the corpus luteum. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 53, 241-246.
44. Graves-Hoagland, R.L., Hoagland, T.A. and Woody, C.O. (1989) Relationship of plasma beta-carotene and vitamin A to luteal function in postpartum cattle. *J. Dairy Sci.* 72, 1854-1858.
45. López-Fernández L. A. and del Mazo, J. (1997) The cytosolic aldehyde dehydrogenase gene (*Aldh1*) is developmentally expressed in Leydig cells. *FEBS Lett.* 407, 225-229.
46. Zhai, Y., Sperkova, Z. and Napoli, J.L. (2001) Cellular expression of retinal dehydrogenase types 1 and 2: effects of vitamin A status on testis mRNA. *J. Cell. Physiol.* 186, 220-232.

Ofelia Mora

PMB 23-141
413 Interamerican Boulevard WHI
Laredo, TX 78045 USA
E-mail: ofemora2001@yahoo.com.mx
Tel. +52 (442) 2381032
Fax +52 (442) 2381038

1 **Differences in expression and activity of β,β' -carotene-15,15'-oxygenase between**
2 **yellow and white bovine fat carcasses.**

3 A. Morales^a, A. González^a, A. Varela-Echavarría^b, A. Shimada^a, O. Mora^{a*}

4 ^a*Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Blvd. B.*
5 *Quintana 514-D, Arboledas, Querétaro, Qro. México, CP 76140.*

6 ^b*Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 1-1141,*
7 *Querétaro, Qro. México, CP 76001.*

8

9 **Abstract**

10 Pasture-fed cattle show yellow pigmentation of their fat due to β -carotene stores in the tissues. β,β' -
11 carotene-15,15'-oxygenase (β CO) is an enzyme expressed in different tissues, and it cleaves β -
12 carotene into retinal. We compared the expression and activity of β CO in duodenum and liver of cattle
13 with pigmented or non-pigmented fat. In the duodenum, *in situ* hybridizations showed expression of
14 β CO in epithelial cells and crypts of the mucosa that was similar between pigmented and non-
15 pigmented animals; liver showed diffuse signal at lobules, but pigmented animals showed higher
16 signal near the portal space. Analyses by real time RT-PCR also showed amplification of mRNA for
17 β CO, with no difference between pigmented or non-pigmented animals. Enzyme activity was similar
18 in the duodenum, but pigmented animals had higher enzyme activity ($P=0.004$) in liver. Cattle with
19 pigmented fat had higher expression and activity of β CO in liver, but its level was not high enough to
20 prevent the storage of β -carotene in adipose tissues.

21 **Key words:** β -carotene, β -carotene oxygenase, vitamin A, cattle, yellow fat, duodenum, liver.

1 *Abbreviations:* β CO, β,β' -carotene-15,15'-oxygenase; PCR, polymerase chain reaction; RT-PCR,
2 reverse transcription-polymerase chain reaction; RNA, ribonucleic acid; mRNA, messenger
3 ribonucleic acid; cDNA, complementary deoxyribonucleic acid.

4 *Corresponding author. Tel.: +52 442 238 1032; fax: +52 442 238 1038. *E-mail address:*
5 ofemora2001@yahoo.com.mx

6

7 **Introduction**

8 Most cattle in tropical countries are pasture-fed, due to the high production and good quality of
9 forages, but under these conditions the carcasses of about 10% of the animals show yellow
10 pigmentation of the body fat, which results from the storage of β -carotene in the adipose tissue. The
11 yellowness of carcasses is an important economic problem, because beef with unpigmented fat is
12 preferred, although the color affects neither the flavor nor the nutritive value of the meat (Mora and
13 Shimada, 2001).

14 Carotenoids are chemical compounds normally present in green forages, β -carotene being predominant
15 (Morgan et al., 1969). β -Carotene is not affected by ruminal fermentation (van Soest, 1994) and is
16 transported to the small intestine, where it is absorbed. In the enterocyte the enzyme β,β' -carotene-
17 15,15'-oxygenase (β CO) cleaves the central linkage of β -carotene producing two molecules of retinal
18 or vitamin A (Glover, 1960). Cattle consume large quantities of β -carotene, but not all of this
19 compound is absorbed and cleaved into vitamin A in the small intestine; the excess of vitamin A and
20 β -carotene is packaged into the chylomicrons and transported to the liver, where they can be cleaved
21 by β CO, stored with other lipid compounds, and carried to different tissues (Gottesman et al., 2001)
22 including the adipose tissue (Yang et al., 1992).

1 It has been shown that the conversion efficiency of β -carotene into retinal or vitamin A inside the
2 mucosal cells varies depending on the animal species (Tee et al., 1992), and that the ability of the
3 intestine to cleave β -carotene into retinal is five times lower in bovine than in goat; the former could
4 increase the deposition of β -carotene in adipose tissue and thus the yellowness of their carcasses (Mora
5 et al., 2000). To solve this problem, some producers finish their animals with grain for 28 to 56 days
6 before slaughter (Forrest, 1981). This procedure helps to reduce the yellowness of fat, but it increases
7 the production costs.

8 The sequence of the gene for β CO has been published (Von Liting y Vogt, 2000; Paik et al., 2001;
9 Wysss et al., 2001; Yan et al., 2001). The protein has been reported in the intestinal mucosa and liver
10 of different species, and also in other tissues such as lung, kidney, and brain (Paik et al., 2001; Wysss
11 et al., 2001). Recently, we reported the cDNA sequence of bovine β CO and its expression in gonadal
12 tissues, and we discussed its importance in vitamin A formation (Morales et al., 2006).

13 The aim of this study was to determine if the expression and activity of β CO in duodenal and hepatic
14 tissues is different between animals with pigmented or unpigmented carcass fat.

15 **Materials and Methods**

16 All biological samples were obtained from cattle at the time of slaughter at the Queretaro municipal
17 municipal abattoir.

18 *In situ* hybridizations

19 A sample of bovine duodenal mucosa was homogenized in TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA),
20 and total RNA was isolated. A reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR) was
21 performed using oligonucleotides, sense 5'CCCTGGAGAAGGTTGATTTTCGTAA3' and antisense
22 5'CTCCACTGGACTCCAGCAGCAA3', to obtain an 826 bp product. The product was inserted into
23 a TOPO vector 4.0 (Invitrogen), automatically sequenced, and aligned with the Vector NTI program to

1 verify its identity as bovine β CO (GenBank DQ008469, gi:62999033). Sense and antisense
2 digoxigenin-labelled probes for β CO were derived from the resulting vector using the restriction
3 enzymes Not I and Spe I, and T3 and T7 RNA polymerases, respectively.

4 Samples of duodenal and hepatic tissues from eight animals that showed yellow fat pigmentation and
5 eight that did not were washed with 0.9% of sodium chloride solution, cut into 0.5 cm³ pieces, and
6 fixed in 3.5% of paraformaldehyde for at least 24 hours. The samples were cryoprotected, frozen in dry
7 ice, and stored at -80 °C until used.

8 Tissues were sliced at 15 μ m, adhered onto glass slides for in situ hybridizations, and dried at -20°C
9 for 12 hours. In situ hybridizations were performed as previously described Varela-Echavarria et al.
10 (1996).

11 Quantitative RT-PCR

12 Samples of duodenal mucosa and liver were obtained from eight pigmented and eight non-pigmented
13 bovine carcasses. They were immediately homogenized in TRIzol (Invitrogen) and transported on ice
14 to the laboratory, where total RNA was isolated, followed by a second purification using the RNeasy
15 Kit (Quiagen, Germany). The concentration of the isolated total RNA was determined
16 spectrophotometrically, and its quality was evaluated by detection of 16S and 28S ribosomal RNA
17 bands on 1% denaturing formamide-agarose gels.

18 All RT-PCR reactions were performed in a real time thermocycler (Light Cycler; Roche, Germany).
19 The equipment was calibrated with a standard curve using known concentrations of the same cDNA
20 cloned into a TOPO vector 4.0. Samples containing 500 ng of total RNA, quantified by spectroscopy
21 and gel electrophoresis, were used for RT-PCR. Reactions were performed with the RNA
22 Amplification Kit (Roche, USA) using the manufacturer's protocol in a final reaction volume of 20 μ l.
23 The amplification conditions were: RT 55 °C/10 min; denaturing 95 °C/30 sec; amplification 40 cycles

1 of 95 °C/10 sec, 60 °C/15 sec, 72 °C/35 sec; denaturing 95 °C/2 sec, 65 °C/15 sec, 95 °C/10 sec
2 (transition rate 0.1 °C/sec); cooling 35 °C/30 sec.

3 The oligonucleotides used for assays were sense 5'CCCTGGAGAAGGTTGATTTTCGTAA3' and
4 antisense 5'GAAAATGATGGTAGTTCTCGCTGACT3', resulting in a 285 bp cDNA product, which
5 had been cloned previously into TOPO vector 4.0 and sequenced to verify its identity.

6 Enzyme assays

7 Immediately after slaughter, four pigmented and four non-pigmented carcasses were sampled to obtain
8 2 g of duodenal mucosa (scraped off using a glass slide) and liver. Samples were flushed with cold
9 NaCl buffer, carried to the laboratory on ice with 20 ml of 100 mM potassium phosphate buffer, pH
10 7.7 containing 4 mM MgCl₂, 30 mM nicotinamide, and 1 mM dithiothreitol (van Vliet et al., 1996a).
11 Samples were homogenized, centrifuged for 20 min at 9000 x g, and the supernatant (S9) was
12 recovered. Small sub-samples of S9 were stored at -20 °C for protein analyses using the method
13 described by Bradford (1976). The βCO assay was performed as described previously by van Vliet et
14 al. (1996a), and final products of the enzyme assays were re-suspended with 50 µL of water, 50 µL of
15 37% (w/w) formaldehyde, and 500 µL of acetonitrile. The retinal formed was quantified on an HPLC
16 system as described During et al. (1996). All work with carotenoids was performed under yellow light
17 and cold conditions.

18 Statistical analysis

19 Data from real time PCR and enzyme assays were analysed by analysis of variance for a completely
20 randomised design in order to detect differences between pigmented or non-pigmented carcasses, using
21 the general lineal model of SAS system for windows V8. The model was:

$$22 Y_{ij} = \mu + c_i + E_{ij}$$

23 where

1 Y_{ij} = data from real time PCR or enzyme assay

2 μ = general mean

3 c_{ci} = carcass colour (i = pigmented or non-pigmented)

4 and E_{ij} = experimental error.

5 The LSM test was used to compare means.

6

7 **Results**

8 *In situ* hybridizations

9 Figure 1 shows the results for *in situ* hybridizations of duodenum and liver from pigmented and non-
10 pigmented cattle. The hybridizations on duodenal tissue showed no differences in intensity of β CO
11 expression between animals. However, there was a clear difference in liver, where pigmented animals
12 showed higher expression of the mRNA for β CO. Little difference of β CO expression was observed
13 between animals from the same group.

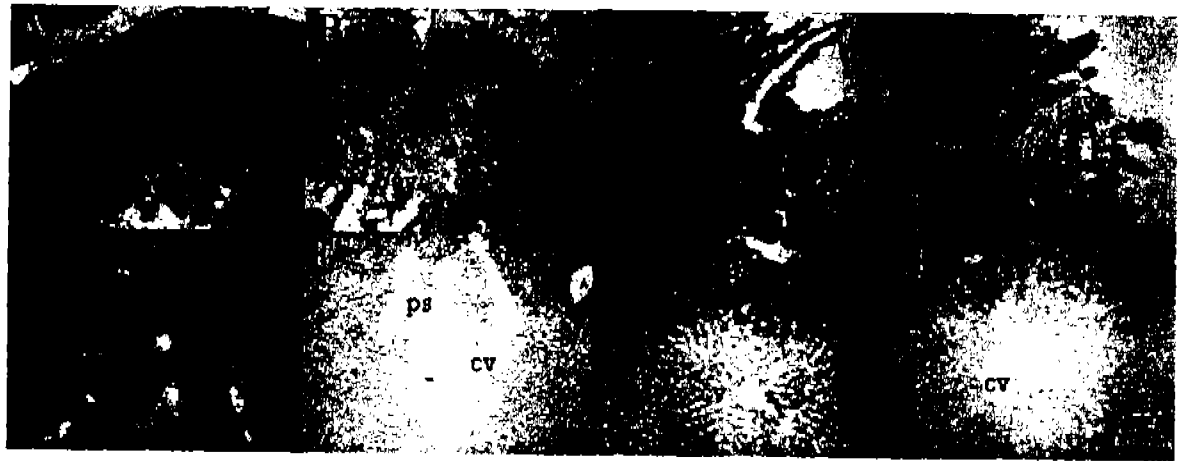
14

15 Quantitative RT-PCR

16 Real time RT-PCR showed a clear amplification of the messenger for β CO from the total RNA
17 samples of liver and duodenal mucosa derived from pigmented vs. non-pigmented animals. For
18 duodenal mucosa samples, the specific cDNA amplification started at cycle 24 of PCR, and they had
19 on average 1.59×10^5 copies of mRNA/ μ g total RNA ($SD = 2.69 \times 10^5$) in non-pigmented and $5.56 \times$
20 10^4 copies of mRNA/ μ g total RNA ($SD = 4.76 \times 10^4$) in pigmented samples. Liver cDNA

1 amplifications started at cycle 23, with an average of 3.64×10^5 (SD = 1.22×10^5) and 3.94×10^5 (SD
2 = 2.21×10^5) copies of mRNA/ μ g total RNA in samples from pigmented and non-pigmented carcasses,
3 respectively.

4 These results did not show significant differences in mRNA levels between pigmented and non-
5 pigmented animals; because of the high variability between samples, the P values were 0.1426 for
6 duodenal mRNA and 0.6469 for hepatic mRNA.



7

8 Figure 1. Detection of β CO expression by *in situ* hybridization on duodenum and liver samples from
9 pigmented vs. non-pigmented animals. Arrows in the photographs indicate the expression of mRNA
10 for β CO. A. *In situ* hybridization with antisense probe on duodenum from pigmented animals (cr,
11 crypts; av, apical villi). B. Sense probe, control for hybridization on duodenum from pigmented
12 animals. C. *In situ* hybridization with antisense probe on duodenum from non-pigmented animals. D.
13 Sense probe, control for duodenum of non-pigmented animals. E. *In situ* hybridization with antisense
14 probe on liver from pigmented animals (ps, portal space; cv, central vein). F. Sense probe, control for
15 liver of pigmented animals. G. *In situ* hybridization with antisense probe on liver from non-pigmented
16 animals. H. Sense probe, control for liver of non-pigmented animals. (Bar scale in photograph H apply
17 to all photographs).

18

19 Enzyme assays

20 On average, we observed 19.9 pmol of retinal formed for 1 mg of S9 protein during 1 hour at 37 °C
21 (SD = 9.49) in duodenal mucosa from pigmented animals and 13.21 pmol of retinal (SD = 1.25) for

1 non-pigmented ones. In liver, the average activity was 26.31 pmol of retinal (SD = 10.94) for
2 pigmented cattle and 12.63 pmol (SD = 3.10) for non-pigmented. Finally, assays for β CO activity
3 showed a significant difference between pigmented and non-pigmented animals in liver ($P = 0.0043$;
4 $SE = 2.84$) but not in duodenal mucosa ($P = 0.0648$; $SE = 2.39$)

5

6 **Discussion**

7 The *in situ* hybridizations demonstrated the presence of mRNA for β CO in both tissues. We observed a
8 clear signal in epithelial cells and specifically in the crypts of duodenal mucosa, as has been reported
9 in chick by Wyss et al. (2001). Tajima et al. (1999) studied the epithelium of the duodenal mucosa,
10 where a large fraction of β -carotene is absorbed, cleaved, packaged, and transported to the liver
11 (Laksman and Okoh, 1993), and they reported β -carotene cleavage in the medial and lower site of
12 intestinal *villi* and less activity in the apical site.

13 In liver, the hybridizations showed diffuse signal in both pigmented and non-pigmented animals.
14 Higher messenger expression was observed near the portal space and lower near the central vein in the
15 lobule; this effect was evident especially in samples from pigmented but not from unpigmented
16 animals, where the expression level was either very low or undetected. This finding has not been
17 reported before, and we consider it possible that the high consumption of β -carotene may have
18 stimulated expression of β CO messenger in the liver (Parvin and Sivakumar, 2000).

19 The portal vein and the hepatic artery reach the portal space of the lobule, so the blood goes from there
20 to the central vein; therefore, the peripheral hepatocytes are the first to receive oxygen and nutritive
21 and toxic substances, which explains the higher expression of β CO in hepatocytes near the portal
22 space.

1 There are other studies that have evaluated the expression of β CO in different tissues and species; for
2 example, Kiefer et al. (2001) used RT-PCR to demonstrate β CO expression in mouse, while Wyss et
3 al. (2001) used *in situ* hybridizations in the chicken. Both reported the expression of β CO in liver,
4 kidney, small intestine, and testis, all sites where β -carotene and retinoids play important roles as
5 antioxidant and transcription factors.

6 Our results for quantitative RT-PCR did not show significant differences between pigmented and non-
7 pigmented animals in the number of copies of β CO mRNA per μ g of total RNA in duodenal mucosa or
8 in liver. The liver showed higher expression of the messenger for β CO, we are not aware of any reports
9 on quantitative RT-PCR of β CO; RT-PCR or Northern blot has been performed to determine the
10 messenger expression of β CO in tissues such as small intestine, liver, kidney, and testis (Kiefer et al.,
11 2001; Paik et al., 2001; Wyss et al., 2001). However, the number of copies of this or any other
12 messenger does not always correlate with the rate of synthesis of the corresponding protein or with the
13 level of enzymatic activity in the tissue. The messenger expression can only show that a given kind of
14 cell might synthesize a specific protein.

15 In general, the enzyme activities found in our work were lower than those reported by other authors in
16 different species (Nagao et al., 1996; van Vliet et al., 1996b; Tajima et al. 1999; During et al., 2000).
17 Nevertheless, bovine tissue has shown to have low β CO activity compared to other ruminant species,
18 which explains why they store much more β -carotene in adipose tissue than other species. In this
19 regard, Mora et al. (2000) found higher activity in duodenal mucosa from goats compared to cattle, and
20 Yang et al. (1992) observed that even when cattle, sheep and goats are fed the same forage and show
21 the same content of ruminal β -carotene, cattle have significantly higher levels of β -carotene in liver,
22 plasma and subcutaneous fat than sheep and goats; in these latter two species, the main carotenoid
23 detected in plasma was lutein instead β -carotene.

24 In the intestinal mucosa, the average enzyme activity was 16.6 pmol retinal per mg of S9 protein per hr
25 at 37 °C, and it was not significantly different ($P = 0.0648$) between pigmented and non-pigmented

1 animals. This suggests that the activity of β CO for cleaving β -carotene has a maximum level in the
2 bovine duodenum that is affected neither by the level of dietary β -carotene nor by its absorption.
3 Results for enzyme assays in liver were statistically different between pigmented and non-pigmented
4 animals ($P = 0.0043$) (26.31 vs. 12.63 pmol retinal/mg S9 protein/hr at 37 °C). It might be expected
5 that the β -carotene taken up by the liver would stimulate the enzymatic activity of β CO, as has been
6 previously reported (van Vliet et al., 1996b; Parvin y Sivakumar, 2000); nevertheless, the capacity of
7 this organ was not enough to cleave all the β -carotene and the excess was distributed to and stored in
8 different tissues of the body. Other factors that we did not measure and that might affect the β CO
9 activity are the fatty acid composition (During et al., 1998) and the level of iron in the diet (During et
10 al., 2000).

11 From *in situ* hybridizations we observed high signal for β CO mRNA, but they did not correlate with
12 the levels of β CO mRNA expression determined by real time PCR, maybe due to the variability
13 between animals.

14 Expression of β CO has been related to the amount of vitamin A consumed by the animal (Lakshman y
15 Okoh, 1993; van Vliet et al., 1996b; Barua and Olson, 2000); in this way Prache et al. (2003) found
16 that the β -carotene concentration in fresh forage is approximately 160 μ g/g DM, while in concentrates
17 it is about 0.3, and in hay 9.8 μ g/g DM. If we assume that the cattle that pigmented their fat consumed
18 mainly pasture forage and that the non-pigmented animals were fed on concentrate, we could conclude
19 that animals consumed different levels of β -carotene. But the differences observed in the expression
20 and activity of β CO were not so clear, which suggests that the regulation of the expression and enzyme
21 activity depends on other factors, different from the β -carotene content of the diet. Recently, Boulanger
22 et al. (2003) indicated that β CO transcription could be auto-regulated by retinoids, which are β -
23 carotene cleavage products that act as transcription factors for this protein, but we do not know if in
24 cattle the regulation of transcription of this protein responds to the amount of retinal and retinoic acid
25 present in plasma. We have demonstrated that in the intestines and livers from cattle that did not
26 pigment their tissues, the enzyme activity does not vary with β -carotene in the diet, and that these

1 animals may produce just the retinal required to maintain normal metabolic functions. In the liver from
2 pigmented animals, the higher expression and activity of β CO might be due to the excessive substrate
3 that reaches this organ through the lymph, stimulating indirectly the activity of β CO, but not
4 sufficiently to cleave all the arriving β -carotene, so the organ packaged the excess to be metabolized
5 and stored at other sites.

6 The results of this study show that in pigmented bovine carcasses the β -carotene stores in their adipose
7 tissue increased expression and activity of liver β CO, but only at a metabolically acceptable level to
8 the animal, which is not enough to avoid the yellow fat pigmentation. Future studies are required to
9 determine the maximum level of β -carotene in the diet compatible with an adequate color of fat in the
10 carcasses, while we seek to understand and manipulate the activity of β CO in forage-fed beef cattle.

11

12 **Acknowledgments**

13 This work was part of the Doctorate thesis that the senior author submitted to the Universidad
14 Nacional Autónoma de México (UNAM). It was supported by a grant (J31295B) from the Consejo
15 Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)-México. A. Morales also thanks CONACYT for a
16 scholarship at Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, UNAM. We thank Dorothy Pless for
17 revising the English of the manuscript.

18

19 **References**

- 20 Barua A.B., Olson J.A., 2000. β -Carotene is converted primarily to retinoids in rats in vivo. *J. Nutr.*
21 130, 1996-2001.
- 22 Boulanger A., McLemore P., Copeland N.G., Gilbert D.J., Jenkins N.A., Yu S.S., Gentleman S.,
23 Redmond T.M., 2003. Identification of beta-carotene 15,15'-monooxygenase as a peroxisome
24 proliferators-activated receptor target gene. *FASEB J.* 17, 1304-1306.
- 25 Bradford M.M., 1976. A refined and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of
26 protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

- 1 During A., Nagao A., Hoshino C., Terao J., 1996. Assay of β -carotene 15,15'-dioxygenase activity by
2 reverse-phase high-pressure-liquid-chromatography. *Anal. Biochem.* 241, 199-205.
- 3 During A., Nagao A., Terao J., 1998. Beta-carotene 15,15'-dioxygenase activity and cellular retinol-
4 binding protein type II level are enhanced by dietary unsaturated triacylglycerols in rat intestines. *J.*
5 *Nutr.* 128, 1614-1619.
- 6 During A., Fields M., Lewis C.G., Smith J.C., 2000. Intestinal beta-carotene 15,15'-dioxygenase
7 activity is markedly enhanced in copper-deficient rats fed on high iron diets and fructose. *Br. J. Nutr.*
8 84, 117-124.
- 9 Forrest J.R., 1981. Effect of high concentrate feeding on carcass quality and fat coloration of grass
10 reared steers. *Can. J. Anim. Sci.* 61, 575-580.
- 11 Glover J., 1960. The conversion of β -carotene into vitamin A. *Vit. Horm.* 18, 371-386.
- 12 Gottesman M.E., Quadro L., Blaner W.S., 2001. Studies of vitamin A metabolism in mouse model
13 systems. *Bioessays.* 23, 409-419.
- 14 Kiefer C., Hessel S., Lampert J.M., Vogt K., Lederer M.O., Breithaupt D.E., von Liting J., 2001.
15 Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative
16 cleavage of provitamin A. *J Biol Chem.* 276, 14110-6.
- 17 Lakshman M.R., Okoh C., 1993. Enzymatic conversion of all-*trans*- β -carotene to retinal. *Methods in*
18 *Enzymology.* 214, 256-269.
- 19 Mora O., Romano J.L., González E., Ruiz F.J., Shimada A., 2000. Low cleavage activity of
20 15,15'-dioxygenase to convert β -carotene to retinal in cattle compared with goats, is associated with the
21 yellow pigmentation of adipose tissue. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* 70, 199-205.
- 22 Mora O., Shimada A., 2001. Causas del color amarillo de la grasa de canales de bovinos finalizados en
23 pastoreo. *Vet. Méx.* 32, 63-71.
- 24 Morales A., Rosas A., González A., Antaramian A., Varela-Echavarría A., Shimada A., Mora O.,
25 2006. Cloning of the bovine β -carotene-15,15'-oxygenase and expression in gonadal tissues. *Int. J. Vit.*
26 *Nut. Res.* In press.
- 27 Morgan J.H.L., Pickering F.S., Everitt G.C., 1969. Some factors affecting yellow fat colour in cattle.
28 *Proc.N. Z. Soc. Anim. Prod.* 29, 164-175.
- 29 Nagao A., During A., Hoshino C., Terao J., Olson J.A., 1996. Stoichiometric conversion of all *trans*-
30 β -carotene to retinal by pig intestinal extract. *Arch. Biochem. Biophys.* 328, 57-63.
- 31 Paik J., During A., Harrison E.H., Mendelson C.L., Lai K., Blaner W.S., 2001. Expression and
32 characterization of a murine enzyme able to cleave β -carotene. *J. Biol. Chem.* 276, 32160-32168.
- 33 Parvin S., Sivakumar B., 2000. Nutritional status affects intestinal carotene cleavage activity and
34 carotene conversion to vitamin A in rats. *J. Nutr.* 130, 573-577.

- 1 Tajima S., Goda T., Takase S., 1999. Coordinated distribution patterns of three enzyme activities
2 involved in the absorption and metabolism of β -carotene and vitamin A along the villus-crypt axis of
3 duodenum. *Live Sci.* 65, 841-848.
- 4 Tee E.S., 1992. Carotenoids and retinoids in human nutrition. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 31, 103-163.
- 5 Van Soest P.J., 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. 2nd edition. Cornell University Press. New
6 York.
- 7 Van Vliet T., van Schaik F., Schreurs W.H.P., van den Berg H., 1996a. In vitro measurement of β -
8 carotene cleavage activity: methodological considerations and the effect of other carotenoids on β -
9 carotene cleavage. *Int. J. Vit. Nut. Res.* 66, 77-85.
- 10 Van Vliet T., van Vlissingen M.F., van Schaik F., van den Berg H., 1996b. Beta-carotene absorption
11 and cleavage in rats is affected by the vitamin A concentration of the diet. *J Nutr.* 126, 499-508.
- 12 Varela-Echavarria A., Pfaff S. L., Guthrie S., 1996. Differential expression of LIM homeobox genes
13 among motor neuron subpopulations in the developing chick brain stem. *Molecular Cell Neurosci.* 8,
14 242-257.
- 15 Von Lintig J., Vogt K., 2000. Filling the gap in vitamin A research. Molecular identification of an
16 enzyme cleaving β -carotene to retinal. *J. Biol. Chem.* 275, 11915-11920.
- 17 Wyss A., Wirtz G.M., Woggon W.D., Brugger R., Wyss M., Friedlein A., Riss G., Bachmann H.,
18 Hunziker W., 2001. Expression pattern and localization of β , β -carotene 15,15'-dioxigenase in different
19 tissues. *Biochem. J.* 354, 521-529.
- 20 Yan W., Jang G.F., Haeseleer F., Esumi N., Chang J., Kerrigan M., Campochiaro M., Campochiaro P.,
21 Palczewski K., Zack D.J., 2001. Cloning and characterization of a human beta, beta-carotene-15,15'-
22 dioxigenase that is highly expressed in the retinal pigment epithelium. *Genomics.* 72, 193-202.
- 23 Yang A., Larsen T.W., Tume R.K., 1992. Carotenoid and retinol concentrations in serum, adipose
24 tissue and liver and carotenoid transport in sheep, goats and cattle. *Austr. J. Agric. Res.* 43, 1809-1817.
- 25

Discusión

Secuencia de cDNA para β CO de bovino

La parte medular de este trabajo consistió en determinar la secuencia completa del cDNA de bovino que codifica para la proteína β CO; ésta es la primera enzima responsable de la ruptura del β -caroteno para formar retinal o vitamina A en el organismo animal. El retinal recién formado ya no posee la capacidad de pigmentar los tejidos hacia los cuales se distribuye y almacena posteriormente. Se decidió clonar el cDNA para β CO a partir de RNA total de mucosa duodenal de bovino, ya que anteriormente se había señalado su expresión en intestino delgado e hígado de otras especies (van Vliet *et al.*, 1996; Wyss *et al.*, 2001; Lindqvist y Anderson, 2002).

Para obtener el cDNA completo de β CO se inició comparando las secuencias de esta misma proteína en pollo y humano, en las que se hallaron varios sitios en donde la secuencia de nucleótidos estaba conservada, y a partir de allí se decidió diseñar oligonucleótidos degenerados que servirían para realizar los primeros ensayos de RT-PCR. Así, a partir de RNA purificado de mucosa intestinal de bovino tomada al momento del sacrificio, se realizaron los ensayos de RT-PCR que arrojaron un primer cDNA parcial de 251 pb. El primer cDNA fue clonado en un vector y secuenciado, a partir de él se rediseñaron nuevos oligonucleótidos específicos que permitieron amplificar y extender la secuencia de cDNA. Esta metodología fue repetida hasta obtener el cDNA completo, mismo que resultó estar constituido por 2130 pb. Como resultado, la secuencia completa de cDNA para β CO de bovino puede consultarse en el Gene-Bank con el número de acceso DQ008469.

El análisis del cDNA para β CO de bovino indicó que al compararlo con sus homólogos, muestra un 75 % de identidad con humano, rata y ratón (Yan *et*

al., 2001; Paik *et al.*, 2001), y una menor identidad con las secuencias de cDNA de pollo y *Drosophila*, 41 y 52% respectivamente (von Lintig y Vogt, 2000; Wyss *et al.*, 2001). También se observa un codón de iniciación en la posición 135 y un marco de lectura abierto de 1788 pb, mismo que en promedio es 135 pb mayor que el reportado para las otras especies de mamíferos.

La traducción del cDNA se realizó empleando el paquete Vector NTI suite 7 para análisis de secuencias de DNA y resultó en una proteína de 596 aminoácidos con un peso molecular de 66.6 kDa; 74% idéntica a la misma proteína en otras especies de mamíferos. Entre las proteínas β CO de mamíferos que fueron comparadas con la de bovino se observaron varias regiones conservadas, localizadas entre los aminoácidos 47 al 60, 83 al 129, 162 al 184 y 229 al 245. Anteriormente Redmond *et al.* (2001) reportaron una región conservada del aminoácido 469 al 480, también presente en la proteína de bovino, aunque en esta especie se encontró una isoleucina en lugar de valina en posición 473. Adicionalmente se ha mencionado que esta familia de proteínas conserva varios residuos de histidina asociados con el sitio de ligación para el hierro, el cual es un cofactor importante para su actividad (During *et al.*, 2001). Así mismo, todas las β CO de vertebrados conservan 41 residuos acídicos, 27 de ácido glutámico y 19 de aspártico relacionadas con la transferencia de electrones durante la catálisis (Redmond *et al.*, 2001).

Recientemente, Kloer *et al.* (2005) reportaron el cristal de la apocarotenoide-15,15'-oxigenasa de *Synechocystis sp.* como un modelo de la estructura para esta familia de enzimas formadoras de retinal. El modelo de Kloer muestra un arreglo de 32 cadenas beta y 4 alfa hélices con cuatro histidinas unidas a Fe^{2+} en las posiciones 172, 237, 308 y 513 de la secuencia de aminoácidos. La comparación de las secuencias de aminoácidos de bovino, *Synechocystis* y otras especies mostró que las cadenas β 20, β 24 y β 28 son

las más conservadas en todas las especies. Finalmente se ha comprobado que efectivamente los cuatro residuos de histidina antes mencionados, así como una glutamina conservada en la posición 405 de la cadena de aminoácidos participan directamente en las uniones con hierro, y que la pérdida de estos aminoácidos produce la pérdida de actividad de la enzima (Poliakov *et al.*, 2005).

Expresión de β CO de bovino en duodeno e hígado de animales que pigmentaron o no el tejido adiposo de su canal

Para determinar la expresión del mensajero de β CO de bovino en duodeno e hígado de bovinos con o sin pigmentación del tejido adiposo de la canal se realizaron ensayos de hibridación *in situ* y de RT-PCR cuantitativas. De esta manera se deberá tomar en cuenta que los ensayos de hibridación *in situ* son únicamente cualitativos y permiten visualizar el tipo celular o la porción de un órgano en el cual se sintetiza el RNA mensajero que posteriormente podría ser traducido en su proteína correspondiente. Mientras que las RT-PCR de tiempo real o también denominados cuantitativos permiten determinar el número de copias de un mensajero en cuestión por unidad de RNA.

Las hibridaciones *in situ* realizadas en el duodeno de los bovinos estudiados demostraron que aparentemente no existe una diferencia en la señal de expresión de la enzima β CO en los animales que presentaron pigmentación de la canal a diferencia de aquellos que no la presentaron. Aparentemente este resultado indica que el tipo de dieta de los bovinos no afecta la expresión de la enzima en duodeno. Sin embargo, en las hibridaciones de hígado se presentó una diferencia bastante clara, pues las muestras de canales pigmentadas presentaron una fuerte señal de expresión a diferencia de aquellas provenientes de canales no pigmentadas.

Las hibridaciones *in situ* también permiten observar la localización del mensajero en cada tejido, y en este caso se observó una señal clara en las células epiteliales y criptas de mucosa duodenal, resultado que ya había sido reportado en pollos por Wyss *et al.* (2001). En este sentido, Tajima *et al.* (1999) reportaron ruptura del β -caroteno en la parte media y baja de las vellosidades intestinales, a diferencia de la zona apical del mismo epitelio ya que es en esta zona donde la mayor proporción del β -caroteno es absorbido, cortado por la β CO y/o empacado hacia el hígado (Laksman y Okoh, 1993).

En los lobulillos hepáticos, las hibridaciones *in situ* mostraron una señal difusa para la expresión de β CO en ambos tipos de canales. Se observó mayor expresión del mensajero cerca del espacio porta y menor alrededor de la vena central del lobulillo. Este efecto fue evidente especialmente en muestras de animales que pigmentaron su canal comparado con las canales que no presentaron pigmentación cuya señal de expresión fue muy baja o casi indetectable. Este hecho no ha sido reportado anteriormente, pero se sugiere que pudiera estar influenciado por la elevada afluencia de β -caroteno al hígado a partir del alimento durante la vida de los animales que pigmentaron su canal (Parvin y Sivakumar, 2000).

En lo que respecta a la observación de que el hígado de los animales que pigmentaron sus canales tuvieron una mayor señal de expresión principalmente en el espacio porta, cabe recordar que tanto la vena porta como la arteria hepática llegan al espacio porta del lobulillo, de donde la sangre es conducida hacia la vena central, de manera que los hepatocitos periféricos al lobulillo son los primeros en recibir el oxígeno, nutrientes y sustancias tóxicas de la sangre. Lo anterior explica el hecho de encontrar una mayor expresión de β CO en los hepatocitos cercanos al espacio porta de los animales que pigmentaron sus canales en comparación con los que no pigmentaron, ya que la afluencia de β -caroteno en este último caso fue

menor, y de acuerdo con Laksman y Okoh (1993) estaría respondiendo a la cantidad de β -caroteno que llega a este órgano.

La expresión de β CO ha sido evaluada anteriormente en diferentes tejidos de animales. Por ejemplo, Kiefer *et al.* (2001) evaluaron su expresión en diferentes tejidos de ratón por RT-PCR, mientras que Wyss *et al.* (2001) también lo hicieron en muestras de pollo por medio de hibridaciones *in situ*. Estos autores demostraron la expresión de β CO en hígado, riñón, intestino delgado y testículo, donde el β -caroteno y sus productos pudieran tener alguna función importante, sobre todo como antioxidantes y factores de transcripción.

Debido a la gran variación de los resultados para cada muestra, los resultados de las RT-PCR cuantitativas en este trabajo no mostraron diferencia estadística significativa en el número de copias para el mensajero de β CO por μ g de RNA total en mucosa duodenal e hígado entre animales que presentaron o no pigmentación del tejido adiposo de la canal, aun cuando los individuos estuvieran dentro de la misma clasificación. En general, el mensajero de β CO en hígado mostró una mayor expresión, probablemente debido a que es aquí donde se llevan a cabo un gran número de reacciones relacionadas con el metabolismo, almacenamiento y distribución de nutrientes, además de la cantidad de β -caroteno que llega a este sitio para ser procesado.

Hasta ahora no existen reportes de trabajos que hayan realizado RT-PCR's cuantitativas para β CO, únicamente se han realizado ensayos de RT-PCR y Northern blots para determinar la expresión de este mensajero en diferentes tejidos como intestino delgado, hígado, riñón y testículo (Kiefer *et al.*, 2001; Paik *et al.*, 2001; Wyss *et al.*, 2001). Sin embargo, también es importante tomar en cuenta que el número de copias de este u otros mensajeros no necesariamente indica que la proteína vaya a ser traducida y sintetizada al mismo nivel, ni que estará relacionada con el nivel de actividad en ese tejido.

La expresión del mensajero sólo explica la probabilidad de síntesis de una proteína específica en un tejido o tipo celular dado.

Actividad de β CO de bovino en duodeno e hígado de animales que pigmentaron o no el tejido adiposo de su canal.

Para determinar si la actividad de la enzima β CO de bovino es diferente entre animales que pigmentan o no el tejido adiposo de su canal se realizaron una serie de ensayos de actividad enzimática a partir de un extracto proteico de mucosa duodenal e hígado de bovinos con estas características de pigmentación de la canal.

Los resultados de actividad enzimática en este trabajo fueron menores a los reportados por otros autores en diferentes especies (Nagao *et al.*, 1996; van Vliet *et al.*, 1996; Tajima *et al.*, 1999; During *et al.*, 2000). Sin embargo, ya se ha reportado que los bovinos presentan menor actividad de β CO, aún cuando se les compara con otras especies de rumiantes. Este hecho explica por qué esta especie es capaz de almacenar más β -caroteno que otras especies en el tejido adiposo. A este respecto, Mora *et al.* (2000) encontraron una mayor actividad de la enzima en la mucosa duodenal de cabras en comparación con bovinos. Yang *et al.* (1992) observaron que aun cuando bovinos, ovinos y caprinos son alimentados con el mismo forraje y teniendo los mismos niveles de β -caroteno en rumen, los bovinos muestran niveles significativamente altos de β -caroteno en hígado, plasma y grasa subcutánea en comparación con las ovejas y cabras, especies en las que el principal carotenoide detectado en plasma es la luteína en lugar del β -caroteno.

En la mucosa intestinal, la actividad enzimática fue en promedio 16.6 pmol de retinal formado por mg de proteína S9 durante una hora a 37 °C, aunque no mostró diferencia estadística significativa ($P = 0.0648$) entre animales que

pigmentaron o no la grasa de su canal. Esto sugiere que la actividad de β CO para romper el β -caroteno en los bovinos tiene un nivel máximo en el duodeno, y que no es afectado por el contenido de este compuesto en la dieta, ni por su absorción.

Los ensayos enzimáticos de proteína de hígado mostraron diferencia estadística entre animales que pigmentaron su canal y los que no lo hicieron ($P = 0.0043$), siendo mayor su actividad en animales que sí pigmentaron su canal (26.31 *versus* 12.63 pmol retinal/mg proteína S9/hr at 37 °C). En este caso, el β -caroteno del alimento que llega al hígado estimuló e incrementó la actividad enzimática de β CO. Este hecho ha sido reportado anteriormente (van Vliet *et al.*, 1996; Parvin y Sivakumar, 2000), aun cuando la capacidad de este órgano no fue suficiente para romper todo el β -caroteno ingerido y el exceso fue distribuido y almacenado en otros tejidos del organismo, incluyendo el tejido adiposo. Otros factores que afectan la actividad de la β CO pero que no fueron medidos son el contenido y composición de ácidos grasos en la dieta (During *et al.*, 1998), así como su contenido de hierro (During *et al.*, 2000).

Al analizar los resultados de expresión y actividad enzimática se observa que hay una relación entre los resultados de los ensayos enzimáticos y las hibridaciones *in situ* de ambos tejidos, aunque no están claramente asociados con los resultados de RT-PCR cuantitativas debido a que la variabilidad entre animales no permitió observar diferencia.

En lo referente al consumo de β -caroteno y vitamina A por parte del animal, varios autores han demostrado que éstos tienen una clara influencia sobre la expresión de β CO (Lakshman y Okoh, 1993; van Vliet *et al.*, 1996; Barua and Olson, 2000). En este sentido Prache *et al.* (2003) encontraron que la concentración de β -caroteno en el forraje es de aproximadamente 169 μ g/g MS, mientras que en los concentrados es de cerca del 0.3 y en el heno de 9.8 μ g/g MS. Si asumimos que los bovinos que pigmentaron sus canales

consumieron principalmente forraje, y que los bovinos que no pigmentaron su canal fueron alimentados principalmente con concentrados, entonces podemos ver que ambos grupos de animales consumieron diferentes niveles de β -caroteno, pero la diferencia en la expresión y actividad de la β CO solamente fue observada en hígado. Este hecho explica que la regulación de expresión y actividad de la enzima depende también de otros factores diferentes del contenido de β -caroteno en la dieta.

Finalmente, con respecto a la expresión de β CO, Boulanger *et al.* (2003) indicaron recientemente que la transcripción de su mensajero podría estar autorregulada por los retinoides resultantes de la ruptura de β -caroteno que actúan como factores de transcripción para esta proteína. Sin embargo, no existe la certeza de que en los bovinos la transcripción de esta proteína responda a la cantidad de retinal y ácido retinoico presente en plasma.

Se demostró que en intestino de bovinos independientemente de que pigmenten o no su canal, la actividad enzimática de β CO se mantiene y que quizás responde produciendo únicamente el retinal que el bovino requiere para mantener sus funciones metabólicas normales en los sitios donde este producto desempeña un papel importante. Sin embargo, los animales que pigmentan su canal presentan mayor expresión y actividad enzimática de β CO en el hígado, debido al arribo de una elevada cantidad de β -caroteno por vía linfática, mismo que estimula la actividad de la proteína. No obstante, el incremento en la actividad enzimática en el hígado de estos animales no es suficiente para metabolizar todo el β -caroteno recién llegado, hecho que probablemente provocaría al bovino algún tipo de problema por hipervitaminosis A.

Los resultados de este estudio muestran que en bovinos finalizados en pastoreo que pigmentan la grasa de sus canales por acumulación de β -caroteno, se favorece un incremento en la expresión y actividad de la enzima β CO en hígado, pero sólo a un nivel metabólicamente aceptable para el

animal, lo cual no es suficiente para eliminar la pigmentación amarilla de la canal. Se recomiendan estudios futuros que determinen el nivel máximo de β -caroteno en la dieta para obtener un color adecuado de la grasa para la comercialización de las canales mientras alcanzamos a entender y manipular la actividad de β CO en bovinos finalizados en pastoreo.

Expresión de β CO de bovino en tejidos gonadales

Paralelo a la determinación de la expresión de la enzima β CO en duodeno e hígado se determinó también su expresión en gónadas de la misma especie. En este caso se realizaron ensayos de RT-PCR para un fragmento de cDNA de 892 pb específicos de β CO que permitieron comprobar la expresión de este mensajero en testículo, ovario y en un cultivo de células de la granulosa. Anteriormente, ensayos similares sólo habían reportado la expresión de este mensajero en testículo de humano (Yan *et al.*, 2001) y ratón (Palk *et al.*, 2001).

Posteriormente siguiendo la misma metodología empleada para duodeno e hígado, se realizaron hibridaciones *in situ* de ovario, cuerpo lúteo y testículo. La expresión de β CO en ovario fue detectada en células de la granulosa y cuerpo lúteo, mientras que en testículo se observó señal de expresión en células de Leydig y Sertoli.

En lo que se refiere a la expresión del mensajero de β CO en ovario, anteriormente se habían reportado resultados similares en humana, específicamente en células de la granulosa y de la teca interna (Lindqvist y Anderson, 2004). Aunque hasta la fecha no existen reportes de acumulación de β -caroteno en células de la granulosa, se conoce que este compuesto se encuentra presente en el líquido folicular (Chew *et al.*, 1984; Haliloglu *et al.*, 2002), por lo que nuestros resultados sugieren que las células de la granulosa pueden emplear el β -caroteno del medio como fuente de

retinoides, los cuales son importantes para la proliferación y diferenciación en células lúteas. Además, también se ha demostrado que la actividad de β CO durante la ovulación es casi el doble que en el intestino (Sklan, 1983).

La expresión de β CO en cuerpo lúteo sugiere también que el β -caroteno puede emplearse como fuente local de retinoides, hecho que ha sido considerado por varios autores desde hace casi 30 años (Gawienowski *et al.*, 1974; Sklan, 1983; Rapoport *et al.*, 1998). En este sentido, se ha demostrado la presencia de β -caroteno, retinal y de la proteína ligadora de ácido retinoico en el cuerpo lúteo y células de la granulosa (Brown *et al.*, 2003; Mohan *et al.*, 2003).

En los bovinos, el β -caroteno llega al ovario y cuerpo lúteo por vía sanguínea acoplado a HDL (Arikan y Roadway, 2000) y se almacena en las células lúteas unido a proteínas citosólicas y de membrana (O'Fallon y Chew, 1984). Se sabe que los niveles lúteos de β -caroteno cambian durante el ciclo estral, ya que están correlacionados con el tamaño del cuerpo lúteo e implicados en la producción de progesterona, proceso en el que juega un papel importante como antioxidante (Rodgers, *et al.*, 1995; Young *et al.*, 1995; Rapoport, *et al.*, 1998).

En el testículo, los resultados de las hibridaciones *in situ* demostraron la expresión de β CO en células de Leydig y Sertoli, tal como se había reportado anteriormente en testículo de ratón y humano (Paik *et al.*, 2001; Lindqvist y Andersson, 2004). En testículo de ratón, Paik *et al.* (2001) sugirieron que el β -caroteno actúa como fuente importante de retinoides para mantener la función testicular, actuando tanto en la espermatogénesis, como en la esteroidogénesis. Se ha visto que los retinoides promueven la síntesis de proteínas específicas que regulan la proliferación y diferenciación de células de Sertoli en células espermáticas (Cavazzini *et al.*, 2003). Aunque se sabe que la deficiencia de vitamina A induce el cese de la espermatogénesis y la degeneración de células germinales (Livera *et al.*,

2002), este efecto puede ser reversible ya que su administración en ratas con deficiencia de vitamina A causó la regeneración del epitelio seminífero y la proliferación y diferenciación de espermatogonias a espermátides (van Pelt y de Rooij, 1991). En células de Leydig los retinoides participan en el mantenimiento y estimulación de la secreción basal de testosterona, pueden reducir la expresión de los receptores de LH e incrementar la expresión de ciertas enzimas que participan en la esteroidogénesis (López-Fernández y del Mazo, 1997; Livera *et al.*, 2002).

La presencia de β -caroteno y β CO en tejidos gonadales sugieren que éstos juegan un papel importante en las funciones reproductivas, ya sea como antioxidantes o como fuente de retinal y por tanto de otros retinoides involucrados en la proliferación celular y diferenciación durante la gametogénesis y esteroidogénesis.

Conclusiones

Se determinó la secuencia y análisis del cDNA para la proteína β,β' -caroteno-15,15'-oxigenasa de bovino, la cual fue y podrá seguir siendo empleada en estudios referentes al metabolismo del β -caroteno y los retinoides en el ganado bovino.

La enzima β,β' -caroteno-15,15'-oxigenasa se encuentra expresada en duodeno, hígado y tejidos gonadales de bovinos.

La expresión y actividad enzimática de β,β' -caroteno-15,15'-oxigenasa se encuentran incrementadas en el hígado de los animales que pigmentan la grasa de sus canales, lo cual indica que su actividad en estos organismos puede responder al consumo elevado de β -caroteno en la dieta. Sin embargo, al parecer, la síntesis y actividad de la enzima en el bovino están reguladas metabólicamente para evitar que una producción excesiva de retinal le acarree problemas por hipervitaminosis A; de este hecho resulta entonces el almacenamiento del β -caroteno excedente en el tejido adiposo de la canal.

La presencia β CO en los tejidos gonadales sugiere la participación del β -caroteno y sus productos durante los procesos de gametogénesis y esteroidogénesis en el bovino.

Literatura citada

- Arikan, S., Rodway, R.G. 2000. Effects of high density lipoprotein containing high or low β -carotene concentrations on progesterone production and β -carotene uptake and depletion by bovine luteal cells. *Anim. Reprod. Sci.* 62:253–263.
- Ashes J.R., Burley R.W., Sidhu G.S., Sleight R.W. 1984. Effect of particle size and lipid composition of bovine blood high density lipoprotein in its function as a carrier of β -carotene. *Biochim. Biophys. Acta.* 79:171-177.
- Bachmann H., Desbarats A., Pattison P., Sedgewick M., Riss G., Wyss A., Cardinault N., Duszka C., Goralczyk R., Grolier P. 2002. Feedback Regulation of beta,beta-carotene 15,15'-monooxygenase by retinoic acid in rats and chickens. *J. Nutr.* 132:3616–3622.
- Barak Y., Nelson M.C., Ong E.S., Jones Y.Z., Ruiz-Lozano P., Chien K.R., Koder A., Evans R.M. 1999. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol. Cell* 4:585–595.
- Barrón G.S. 2001. Variación estacional en la coloración del tejido adiposo bovino y su impacto en la ganadería tropical. Tesis de Maestría FESC-UNAM. 79p.
- Barua A.B., Olson J.A. 2000. β -Carotene is converted primarily to retinoids in rats in vivo. *J. Nut.* 130:1996-2001.
- Begemann G., Schilling T.F., Rauch G.J., Geisler R., Ingham P.W. 2001. The zebrafish neckless mutation reveals a requirement for raldh2 in mesodermal signals that pattern the hindbrain. *Development* 128:3081–3094.
- Bhatti R.A., Yu S., Boulanger A., Fariss R.N., Guo Y., Bernstein S.L., Gentleman S., Redmond T.M. 2003. Expression of beta-carotene 15,15' monooxygenase in retina and RPE-choroid. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44:44–49.
- Boulanger A., McLemore P., Copeland N.G., Gilbert D.J., Jenkins N.A., Yu S.S., Gentleman S., Redmond T.M. 2003. Identification of beta-carotene 15,15'-monooxygenase as a peroxisome proliferator-activated receptor target gene. *FASEB J.* 17:1304–1306.
- Bradford M.M. 1976. A refined and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brown, J.A., Eberhardt, D.M., Schrick, F.N., Roberts M.P., Godkin, J.D. 2003. Expression of retinol-binding protein and cellular retinol-binding protein in the bovine ovary. *Mol. Reprod. Dev.* 64:261–269.
- Bullerjahn G.S., Sherman L.A. 1986. Identification of a carotenoid-binding protein in the cytoplasmic membrane from the heterotrophic cyanobacterium *Synechocystis sp.* strain PCC6714. *J. Bacteriol.* 167:396–399.
- Cadwell R.C., Joyce G.F. 1992. Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods App.* 2:28-33.
- Carey M.C., Hernell O. 1992. Digestion and absorption of fat. *Semin. Gastrointest. Dis.* 3:189-208.
- Cavazzini, D., Catizone, A., Galdleri, M., Ottonello, S. 2003. Vitamin A metabolism in cultured somatic cells from rat testis. *Mol. Cell. Biochem.* 252:165–171.
-

-
- Charleux J.L. 1996. Beta-carotene, vitamin C, and vitamin E: the protective micronutrients. *Nutr. Rev.* 54:S109-S114.
- Chew, B.P., Holpuch, D.M., O'Fallon, J.V. 1984. Vitamin A and β -carotene in bovine and porcine plasma, liver, corpora lutea, and follicular fluid. *J. Dairy Sci.* 67:1316-1322.
- Clairmont A., Tessmann D., Sies H. 1996. Analysis for connexin 43 gene expression induced by retinoic acid in F9 teratocarcinoma cells. *FEBS Lett.* 397:22-24.
- Delgado V.F., Jiménez A.R., Paredes L.O. 2000. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains. Characteristics, biosynthesis, Processing, and stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* 40:173-289.
- Devery J., Milborrow B.V. 1994. β -Carotene-15,15'-dioxygenase (EC 1.13.11.21) isolation reaction mechanism and improved assay procedure. *Br. J. Nutr.* 72:397-414.
- During A., Albaugh G., Smith J.C. 1998. Characterization of beta-carotene 15,15'-dioxygenase activity in TC7 clone of human intestinal cell line Caco-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249:467-474.
- During A., Fields M., Lewis C.G., Smith J.C. 2000. Intestinal beta-carotene 15,15'-dioxygenase activity is markedly enhanced in copper-deficient rats fed on high iron diets and fructose. *Br. J. Nutr.* 84:117-124.
- During A., Hussain M.M., Morel D.W., Harrison E.H. 2002. Carotenoid uptake and secretion by Caco-2 cells: beta-carotene isomer selectivity and carotenoid interactions. *J. Lipid Res.* 43:1086-1095.
- During A., Nagao A., Hoshino C., Terao J. 1996. Assay of β -carotene 15,15'-dioxygenase activity by reverse-phase high-pressure-liquid-chromatography. *Anal. Biochem.* 241:199-205.
- During A., Smith M.K., Piper J.B., Smith J.C. 2001. beta-Carotene 15,15'-dioxygenase activity in human tissues and cells: evidence of an iron dependency. *J. Nutr. Biochem.* 12:640-647.
- During A., Harrison E.H. 2004. Intestinal absorption and metabolism of carotenoids: insights from cell culture. *Arch. Biochem. Biophys.* 430:77-88.
- FAO. 2003. Información estadística. <http://apps.fao.org>.
- Fidge N.H., Smith F.R., Goodman D.S. 1969. Vitamin A and carotenoids. The enzymic conversion of β -carotene into retinal in hog intestinal mucosa. *Biochem. J.* 114:689-694.
- Forrest J.R. 1981. Effect of high concentrate feeding on carcass quality and fat coloration of grass reared steers. *Can. J. Anim. Sci.* 61:575-580.
- Furr H.C., Clark R.M. 1997. Intestinal absorption and tissue distribution of carotenoids. *J. Nutr. Biochem.* 8:364-377.
- Gawlenowski, A.M., Stacewicz-Sapuncakis, M., Longley, R. 1974. Biosynthesis of retinal in bovine corpus luteum. *J. Lipid Res.* 15:375-379.
- Gaziano J.M., Johnson E.J., Russell R.M., Manson J.E., Stampfer M.J., Ridker P.M., Frei B., Hennekens C.H., Krinsky N.I. 1995. Discrimination in absorption or transport of beta-carotene isomers after oral supplementation with either *all-trans*- or *9-cis*-beta-carotene. *Am. J. Clin. Nutr.* 61:1248-1252.
- Glover J. 1960. The conversion of β -carotene into vitamin A. *Vitamin Horm.* 18:371-386.
-

-
- Goodman D.S., Huang H.S. 1965. Biosynthesis of vitamin A with rat intestinal enzymes. *Science*. 149:879-880.
- Goodman D.S., Huang H.S., Shiratori T. 1965. Tissue distribution and metabolism of newly absorbed vitamin A in the rat. *J. Lipid Res.* 6:390-396.
- Goodwin T.W. 1992. *Biochemistry of carotenoids*. Vol. 1. Plants. 2nd edition. Chapman and Hall, New York. 1-95.
- Gottesman M.E., Quadro L., Blaner W.S. 2001. Studies of vitamin A metabolism in mouse model systems. *Bioessays*. 23:409-419.
- Grandel H., Lun K., Rauch G.J., Rhinn M., Plotrowski T., Houart C., Sordino P., Kuchler A.M., Schulte-Merker S., Geisler R., Holder N., Wilson S.W., Brand M. 2002. Retinoic acid signalling in the zebrafish embryo is necessary during pre-segmentation stages to pattern the anterior-posterior axis of the CNS and to induce a pectoral fin bud. *Development* 129:2851-2865.
- Gugger E.T., Erdman J.W. 1996. Intracellular beta-carotene transport in bovine liver and intestine is not mediated by cytosolic proteins. *J. Nutr.* 126:1470-1474.
- Haliloglu, S., Baspinar, N., Serpek, B., Erdem, H., Bulut, Z. 2002. Vitamin A and β -carotene levels in plasma, corpus luteum and follicular fluid of cyclic and pregnant cattle. *Reprod. Dom. Anim.* 37:96-99.
- Hamel C.P., Tsilou E., Pfeffer B.A., Hooks J.J., Detrick B., Redmond T.M. 1993. Molecular cloning and expression of RPE65, a novel retinal pigment epithelium-specific microsomal protein that is post-transcriptionally regulated in vitro. *J. Biol. Chem.* 268:15751-15757.
- Hollander D., Ruble P.E. 1978. Beta-Carotene intestinal absorption: bile, fatty acid, pH and flow rate effects on transport. *Am. J. Physiol.* 235:E686-E691.
- Johnson J.E., Qin J., Krinsky N.I., Russell R.M. 1997. Beta-carotene isomers in human serum, breast milk and bucal mucosa cells after continuous oral doses of all-trans and 9-cis beta-carotene. *J. Nutr.* 127:1993-1999.
- Jouni Z.E. y Wells M. 1993. Purification of a carotenoid-binding protein from the midgut of the silkworm, *Bombyx mori*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 691:210-212.
- Keating E.K., Hale W.H., Hubert F. 1964. *In vitro* degradation of vitamin A and carotene by rumen liquor. *J. Anim. Sci.* 25:111-117.
- Kiefer C., Hessel S., Lampert J.M., Vogt K., Lederer M.O., Breithaupt D.E., von Lintig J. 2001. Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A. *J. Biol. Chem.* 276:14110-14116.
- Kiefer C., Sumser E., Wernet M.F., Von Lintig J. 2002. A class B scavenger receptor mediates the cellular uptake of carotenoids in *Drosophila*. *PNAS*. 99:10581-10586.
- King T.B., Lohman T.G., Smith G.S. 1962. Evidence of ruminoreticular losses of vitamin A and carotene. *J. Anim. Sci.* 21:1002.
- Kloer, D., Ruch, S., Al-Babili, S., Beyer, P., Shulz G. 2005. The structure of a retinal forming carotenoid oxygenase. *Science* 308:267-269.
- Lakshman M.R. 2004. Alpha and omega of carotenoid cleavage. *J. Nutr.* 134,1:241s-245s.
- Lakshman M.R., Rao M.N. 1999. Purification and characterization of cellular carotenoid-binding protein from mammalian liver. *Methods Enzymol.* 299:441-456.
-

-
- Lakshman M.R., Okoh C. 1993. Enzymatic conversion of all-trans- β -carotene to retinal. *Methods Enzimol.* 214:256-269.
- Lampert J.M., Holzschuh J., Hessel S., Driever W., Vogt K., von Lintig J. 2003. Provitamin A conversion via the beta,beta-carotene-15,15'-oxygenase is essential for pattern formation and differentiation during zebrafish embryogenesis. *Development* 130:2173-2186.
- Landrum J.T., Bone R.A. 2001. Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. *Arch. Biochem. Biophys.* 385:28-40.
- Larsen T.W., Yang A., Tume R.K. 1993. The *in vitro* destruction of rumen fluid carotenoids by plant lipoxygenases. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 30:197-207.
- Leuenberger M.G., Engeloch-Jarret C., Woggon W.D. 2001. The reaction mechanism of the enzyme-catalyzed central cleavage of beta-carotene to retinal. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 40:2613-2617.
- Lindqvist A., Andersson S. 2002. Biochemical properties of purified recombinant human beta-carotene 15,15'-monooxygenase. *J. Biol. Chem.* 277:23942-23948.
- Lindqvist, A., Andersson, S. 2004. Cell type-specific expression of β -carotene 15,15'-monooxygenase in human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 52:491-499.
- Livera, G., Rouiller-Fabre, V., Pairault, C., Levacher, C., Habert, R. 2002. Regulation and perturbation of testicular functions by vitamin A. *Reproduction* 124:173-180.
- López-Fernández L.A., del Mazo, J. 1997. The cytosolic aldehyde dehydrogenase gene (Aldh1) is developmentally expressed in Leydig cells. *FEBS Lett.* 407:225-229.
- Mohan, M., Thirumalapura, N.R., Malayer, J. 2003. Bovine cumulus-granulosa cells contain biologically active retinoid receptors that can respond to retinoic acid. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1:104.
- Moore T. 1930. Vitamin A and carotene. VI. The conversion of carotene to vitamin A in vivo. *Biochem. J.* 24:692-702.
- Mora O., Romano J.L. González E., Ruiz F.J., Shimada A. 1999. *In vitro* and *in situ* disappearance of β -carotene and lutein from Lucerne (*Medicago sativa*) hay in bovine and caprine ruminal fluids. *J. Sci. Food Agric.* 79:273-276.
- Mora O., Romano J.L. González E., Ruiz F.J., Shimada A. 2000. Low cleavage activity of 15,15'-dioxygenase to convert β -carotene to retinal in cattle compared with goats, is associated with the yellow pigmentation of adipose tissue. *Int. J. Vit. Nut. Res.* 70:199-205.
- Mora O., Shimada M.A. 2001. Causas del color amarillo de la grasa de canales de bovinos finalizados en pastoreo. *Vet. Mex.* 32:63-71.
- Morgan J.H.L., Pickering F.S., Everitt G.C. 1969. Some factors affecting yellow fat color in cattle. *Proc. New Zeland Soc. Anim. Prod.* 29:164-175.
- Nagao A., During A., Hoshino C., Terao J., Olson J.A. 1996. Stoichiometric conversion of all trans-beta-carotene to retinal by pig intestinal extract. *Arch. Biochem. Biophys.* 328:57-63.
- Napoli J.L., Race K.R. 1988. Biogenesis of retinoic acid from beta-carotene. Differences between the metabolism of beta-carotene and retinal. *J. Biol. Chem.* 263:17372-17377.
- O'Fallon, J.V., Chew, B.P. 1984. The subcellular distribution of β -carotene in bovine corpus luteum. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 177:406-411.
-

-
- Olson J.A. 1998. En: M.E. Shils, J.A. Olson, M. Shike and A.C. Ross, Editors, *Modern Human Nutrition in Health and Disease*. Lippincott, Williams & Wilkins. pp. 525–541.
- Olson J.A., Hayalshi O. 1965. The enzymatic cleavage of β -carotene into vitamin A by soluble enzymes of rat liver and intestine. *PNAS*. 54:1364-1370.
- Ong D.E. 1993. Retinoid metabolism during intestinal absorption. *J. Nutr.* 123:351-355.
- Paik J., Doring A., Harrison E.H., Mendelsohn C.L., Lai K., Blaner W.S. 2001. Expression and characterization of a murine enzyme able to cleave beta-carotene: the formation of retinoids. *J. Biol. Chem.* 276:32160–32168.
- Paik J., Vogel S., Quadro L., Plantadosi R., Gottesman M., Lai K., Hamberger L., de Moraes Viera M., Blaner W.S. 2004. Vitamin A: Overlapping delivery pathways to tissues from the circulation. *J. Nutr.* 134:276s-280s.
- Parker R.S. 1996. Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *FASEB J.* 10:542–551.
- Parvin S., Sivakumar B. 2000. Nutritional status affects intestinal carotene cleavage activity and carotene conversion to vitamin A in rats. *J. Nutr.* 130:573-577.
- Peto R., Doll R., Buckley J.D., Sporn M.B. 1981. Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates? *Nature*. 290:201–208.
- Pollakov E., Gentleman S., Cunningham F.X.Jr., Miller-Ihli N.J., Redmond T.M. 2005. Key role of conserved histidines in recombinant mouse β -carotene-15,15'-monooxygenase-1 activity. *J. Biol. Chem.* 280:29217-29223.
- Prache S., Priolo A., Grolier P. 2003. Persistence of carotenoid pigments in the blood of concentrate-finished grazing sheep: Its significance for traceability of grass-feeding. *J. Anim. Sci.* 81:360-367.
- Rapoport, R., Sklan, D., Wolfenson, D., Shaham-Albalancy, A., Hanukoglu, I. 1998. Antioxidant capacity is correlated with steroidogenic status of the corpus luteum during the bovine estrous cycle. *Biochim. Biophys. Acta* 1380:133–140.
- Redmond T.M., Gentleman S., Duncan T., Yu S., Wiggert B., Gantt E., Cunningham Jr. F.X. 2001. Identification, expression, and substrate specificity of a mammalian beta-carotene 15,15'-dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 276:6560–6565.
- Redmond T.M., Yu S., Lee E., Bok D., Hamasaki D., Chen N., Goletz P., Ma J.X., Crouch R.K., Pfeifer K. 1998. Rpe65 is necessary for production of 11-cis vitamin A in the retinal visual cycle. *Nat. Genet.* 20:44–351.
- Rigotti A., Trigatti B.L., Penman M., Rayburn H., Herz J., Krieger M. 1997. A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *PNAS*. 94:12610–12615.
- Rodgers, R.J., Lavranos, T.C., Rodgers, H.F., Young, F.M., Vella, C.A. 1995. The physiology of the ovary: maturation of ovarian granulosa cells and a novel role for antioxidants in the corpus luteum. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 53:241–246.
- Sharma R.V., Mathur S.N., Ganguly J. 1976. Studies on the relative biopotencies and intestinal absorption of different apo-beta-carotenoids in rats and chickens. *Biochem. J.* 158:377–383.
- SIAP. 2005. Servicio de Información y estadística agroalimentaria y pesquera. SAGARPA.
- Sklan, D. 1983. Carotene cleavage activity in the corpus luteum of cattle. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* 53:23–26.
-

-
- Sklan D., Noy Y. 2000. Hidrolysis and absorption in the small intestines of posthatch chicks. *Poult. Sci.* 79:1306-1310.
- Stahl W., Schwarz W., von Laar J., Sies H. 1995. *All-trans*-beta-carotene preferentially accumulates in human chylomicrons and very low density lipoproteins compared with the 9-cis geometrical isomer. *J. Nutr.* 125:2128-2133.
- Strachan D.B., Yang A., Dillon R.D. 1993. Effect of grain feeding on fat colour and other carcass characteristics in previously grass-fed *Bos indicus* steers. *Austr. J. Exp. Agric.* 33:269-273.
- Tajima S., Goda T., Takase S. 1999. Coordinated distribution patterns of three enzyme activities involved in the absorption and metabolism of β -carotene and vitamin A along the villus-crypt axis of duodenum. *Life Sciences.* 65:841-848.
- Tang G.W., Wang X.D., Russell R.M., Krinsky N.I. 1991. Characterization of β -apo-13-carotenone and β -apo 14'-carotenal as enzymatic products of excentric cleavage of β -carotene. *Biochem.* 30:9829-9834.
- Tee E.S. 1992. Carotenoids and retinoids in human nutrition. *Crit. Rev. Food Sci. and Nutr.* 31:103-163.
- van Pelt, A.M., de Rooij, D.G. 1991. Retinoic acid is able to reinltiate spermatogenesis in vitamin A-deficient rats and high replicate doses support the full development of spermatogenic cells. *Endocrinology.* 128:697-704.
- van Poppel G. 1996. Epidemiological evidence for beta-carotene in prevention of cancer and cardiovascular disease. *Eur. J. Clin. Nutr.* 50:55S-57S.
- van Soest P.J. 1982. Nutritional ecology of the ruminant. O&B Books Inc., Corvallis, OR, USA. pp 260-263.
- van Soest P.J. 1994. Nutritional ecology of ruminant. 2nd edition. New York Comstock Publishing, Associates of a Division of Cornell University Press.
- van Vliet T., van Vlissingen M.F., van Schaik F., van den Berg H. 1996. beta-Carotene absorption and cleavage in rats is affected by the vitamin A concentration of the diet. *J. Nutr.* 126:499-508.
- Vogel S., Mendelsohn C.L., Mertz J.R., Plantadosi R., Waldburger C., Gottesman M.E., Blaner W.S. 2001. Characterization of a new member of the fatty acid-binding protein family that binds *all-trans*-retinol. *J. Biol. Chem.* 276:1353-1360.
- von Lintig J., Vogt K. 2000. Filling the gap in vitamin A research. Molecular identification of an enzyme cleaving beta-carotene to Retinal. *J. Biol. Chem.* 275:11915-11920.
- von Lintig J., Dreher A., Kiefer C., Wernet M.F., Vogt K. 2001. Analysis of the blind *Drosophila* mutant *ninaB* identifies the gene encoding the key enzyme for vitamin A formation in vivo. *PNAS.* 98:1130-1135.
- Wang X.D., Russell R.M., Liu C., Stickel F., Smith D.E., Krinsky N.I. 1996. Beta-oxidation in rabbit liver in vitro and in the perfused ferret liver contributes to retinoic acid biosynthesis from beta-apocarotenoids. *J. Biol. Chem.* 271:26490-26498.
- Wyss A., Wirtz G., Woggon W.D., Brugger R., Wyss M., Friedlein A., Bachmann H., Hunziker W. 2000. Cloning and expression of beta, beta-carotene 15,15'-dioxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271:334-336.
- Wyss A., Wirtz G.M., Woggon W.D., Brugger R., Wyss M., Friedlein A., Riss G., Bachmann H., Hunziker W. 2001. Expression pattern and localization of β , β -carotene 15,15'-dioxygenase in different tissues. *Biochem. J.* 354:521-529.
-

-
- Yan W., Jang G.F., Haeseleer F., Esumi N., Chang J., Kerrigan M., Campochiaro M., Campochiaro P., Palczewski K., Zack D.J. 2001. Cloning and characterization of a human beta,beta-carotene-15,15'-dioxygenase that is highly expressed in the retinal pigment epithelium. *Genomics* 72:193-202.
- Yang A., Larsen T.W., Tume R.K. 1992. Carotenoid and retinol concentrations in serum, adipose tissue and liver and carotenoid transport in sheep, goats and cattle. *Austr. J. Agric. Res.* 43:1809-1817.
- Yang A., Brewster M.J., Lanari R.K., Tume R.K. 2002. Effect of vitamin E supplementation on α -tocopherol and β -carotene concentrations in tissues from pasture- and grain-fed cattle. *Meat Sc.* 60:35-40.
- Yemelyanov A.Y., Katz N.B., Bernstein P.S. 2001. Ligand-binding characterization of xanthophyll carotenoids to solubilized membrane proteins derived from human retina. *Exp. Eye Res.* 72:381-392.
- Yeum K.J., Ferreira A.L., Smith D., Krinsky N.I., Russell R.M. 2000. The effect of α -tocopherol on the oxidative cleavage of β -carotene. *Free Radic. Biol. Med.* 29:105-114.
- You C.S., Parker R.S., Goodman K.J., Swanson J.E., Corso T.N. 1996. Evidence of *cis-trans* isomerization of 9-*cis*-beta-carotene during absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 64:177-183.
- Young, F.M., Luderer, W.B., Rodgers, R.J. 1995. The antioxidant β -carotene prevents covalent cross-linking between cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 and its electron donor, adrenodoxin, in bovine luteal cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 109:113-118.
- Zagalsky P.F., Eliopoulos E.E., Findlay J.B. 1991. The lobster carapace carotenoprotein, alpha-crustacyanin. A possible role for tryptophan in the bathochromic spectral shift of protein-bound astaxanthin. *J. Biochem.* 274:79-83.
- Ziegler R.G. 1991. Vegetables, fruits, and carotenoids and the risk of cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* 53:251S-259S.
- Zolfaghari R., Ross A.C. 2000. Lecithin:retinol acyltransferase from mouse and rat liver. cDNA cloning and liver-specific regulation by dietary vitamin a and retinoic acid. *J. Lipid Res.* 41:2024-2034.
-

Anexo

A Potential Role for β -Carotene in Avian Embryonic Development

Ofelia Mora¹, Lourdes Kuri-Melo¹, Adriana González-Gallardo¹,
Esperanza Meléndez², Adriana Morales¹, Armando Shimada¹ and
Alfredo Varela-Echavarría²

¹ Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional, Coordinación General de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Blvd. B. Quintana 514-D, Arboledas, Querétaro, Qro. México, CP 76140

² Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apto. Postal 1-1141, Querétaro, Qro. México, CP 76001

Received for publication: June 11, 2003; Accepted for publication: September 25, 2003

Abstract: Vitamin A is essential for vertebrate embryonic development; dietary carotenoids are the primary source of vitamin A since animals cannot synthesize it *de novo*. To study the role of β -carotene during embryonic development, we analyzed in chick embryos the expression of β - β -carotene 15,15'-oxygenase (β -oxy) which cleaves β -carotene to produce two molecules of retinal. β -oxy transcripts were detected in one-and-a-half- to five-day-old embryo homogenates and *in situ* hybridization in five-day-old embryos, revealing their presence in tissues including the central nervous system, lungs, limbs, and cardiovascular system. Moreover, we detected β -oxy enzymatic activity in extracts from five-day-old embryos as well as small amounts of β -carotene in the egg yolk. These results indicate that β -oxy is present during early developmental stages, raising the possibility that yolk-stored β -carotene is utilized as a source of vitamin A. Thus, our results suggest that β -carotene could play an important role in early avian embryonic development as a local source of vitamin A in specific tissues.

Key words: β -carotene, 15,15'-dioxygenase, chick, embryos, development, retinoids

Introduction

Only microorganisms and plants synthesize carotenoids. In animals, dietary carotenoids are sequentially metabolized to retinaldehyde, retinol, and retinoic acid (RA) in different organs and tissue compartments. These C₂₀ iso-

prenoids are collectively referred to as retinoids or vitamin A, which is an essential micronutrient throughout the life cycle of vertebrates.

More than 600 carotenoids are known, but only a small fraction of them have vitamin A activity [1]. The carotenoid with the highest provitamin A activity is all-trans- β -carotene [2]. After absorption of β -carotene in the small intestine, its symmetric oxidative cleavage to yield retinal is the key step in its metabolism to vitamin A [3]. In higher vertebrates, the conversion of β -carotene to retinal and subsequently to retinol, which constitutes the predominant circulating form of vitamin A, takes place large-

Abbreviations: Ey, eye; Di, diencephalon; Te, telencephalon; Re, retina; LB, leg bud; NT, neural tube; DRG, dorsal root ganglion; NO, notochord; Ao, aorta; CV, cardinal vein; Oe, esophagus; Lu, lung bud; Ve, ventricle; Cr, crop; Ms, mesonephros; PC, pleural cavity; and My, myotome.

ly in the intestinal mucosae. The symmetric cleavage of β -carotene is carried out by β , β -carotene 15,15'-oxygenase (β -oxy, EC.1.13.11.21) in the cytosol of mature enterocytes [4, 5]. β -oxy activity is also present, albeit at lower levels, in liver, lungs, and kidneys [6]. This enzyme was first described in 1965 in rat intestinal mucosae [4, 5] and it has since been detected in several vertebrate species [7–9]. The cDNAs for β -oxy were recently cloned from the fruit fly (*Drosophila melanogaster*) [10], chick [5], mouse, human, and zebra fish [11–13] and homologous sequences were also found in the nematode *Coenorhabditis elegans* [12]. In mouse and eight-day-old chicks, expression of β -oxy has been detected in kidney, liver, and intestine; in the former it was also found in the testes [11]. This tissue-specific expression of β -oxy suggests these tissues may produce retinoids from β -carotene locally to help meet their metabolic needs of vitamin A.

Vitamin A is required for reproduction [14], embryonic and fetal development [15], growth, differentiation, tissue maintenance [11, 16], and vision [17]. Except in vision, most of the effects of vitamin A are exerted by RA upon its binding by the nuclear receptors called retinoic acid receptors (RARs) and retinoid X receptors (RXRs) that regulate the expression of genes with RA response elements in their regulatory regions [18]. During embryonic development, these regulatory functions of RA contribute to pattern formation and mediate multiple effects on cell division and differentiation in tissues of ectodermal, endodermal, and mesodermal origin [14, 19].

In view of the relevance of vitamin A in embryonic development and considering the importance of β -carotene as a source of this micronutrient, we studied the expression of β -oxy in one-and-a-half- to five-day-old chick embryos. Its widespread expression in the embryo and the presence of β -carotene in the egg yolk suggest an important role for β -oxy and β -carotene in avian embryonic development.

Materials and Methods

Chick embryos: White Leghorn chick embryos were incubated to the desired Hamburger and Hamilton (HH) stage [20] for total RNA extraction, β -oxy enzymatic assays, and *in situ* hybridization. Embryos were collected in cold phosphate-buffered saline (PBS) and dissociated immediately for RNA extraction and enzymatic assays (see below). For *in situ* hybridization, embryos were fixed at 4°C in 3.5% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for at least 2 hours.

Preparation of Total RNA: Total RNA was extracted from samples of approximately 35 mg of HH10–12, HH14

and HH30 embryos using the RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany). The concentration of the isolated total RNA was determined spectrophotometrically, and its quality was confirmed by detection of 16S and 28S ribosomal RNA bands on 1% denaturing formamide-agarose gels [21].

Cloning of chicken β -oxy cDNA: Based on the published *Gallus gallus* β -oxy cDNA sequence [3] (GenBank Accession number AJ271386), the following primers were designed to clone by reverse transcription (RT) and polymerase chain reaction (PCR) the 101–1889 bp cDNA fragment: 5'-end, AGGAGCAGCTGGGTAGAGGA and 3'-end, TATCGGTACCTGTAGTAAACTC. Total RNA was obtained from duodenal mucosae of one-week-old chicks and used with the 3'-end primer in a standard Superscript RT reaction according to the manufacturer's instructions (Gibco BRL-Life Technologies, Inc., Rockville MD, USA). PCR amplification of the cDNA fragment was then carried out with both the 5'-end and the 3'-end primers, in a standard Taq DNA polymerase reaction (Gibco BRL-Life Technologies, Inc., Rockville MD, USA). The PCR product was gel-purified, digested with the restriction enzymes *PvuII* and *KpnI* and cloned into the corresponding sites of the pBlueScript (SK) vector (Stratagene, La Jolla CA, USA). To confirm the identity of the cloned fragment, its sequence was determined in a Genetic Analyzer (ABI PRISM, 310 Perkin Elmer, USA) using universal M13 and internal primers. The sequence was found to be identical to the one reported by Wyss [3].

To detect the presence of β -oxy transcripts in chick embryos of several stages (HH10–12, HH14, and HH30), total RNA was extracted from embryos of each of the stages and used in RT-PCR assays with the primers described above. To confirm the identity of the cDNA fragment amplified, the following internal primers were used to sequence it directly: sense, 5'TGAGGTTGGAACCATGGCTT3' and antisense 5'GATGGAGGTAAGCTTGTGT3'. The numbers of the 5' base of each of these primers correspond to the bases 404 and 1188 of the full-length cDNA sequence, respectively. Further confirmation of the identity of the 101–1889 fragment was obtained by cloning it from HH30 extracts as described above and sequencing it using universal and internal primers (data not shown).

***In situ* hybridization:** *In situ* hybridization of β -oxy mRNA in the chick embryos was performed using digoxigenin-labeled RNA probes as described by Varela-Echavarría *et al* [22] on HH30 20 μ m cryosections. Sense and anti-sense probes were generated for the β -oxy cloned fragment by *in vitro* transcription (Boehringer Mannheim, Ingelheim Germany). For antisense probes, the β -oxy vector was linearized with *SmaI*, and transcripts were gener-

ated with T7 RNA polymerase. For sense probes, the vector was linearized with *KpnI*, and transcripts were generated with T3 RNA polymerase.

Enzymatic assay: To measure the activity of β -oxy, 300 HH30 chick embryos were collected in ice-cold PBS. The embryos were homogenized in 5 mL of an ice-cold potassium phosphate buffer (100 mM, pH 7.7) containing 4 mM $MgCl_2$, 30 mM nicotinamide, and 1 mM dithiothreitol [23, 24]. This homogenate was centrifuged for 20 minutes at $9000 \times g$, and the supernatant fraction (S9) was stored at $-70^\circ C$ in 1-mL aliquots for subsequent analysis. The protein concentration of the S9 samples was measured using the method described by Bradford [25].

The β -oxy assay was performed as described previously [24] using high-performance liquid chromatography (HPLC) to measure retinal. The amount of retinal produced in the assay is proportional to the amount of enzyme present in the reaction. A standard reaction contained 4 mg of S9 protein and 5.6 μM β -carotene as substrate. The activity in the HH30 chick embryo S9 fraction was determined in five independent assays, each performed in triplicate. The reactions were incubated for 1 hr at $37^\circ C$, extracted with hexane, dried under nitrogen, dissolved in anhydrous acetone, and analyzed by HPLC.

Concentration of β -carotene in egg yolk: The extraction of β -carotene was performed using the cold saponification method described by the AOAC [26] for dried materials. Egg yolk was lyophilized and 0.5 g of the dried material was dissolved in 7.5 mL of extractant (hexane-absolute ethanol-toluene, 10:7:6:7) in a 35 mL volumetric flask. After adding 0.5 mL of 40% methanolic KOH, the suspension was mixed vigorously and allowed to stand in the dark for 16 hours. 7.5 mL hexane were then added, mixed, and diluted to 35 mL with 10% Na_2SO_4 solution. After 1 hour in the dark, the upper layer was collected and evaporated under nitrogen. The residue was dissolved in 200 μL of anhydrous acetone and loaded onto the HPLC.

HPLC analysis: All extracts from egg yolk and enzymatic reactions were evaporated under nitrogen at room temperature. Residues containing carotenes and retinoids were dissolved in anhydrous acetone and transferred to brown HPLC injection vials. Retinyl acetate was used as an internal standard. An HPLC system, which included a Hewlett Packard 1100 System with DAD, was used to measure β -carotene, retinol, and retinal. Retinal was separated on a Nucleosil 100 \AA column (250×4.6 mm) (Phenomenex, Torrance CA, USA); the mobile phase consisted of acetonitrile-100 mM ammonium acetate, pH 4.65 (72:25, v/v). Retinol and β -carotene in all samples were separated on a Hypersil ODS, 5 μm column (150×4.6 mm) (Chadwick Road, England) with a mobile phase of acetonitrile-methanol-methylene chloride-water (70:15:10:5, v/v/v/v). In all cases a 20 μL aliquot was injected into the HPLC system.

Results and Discussion

Ubiquitous Expression of β -oxy in Chick Embryos

RT-PCR assays using total RNA from chick embryos of various stages yielded a cDNA fragment of the expected size in all stages analyzed, indicating that β -oxy is expressed as early as HH10-12 and that it is still present at HH30 (Fig. 1, Table I). Southern blot analysis of the PCR fragments using a β -oxy-specific probe confirmed the identity of the fragments as β -oxy cDNA. Furthermore, direct sequencing with internal primers of the fragment obtained from the HH14 embryos and cloning and sequencing of the fragment from the HH30 embryos confirmed the identity of the cDNA amplified as that of β -oxy. Hence, the β -oxy gene is expressed in chick embryos at least from day one-and-a-half of incubation.

To study the expression of β -oxy at a stage in which organogenesis is in progress, we analyzed the tissue dis-

Table I: Determination of β -diox expression, activity, and β -carotene content in chick embryos or egg

HH Stage	RT-PCR (β -oxy)	<i>In situ</i> hybridization (β -oxy)	Enzymatic assay (β -oxy)	Concentration of β -carotene in egg yolk
10-12	Positive	N.D.	N.D.	N.D.
14	Positive	N.D.	N.D.	N.D.
30	Positive	Positive in central nervous system, lungs, limbs, and cardiovascular system	78 (SE = 11.9) pmol of retinal per mg of S9 protein per hour	0.098 μg g ⁻¹ of β -carotene (10.3 μg g ⁻¹ of retinol)

N.D., Not determined
SE, standard error

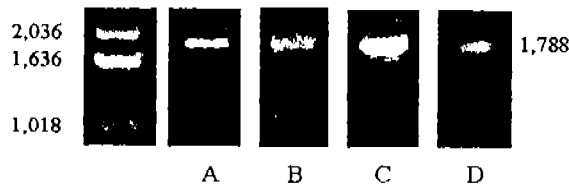


Figure 1: Chick β -oxy cDNA obtained by RT-PCR from duodenal mucosae of one-week-old chicks (A), HH10-12 embryos (B), HH14 embryos (C), and HH30 embryos (D).

tribution of β -oxy mRNA by *in situ* hybridization in HH30 chick embryos. In these studies we detected widespread, low-level expression throughout the embryo compared to the control sections, however higher β -oxy mRNA levels were detected in several tissues of mesodermal, endodermal, and ectodermal origin. Figure 2 shows the expression of β -oxy in sections through the head (Fig. 2A) showing expression in the central nervous system (CNS), and through the trunk (Fig. 2B to 2I) showing expression in the spinal cord, dorsal root ganglia, esophagus, and developing lungs, heart, and kidney. High levels of β -oxy mRNA were also detected in the developing limbs (my-

otome) (Fig. 2B, 2F, 2G, and 2J). Images on the right of each pair of micrographs show adjacent sections hybridized in parallel with the sense probe and photographed under identical illumination conditions, showing no hybridization signal. All the sites of higher β -oxy expression are tissues where RA is known to be of paramount importance during development.

Ubiquitous expression of β -oxy in chick embryos contrasts with the localized expression in intestinal mucosae, kidney, liver, and testes in the chick [11]. This difference could be related to the way in which β -carotene is acquired by the body. In adults, β -carotene is obtained from the diet and the highest expression of the enzyme in the intestinal mucosae is consistent with its processing at the point of entry into the body. In contrast, β -carotene could be obtained directly from the yolk at very early embryonic stages and later, once the circulatory system has begun to function, indirectly from the yolk through the bloodstream. The localized sites of expression in HH30 suggest that β -oxy might be involved in the production of RA from β -carotene in the tissues where RA exerts its actions (Table 1).

Enzymatic Activity of β -oxy is Present in Chick Embryos: Detection of β -oxy mRNA in embryonic tissues is

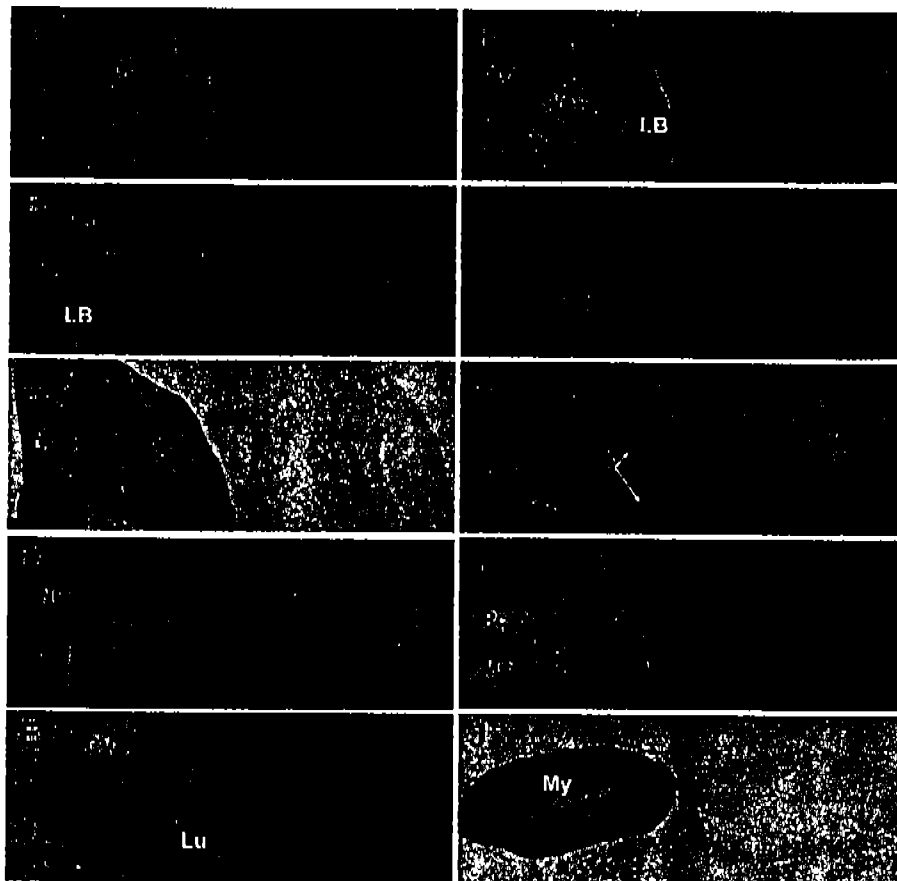


Figure 2: *In situ* hybridization on cryosections of HH30 embryos. Expression of β -oxy was detected in the proencephalon and eye (A), in the spinal cord and dorsal root ganglia (B–D), cardiovascular system (F), digestive system (D–F), respiratory system (D–F and H), urinary system (I), and limbs (myotome) (B, F, G and J). Sections on the left of each pair were hybridized with an antisense probe and those on the right with the sense probe. Dark signal on the left-hand side of the sense-hybridized section in A is the pigment of the retina.

not sufficient to establish a function for the enzyme during development. To test this possibility, we measured enzyme activity directly in HH30 chick embryo S9 homogenates to confirm the results obtained by *in situ* hybridization on the same developmental stage. The activity was found to be 78 pmol of retinal per mg of protein per hour. This activity is approximately 50% of that found in the duodenal mucosae of eight-day-old chicks [27]. The activity level in HH30 embryos is considerable taking into account that the duodenal mucosae is the site with the greatest β -oxy activity in the chick, and the digestive enzymatic machinery of the eight-day-old chick is apparently mature [28, 29]. Hence, our studies confirm the presence of β -oxy in five-day-old embryos and thus support the hypothesis that this enzyme has a role in embryonic development.

β -Carotene is present in Chicken Egg Yolk: β -oxy can function to supply retinoids during development only if its substrate, β -carotene, is present. β -carotene content was measured in the egg yolk and, as reference, the concentration of the most abundant form of vitamin A in the egg, retinol, was also determined. Their concentrations were found to be $0.098 \mu\text{g g}^{-1}$ and $10.3 \mu\text{g g}^{-1}$, respectively. These determinations, and similar results obtained by Jiang *et al* [30], indicate that β -carotene represents about 2% of the total vitamin A in the egg since β -carotene yields two molecules of retinol upon oxidative cleavage by β -oxy. Thus, the substrate of β -oxy is present in the egg, although it constitutes only a small proportion of the total vitamin A.

These findings are intriguing since it is believed that in chickens, as well as in rats and pigs, dietary β -carotene is largely converted to vitamin A in the intestinal mucosae and very little or no β -carotene is taken up into the circulation [2]. Our results indicate that at least some β -carotene reaches the egg yolk where it could serve as a source of vitamin A for embryonic development.

Vitamin A in Early Vertebrate Development: Vitamin A is known to have pleiotropic effects during embryonic development. Excess or deficiency of RA causes specific defects in the central nervous system, neural crest cell derivatives, craniofacial structures, limb, urogenital tract, diaphragm, lungs, and the cardiovascular system [19, 31]. Due to the short half-life of RA under physiological conditions, its availability in these diverse sites of action depends on the balance between its synthesis and its degradation. This results in stage- and tissue-specific steady-state concentrations of RA in the embryo [99? 32–36]. Thus, retinoid signaling during embryogenesis may be initiated by up-regulation of RA synthesis from endogenous precursors. Although retinol seems to be the main source

of the other retinoids, local biosynthesis from β -carotene could also contribute to the pool of vitamin A available at specific tissues and developmental stages.

Is β -oxy Important During Vertebrate Embryonic Development? While the β -carotene content has only been measured in chicken eggs [30] and this study? and in mammals the maternal contribution of intact β -carotene to the embryo has not been measured, β -oxy expression suggests a role for β -carotene during early embryonic development. Consistent with this, β -oxy mRNA was also detected in E7 mouse embryos [13] and prior to gastrulation in zebra fish embryos [12]. In our studies, we detected expression of β -oxy in chick embryos from one and a half to five days of incubation with widespread low expression and high expression levels restricted to particular tissues in the latter. This ubiquitous expression, however, contrasts with the low amount of β -carotene in the yolk relative to the total amount of retinol (2%). Possibly, the β -carotene in the yolk is a relevant source of vitamin A only in early stages of development, whereas later the more abundant retinol is used. Consistent with an early role for β -carotene, β -oxy mRNA in mouse embryos is only detected at E7, while from E7.5 up to at least E8.5 it appears to be absent or present at low levels [11, 13].

The biochemical processes responsible for the conversion of β -carotene into retinoids are not fully understood [11], and controversy exists about the balance between the symmetric cleavage to produce only retinal [37, 38] and the asymmetric cleavage to produce apo-carotenals or apocarotenonic acids from which RA could also be generated [39]. β -oxy, however, has only been shown to cleave β -carotene symmetrically. Hence, while the yolk β -carotene could be a source of apocarotenals, which have also been suggested to play a role in embryonic development in zebra fish [12], the role of β -oxy is likely to be linked to the local processing of β -carotene into RA in RA-dependent tissues.

Further studies are required to confirm the proposed role of β -carotene and β -oxy during embryonic development in vertebrates. Studying chick or mouse embryos lacking β -carotene could result in a better understanding of the metabolism of vitamin A and its relationship to embryonic development.

Conclusion

Our results demonstrate that the β -oxy mRNA is already present in one-and-a-half-day-old embryos and that it is more abundant in several tissues in five-day-old embryos. Enzymatic activity of β -oxy was also demonstrated in the

latter. Hence, the expression of β -oxy in chick embryos precedes hatching by at least 17 days, and thus it is possible that yolk-stored β -carotene is a source of vitamin A for the embryos. In this regard, we also found the β -carotene content of the yolk to represent about 2% of the total vitamin A present in the egg. The expression of β -oxy in the embryos and the presence of β -carotene in the yolk suggest that this enzyme may have an important role in vitamin A metabolism at specific locations during early avian embryonic development.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (J31295-B) to O.M. and a Wellcome Trust Grant (071174/Z/03/Z). We thank Carmen Mejia-Viggiano for sequencing the β -oxy mRNA, Leopoldo González for helping in the capture and processing of digital images, and Dr. Dorothy Pless for editing the manuscript. We also thank Pilgrim's Pride de México for the generous donation of fertilized eggs.

References

- Delgado-Vargas, F., Jimenez, A. R. and Paredes-Lopez, O. (2000) Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains – characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 40, 173–289.
- Ribaya-Mercado, J. D., Holmgren, S. C., Fox, J. G. and Russell, R. M. (1989) Dietary β -carotene absorption and metabolism in ferrets and rats. *J. Nutr.* 119, 665–668.
- Wyss, A., Wirtz, G., Woggon, W., Brugger, R., Wyss, M., Friedlein, A., Bachmann, H. and Hunziker, W. (2000) Cloning and expression of β , β -carotene 15,15'-dioxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271, 334–336.
- Goodman, D. S. and Huang, H. S. (1965) Biosynthesis of vitamin A with rat intestinal enzymes. *Science* 149, 879–880.
- Olson, J. A. and Hayaishi, O. (1965) The enzymatic cleavage of β -carotene into vitamin A by soluble enzymes of rat liver and intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54, 1364–1370.
- Wang, X. D., Tang, G. W., Fox, J. G., Krinsky, N. I. and Russell, R. M. (1991) Enzymatic conversion of β -carotene into β -apo-carotenals and retinoids by human, monkey, ferret, and rat tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 285, 8–16.
- Lakshman, M. R., Mychkovsky, I. and Attlesey, M. (1989). Enzymatic conversion of all-trans- β -carotene to retinal by a cytosolic enzyme from rabbit and rat intestinal mucosa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 9124–9128.
- Mora, O., Romano, J. L., Gonzalez, E., Ruiz, F. and Shimada, A. (2000) Low cleavage activity of 15,15'-dioxygenase to convert β -carotene to retinal in cattle compared with goats, is associated with the yellow pigmentation of adipose tissue. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 70, 199–205.
- Wang, Y., Xu, X., van Lieshout, M., West, C. E., Lugtenburg, J., Verhoeven, M. A., Creemers, A. F., Muhilal and van Breemen, R. B. (2000) A liquid chromatography-mass spectrometry method for the quantification of bioavailability and bioconversion of β -carotene to retinol in humans. *Anal. Chem.* 72, 4999–5003.
- von Liting, J. and Vogt, K. (2000) Filling the gap in vitamin A research. Molecular identification of an enzyme cleaving β -carotene to retinal. *J. Biol. Chem.* 275, 11915–11920.
- Paik, J., Doring, A., Harrison, E. H., Mendelsohn, C. L., Lai, K. and Blaner, W. S. (2001) Expression and characterization of a murine enzyme able to cleave β -carotene. The formation of retinoids. *J. Biol. Chem.* 276, 32160–32168.
- Kiefer, C., Hessel, S., Lampert, J. M., Vogt, K., Lederer, M. O., Breithaupt, D. E. and von Liting, J. (2001) Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A. *J. Biol. Chem.* 276, 14110–14116.
- Redmond, T. M., Gentleman, S., Duncan, T., Yu, S., Wiggert, B., Gantt, E. and Cunningham Jr., F. X. (2001) Identification, expression, and substrate specificity of a mammalian β -carotene 15,15'-dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 276, 6560–6565.
- Wolf, G. (1984). Multiple functions of vitamin A. *Physiol. Rev.* 64, 873–937.
- Maden, M., Gale, E. and Zile, M. (1998). The role of vitamin A in the development of the central nervous system. *J. Nutr.* 128, 471–475.
- Brockes, J. P. (1989). Retinoids, homeobox genes, and limb morphogenesis. *Neuron* 2, 1285–1294.
- Wolf, G. (2001) The discovery of the visual function of vitamin A. *J. Nutr.* 131, 1647–1650.
- Sakai, Y., Meno, C., Fujii, H., Nishino, J., Shiratori, H., Saijoh, Y., Rossant, J. and Hamada, H. (2001) The retinoic acid-inactivating enzyme CYP26 is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the antero-posterior axis within the mouse embryo. *Genes Dev.* 15, 213–225.
- Zile, M. H. (1998) Vitamin A and embryonic development: an overview. *J. Nutr.* 128, 455–458.
- Hamburger, V. and Hamilton, H. L. (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88, 49–87.
- Ausbel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. and Struhl, K. (1994) Current protocols in molecular biology. Wiley & Sons, Inc., New York.
- Varela-Echavarria, A., Pfaff, S. L. and Guthrie, S. (1996). Differential expression of LIM homeobox genes among motor neuron subpopulations in the developing chick brain stem. *Mol. Cell Neurosci.* 8, 242–257.
- van Vliet, T., van Schaik, F., van den Berg, H. and Schreurs, W. H. (1993). Effect of vitamin A and β -carotene intake on dioxygenase activity in rat intestine. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 691, 220–222.
- van Vliet, T., van Vlissingen, M. F., van Schaik, F. and van den Berg, H. (1996) β -Carotene absorption and cleavage in rats is affected by the vitamin A concentration of the diet. *J. Nutr.* 126, 499–508.

25. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
26. Association of Official Analytical Chemists. (1990) Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.
27. Tajima, S., Suruga, K., Goda, T. and Takase, S. (1999) Developmental induction and villus-crypt distribution of retinol-esterifying enzyme activities in chick duodenum. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 45, 725–732.
28. Iji, P.A., Saki, A. and Tivey, D.R. (2001) Body and intestinal growth of broiler chicks on a commercial starter diet. 3. Development and characteristics of tryptophan transport. *Br. Poult. Sci.* 42, 523–529.
29. Sklan, D. and Noy, Y. (2000) Hydrolysis and absorption in the small intestines of posthatch chicks. *Poult. Sci.* 79, 1306–1310.
30. Jiang, Y.H., McGeachin, R.B. and Bailey, C.A. (1994) β -tocopherol, β -carotene, and retinol enrichment of chicken eggs. *Poult. Sci.* 73, 1137–1143.
31. Morriss-Kay, G.M. and Ward, S.J. (1999) Retinoids and mammalian development. *Int. Rev. Cytol.* 188, 73–131.
32. Morriss-Kay, G.M. and Sokolova, N. (1996) Embryonic development and pattern formation. *FASEB J.* 10, 961–968.
33. Maden, M. (1999) Heads or tails? Retinoic acid will decide. *Bioessays* 21, 809–812.
34. Chambon, P. (1996) A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* 10, 940–954.
35. Ang, H.L., Deltour, L., Hayamizu, T.F., Zgombic-Knight, M. and Duester, G. (1996) Retinoic acid synthesis in mouse embryos during gastrulation and craniofacial development linked to class IV alcohol dehydrogenase gene expression. *J. Biol. Chem.* 271, 9526–9534.
36. Gilbert, S. (1997) *Developmental biology*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, USA.
37. Wolf, G. (2001) The enzymatic cleavage of β -carotene: end of a controversy. *Nutr. Rev.* 59, 116–118.
38. Wolf, G. (1995). The enzymatic cleavage of β -carotene: still controversial. *Nutr. Rev.* 53, 134–137.
39. Parker, R.S. (1996) Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *FASEB J.* 10, 542–551.

Ofelia Mora

Blvd. Bernardo Quintana 514-D Suite 23-141
Arboledas, Querétaro, Qro. CP 76140, México
E-mail: mora@mail.cnb.unam.mx and
ofemora2001@yahoo.com
Tel. +52 (442) 2381032
Fax +52 (442) 2381038

Presentaciones en congresos

Expression and Activity of 15,15'Dioxygenase in Chick Embryos.

Mora O., Kurl L., González A., Meléndez E., **Morales A.**, Shimada A., Varela A.

13th International Carotenoid Symposium.

Enero 2002. Honolulu, HI USA.

Expression of 15,15'Dioxygenase in Bovine Ovarian Tissue.

Rosas A., **Morales A.**, González A., Shimada A., Mejía C., Varela A., Mora O.

Experimental Biology.

Abril 2003. San Diego, CA USA.

Hepatic and Duodenal Expression of β,β -Carotene 15,15'Oxygenase in Beef Cattle.

Morales A., González A., Shimada A., Cobos M., Varela A., Mora O.

FAO/IAEA International Symposium on Applications of Gene-based Technologies for Improving Animal Production and Health in Developing Countries.

Octubre 2003. Viena, Austria.

Expression of β,β -Carotene 15,15'Oxygenase in Bovine Duodenal and Hepatic Tissues.

Morales A., González A., Rosas A., Shimada A., Cobos M., Mora O.

Sixth International Symposium on the Nutrition of Herbivores.

Octubre 2003. Mérida Yuc., México.

Secuencia y expresión de la enzima β -caroteno-15,15'-oxigenasa de bovino.

Morales A., González A., Antaramian A., Varela A., Shimada A., Mora O.

XL Reunión Nacional de Investigación Pecuaria

Noviembre 2004. Mérida, Yuc. México.

Expresión de β -caroteno-15,15'oxigenasa en tejidos gonadales de bovino

Rosas A., Morales A., González A., Shimada A., Varela A., Mora O.

XL Reunión Nacional de Investigación Pecuaria

Noviembre 2004. Mérida, Yuc. México

Expression of β , β -Carotene 15,15' Oxygenase in Bovines

A. Morales, A. González, A. Shimada, A. Varela, O. Mora

X International Symposium on Ruminant Physiology

Agosto 2004. Copenhagen, Dinamarca.

Técnicas empleadas

Purificación de RNA con tiosulfato de guanidina (Trizol, Invitrogen)

1. En un tubo de 50 ml, añadir 1 ml de Trizol por cada 100 mg de tejido, y homogenizar en hielo.
2. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Añadir 0.2 ml de cloroformo por cada ml de Trizol empleado.
4. Agitar en vórtex e incubar 2-3 minutos a temperatura ambiente.
5. Centrifugar a 12 000 x g durante 15 minutos a 4 °C.
6. Transferir la fase acuosa a un tubo limpio.
7. Añadir 0.5 ml de isopropanol por cada ml de Trizol empleado.
8. Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
9. Centrifugar a 12 000 x g durante 10 minutos a 4 °C.
10. Remover el sobrenadante para recuperar la pastilla y agregar 1 ml de etanol por ml de Trizol utilizado.
11. Centrifugar a 7 500 x g durante 5 minutos a 4 °C.
12. Eliminar el sobrenadante y dejar secar la pastilla al aire.
13. Resuspender la pastilla con agua estéril.
14. Leer la concentración de RNA en el espectrofotómetro
$$1 \text{ U OD}_{260} = 40 \mu\text{g de RNA/ml}$$
$$(\text{Unidades } A_{260}) (40) (\text{factor de dilución}) / 1000$$
15. Correr gel para verificar la integridad del RNA.
16. Almacenar en alícuotas a -70° C.

Purificación de RNA (RNeasy, Qiagen)

1. Colocar 30 mg de tejido en un tubo de 1.5 ml con 600 μ l de buffer RLT y agregar 6 μ l de β -mercaptoetanol. Homogenizar con una jeringa insulínica.
2. Centrifugar el lisado por 3 min a máxima velocidad y tomar sólo el sobrenadante en un tubo nuevo.
3. Agregar un volumen de etanol al 70% al lisado homogenizado y mezclar muy bien, pipeteando..
4. Pasar no más de 700 μ l de la muestra al "RNeasy mini spin column" (el cual debe estar en un tubo colector), centrifugar por 15 segundos a 10 000 rpm. Si hay más de 700 μ l del lisado, adicionarlo a la misma columna secuencialmente. Eliminar el líquido del tubo colector.
5. Agregar 700 μ l del buffer RW dentro de la columna y centrifugar por 15 segundos a 10 000 rpm para lavar. Descartar el líquido.
6. Agregar 500 μ l del buffer RPE en la columna y centrifugar por 2 minutos a máxima velocidad. Este paso puede repetirse para quitar cualquier residuo de etanol de la columna.
7. Volver a centrifugar a vel. máx. por 1 min.
8. Transferir la columna a un tubo colector nuevo y agregar 30 μ l de agua libre de RNasas directamente en la columna. Eluir centrifugando por 1 minuto a 10 000 rpm.
9. Leer en espectrofotómetro, para calcular la concentración del RNA en
10. Almacenar en alícuotas a -70° C.

Purificación de RNAm (Fast track 2.0 kit, Invitrogen)

Este kit permite purificar RNAm a partir de tejido (0.4-1.0 g), células ($1 \times 10^7 - 1 \times 10^8$) y RNAt (0.1 - 1.0 mg).

Material requerido adicional al kit:

- Etanol 100%
- Etanol 80%
- Baño maría a 45 y 65 °C
- Nitrógeno líquido
- Navaja estéril
- Jeringas de 15 a 20 cc con agujas calibre 18-21
- Homogenizador de tejidos
- Centrífuga de mesa
- Agitador de plataforma

Preparación de la solución de lisis

Este buffer debe prepararse justo antes de comenzar

1. Checar que el buffer stock no se haya precipitado, de lo contrario se deberá calentar a 65 °C hasta que se disuelva, y dejar que se enfríe a temperatura ambiente.
2. A 15 ml de buffer agregar 300 µl de Protein/Rnasa Degradar por cada purificación.

Preparación de la solución salina de buffer fosfato

1. Para preparar un litro añadir a 800 ml de agua destilada lo siguiente

8 g	NaCl
0.22 g	KCl
1.44 g	Na ₂ HPO ₄
0.24 g	KH ₂ PO ₄

2. Ajustar el pH a 7.4 con 1N de HCl, aforar a 1 lt esterilizar en autoclave. Este buffer puede almacenarse a 4 °C.

Preparación del tejido fresco o congelado

1. Poner 1 gr de tejido en un tubo estéril de 50 ml y agregar 15 ml de solución de lisis
 2. Homogenizar el tejido y proceder al aislamiento de RNAm
-

Preparación del RNAtotal para purificar RNAm

Se recomienda comenzar con 1 mg de RNAtotal

1. Precipitar y lavar el RNAtotal con etanol al 80%
2. Resuspender la pastilla en 100 µl de solución de elusión
3. Pasar el RNA total a un tubo de 50 ml y agregar 10 ml de solución de lisis
4. Calentar a 65 °C por 5 minutos, e inmediatamente poner en hielo por un minuto exactamente.
5. Poner el tubo a temperatura ambiente y agregar 650 µl de NaCl 5M y ezcicar por inversión
6. Proceder al aislamiento de RNAm (Paso 4)

Aislamiento de RNAm

1. Incubar el tejido lisado a 45 °C por 60 minutos para eliminar las proteínas y ribonucleasas. Si persiste el material insoluble centrifugar a 4000 x g por 15 minutos a temperatura ambiente y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
2. Agregar 950 µl de NaCl 5M por cada 15 ml de lisado y mezclar por inversión
3. Cortar el DNA remanente pasando el lisado 3 – 4 veces por una jeringa de plástico con aguja calibre 18 al 21
4. Tomar un vial de oligo dT del desecador y agregarlo al vial del lisado
5. Cerrar el tubo y dejar que el oligo dT se hidrate por dos minutos
6. Mantener el tubo en agitación a 4 °C durante 60 minutos para que el RNAm se una al oligo dT
7. Centrifugar a 3000 x g por cinco minutos para paletizar el oligo dT, remover el sobrenadante cuidando no dañar la capa de resina.

Lavado del oligo dT celulosa

1. Resuspender el oligo dT en 20 ml de solución de ligación. Centrifugar a 3000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente y remover el la solución de la cama de resina.
 2. Resuspender la resina en 10 ml de solución de ligación, centrifugar como en el paso anterior y eliminar la solución
 3. Resuspender la resina en 10 ml de solución baja en sales, centrifugar como en el paso anterior y eliminar la solución
 4. Repetir 2-4 veces el paso anterior o hasta que no forme burbujas antes de la centrifugación. Después de la última lavada resuspender el oligo en 800 µl de solución baja en sales.
 5. Transferir el oligo a una columna y centrifugar a 5 000 x g durante 10 segundos a temperatura ambiente
 6. Volver a pasar el líquido centrifugado a través del oligo en la columna por 2-3 veces
 7. Para lavar, poner la columna de nuevo en el tubo, llenarla con 500 µl de solución baja en sales y mezclar la solución con la cama de celulosa y oligo dT cib yba punta de pipeta estéril. Centrifugar 10 segundos.
-

-
8. Repetir el paso anterior por lo menos 3 veces hasta que la densidad óptica a 260 nm del líquido sea menor de 0.05. Asegurarse que la solución se mezcle con la cama de celulosa.

Elusión y precipitado del RNAm

1. Poner la columna en un tubo nuevo para microcentrifuga
2. Añadir 200 μ l de solución de elusión y mezclarlo con la celulosa con una punta de pipeta estéril
3. Centrifugar por 30 segundos para eluir el RNAm
4. Repetir los pasos 2 y 3
5. Quitar la columna del tubo, los 400 μ l del tubo contienen el RNAm
6. Precipitar el RNAm con 60 μ l de acetato de sodio 2M y 1 ml de etanol al 100%. Congelar en hielo seco hasta que solidifique
7. Descongelar y centrifugar a 16 000 x g durante 15 minutos a 4 °C retirar el etanol
8. Centrifugar y eliminar las trazas de etanol. Resuspender la pastilla de RNAm en 20-50 μ l de solución de elusión o agua DEPC
9. Determinar la concentración de RNAm en espectrofotómetro a 260 nm. Almacenar en alícuotas a -70 °C.

Transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Transcripción reversa

1. Preparar la siguiente reacción en un tubo de 500 µl:

2 µg	RNA
6 µl	Buffer RT 5x
0.75 µl*	DNAsa
cbp30 µl	Agua

*0.5 µl DNAsa + 4.5 µl agua

2. Incubar a T° ambiente durante 15 minutos
3. Incubar 70 °C durante 5 min
4. Añadir los siguientes reactivos:

1µl	oligonucleótido antisentido (5µM)
1µl	DNTP's 10µM
5. Incubar a T° ambiente durante 5 minutos
6. Incubar en hielo mientras se añade

2µl	Buffer 5x
3µl	DTT (0.1M)
1µl	Inhibidor de RNasa
7. Homogenizar e incubar a 42 °C durante 2 min
8. Añadir 1µl de enzima RT-Superscript II (Invitrogen)
9. Incubar 42 °C durante 50 min
10. Incubar 70 °C durante 15 min
11. Poner el cDNA en hielo

Reacción en cadena de la polimerasa

1. Preparar la reacción

1µl	MgCl 50mM
5µl	Buffer 10x
1µl	DNTP's 10 mM
1µl	Oligo sentido (10mM)
1µl	Oligo antisentido (10mM)
3µl	cDNA
0.5µl	Taq Polimerasa (Invitrogen)
37.5µl	Agua
2. Incubar 2 minutos a 94 °C
3. Incubar 40 ciclos de:

45 seg	a 94 °C
1 min	a 56 °C
1 min	a 72 °C
4. Incubar finalmente 2 minutos a 72°C
5. Mantener en refrigeración.

**Amplificación de los extremos de cDNA
(Gene Racer Kit, Invitrogen)**
L1500-01 AMV RT y TOPO TA Cloning Kit for Sequencing

Contenido:

1. Módulo Gene Racer (-20°C)
 2. Módulo AMV RT (-80°C ¿?)
 3. Columnas SNAP (T° ambiente)
 4. Kit TOPO TA Cloning p/secuenciar (-20°C)
 5. Células competentes (-80°C)
- El Gene Racer contiene reactivos para cinco síntesis de cDNA por PCR, un control y primers para 50 PCRs.
 - El módulo TOPO contiene reactivos para clonar 10 productos de PCR.

Metodología

- Se comienza con 1 a 5 µg de RNA total o 50 a 250 ng de RNAm.
- El aislamiento de RNA se puede hacer con trizol o con Fast-Track 2.0 y eluir en agua DPC a 0.1-1 µg/µl. Antes de empezar checar la pureza del RNA con un gel de agarosa.
- Se requieren primers específicos para el extremo 5' y 3' con 50 a 70% de GC, 23 a 28 nucleótidos y una AT mayor de 72°C = 4(G+C)+2(A+T).

**Defosforilación del RNA no mensajero o truncado con fosfatasa
Intestinal de becerro (CIP)**

Se incluye RNA total de HeLa (gen de actina) como control positivo para todas las reacciones.

Antes de empezar

- RNA total (1-5 µg) o RNAm (50 a 250 ng) en agua DPC [0.1-1 µg/µl]
 - Hielo
 - Tubos estériles para microcentrifuga de 1.5 ml
 - Bloques o baño maría a 50°C
 - Etanol 95%
 - Hielo seco
 - Etanol 70%
 - Microcentrifuga a T° ambiente o 4°C
-

Reacción de defosforilación

1. Usar 1-5 µg de RNA total o 50 a 250 ng de RNAm y poner en un tubo estéril de 1.5 ml los siguientes reactivos.

Reactivo	Muestra	Control
RNA	X µl	2 µl
Buffer CIP 10X	1 µl	1 µl
RNaseOUT (40U/ µl)	1 µl	1 µl
CIP (10 U/µl)	1 µl	1 µl
Agua DPC	Y µl	5 µl
Volúmen total	10 µl	10 µl

2. Mezclar y centrifugar.
3. Incubar a 50°C por una hora.
4. Centrifugar y poner en hielo.

Precipitación del RNA

1. Añadir 90 µl de agua DEPC y 100 µl de fenol:cloroformo y vortexear vigorosamente por 30 seg.
2. Centrifugar a máxima velocidad durante 5 min. a T° ambiente.
3. Transferir la fase acuosa (superior) a un tubo nuevo (100 µl aprox.).
4. Agragar 2 µl de mussel glycogen 10mg/ml, 10 µl de acetato de sodio 10 M pH 5.2 y mezclar bien. Añadir 220 µl de etanol al 95% y vortexear brevemente.
5. Enfriar en hielo 10 min.
6. Centrifugar a máxima velocidad 20 minutos a 4°C.
7. Remover el sobrenadante con pipeta para recuperar el pellet.
8. Añadir 500 µl de etanol al 70%, Invertir varias veces y vortexear brevemente.
9. Centrifugar a máxima velocidad 2 minutos a 4°C.
10. Remover el etanol con pipeta para recuperar el pellet si es necesario volver a centrifugar para retirar el remanente de etanol.
11. Dejar secar el pellet por 1 ó 2 min a T° ambiente.
12. Resuspender el pellet en 8 µl de agua DEPC y tomar 1 µl para correrlo en un gel de agarosa.

Remoción de la cápsula del RNAm

Antes de empezar tener disponibles:

- Tubos estériles de microcentrifuga de 1.5 ml
-

-
- Hielo
 - Bloques a 37° C o baño maría
 - Etanol 95%
 - Etanol 70%
 - Hielo seco
 - Microcentrífuga a T° ambiente y 4°C

Reacción de decapsulación

1. En el tubo de la reacción anterior poner
 - 7 µl RNA defosforilado
 - 1 µl Buffer TAP 10X
 - 1 µl RNaseOUT (40 U/ µl)
 - 1 µl TAP (0.5 U/µl)
 - 10 µl Volúmen total
2. Mezclar con pipeta y vortex, y centrifugar
3. Incubar a 37°C por una hora.
4. Centrifugar y poner en hielo.

Precipitación del RNA

1. Añadir 90 µl de agua DEPC y 100 µl de fenol:cloroformo y vortexear vigorosamente por 30 seg.
 2. Centrifugar a máxima velocidad durante 5 min. a T° ambiente.
 3. Transferir la fase acuosa (superior) a un tubo nuevo (100 µl aprox.).
 4. Agragar 2 µl de mussel glycogen 10mg/ml, 10 µl de acetato de sodio 10 M pH 5.2 y mezclar bien. Añadir 220 µl de etanol al 95% y vortexear brevemente.
 5. Enfriar en hielo 10 min.
 6. Centrifugar a máxima velocidad 20 minutos a 4°C.
 7. Remover el sobrenadante con pipeta para recuperar el pellet.
 8. Añadir 500 µl de etanol al 70%, invertir varias veces y vortexear brevemente.
 9. Centrifugar a máxima velocidad 2 minutos a 4°C.
 10. Remover el etanol con pipeta para recuperar el pellet si es necesario volver a centrifugar para retirar el remanente de etanol.
 11. Dejar secar el pellet por 1 ó 2 min a T° ambiente.
 12. Resuspender el pellet en 8 µl de agua DEPC y tomar 1 µl para correrlo en un gel de agarosa.
-

Ligación del oligo RNA al RNAm decapsulado

Antes de empezar verificar que estén disponibles:

- Tubos estériles de microcentrifuga de 1.5 ml
- Hielo
- Bloques a 37° C o baño maría
- Bloques a 65° C
- Etanol 95%
- Etanol 70%
- Hielo seco
- Microcentrifuga a temperatura ambiente y 4°C

Reacción de ligación

1. Añadir los 7 μ l del RNA al tubo que contenga una prealícuota de Oligo liofilizado GeneRacer (0.25 μ g). Pipetear varias veces para resuspender el oligo y centrifugar.
2. Incubar a 65° durante 5 minutos.
3. Poner en hielo dos minutos y centrifugar.
4. Añadir los siguientes reactivos pipeteando y al finalizar centrifugar:
 - 1 μ l Buffer de ligación 10X
 - 1 μ l ATP 10 mM
 - 1 μ l RNaseOUT (40 U/ μ l)
 - 1 μ l T4 RNA ligasa (5 U/ μ l)
 - 10 μ l Volumen total
5. Incubar a 37°C por una hora.
6. Centrifugar y poner en hielo.

Precipitación del RNA

1. Añadir 90 μ l de agua DEPC y 100 μ l de fenol:cloroformo y vortexear vigorosamente por 30 seg.
 2. Centrifugar a máxima velocidad durante 5 min. a T° ambiente.
 3. Transferir la fase acuosa (superior) a un tubo nuevo (100 μ l aprox.).
 4. Agragar 2 μ l de mussel glycogen 10mg/ml, 10 μ l de acetato de sodio 10 M pH 5.2 y mezclar bien. Añadir 220 μ l de etanol al 95% y vortexear brevemente.
 5. Congelar en hielo seco 10 min.

Nota: Se puede precipitar el RNA a -20°C durante toda la noche para continuar al día siguiente.
 6. Centrifugar a máxima velocidad 20 minutos a 4°C.
-

-
7. Remover el sobrenadante con pipeta para recuperar el pellet.
 8. Añadir 500 μ l de etanol al 70%, invertir varias veces y vortexear brevemente.
 9. Centrifugar a máxima velocidad 2 minutos a 4°C.
 10. Remover el etanol con pipeta para recuperar el pellet si es necesario volver a centrifugar para retirar el remanente de etanol.
 11. Dejar secar el pellet por 1 ó 2 min a T° ambiente.
 12. Resuspender el pellet en 11 μ l de agua DEPC y tomar 1 μ l para correrlo en un gel de agarosa.

Transcripción Reversa del RNAm

Antes de empezar

- Tubos estériles de 1.5 ml
- Bloques a 42°C, 65°C, 70°C y 85°C
- Hielo

Reacción AMV RT

1. Añadir 1 μ l del primer deseado y 1 μ l de la mezcla de DNTP (25mM) al RNA ligado.
2. Incubar a 65°C por 5 minutos para remover cualquier estructura secundaria de RNA.
3. Poner en hielo por 2 min. y centrifugar.
4. Agregar los siguientes reactivos al RNA ligado y al Gene Racer Oligo dT.

2 μ l	Buffer RT 10X
1 μ l	AMV-RT (5U/ μ l)
4 μ l	Agua estéril
1 μ l	RnasaQUT (40U/ μ l)
20 μ l	Volumen total

Nota: Si usa Random Primers, incubar la mezcla a 25°C por 10 min.

5. Mezclar bien e incubar a 42°C por una hora.
6. Incubar la reacción a 85° por 15 min para inactivar la enzima.
7. Centrifugar e iniciar la amplificación.

Amplificación de los extremos de cDNA

Antes de empezar verificar que esté disponible:

- Termociclador
 - Enzima TAQ polimerasa Platinum HF
 - Primers específicos para el gen
-

- Buffer 10X PCR para la TAQ Polimerasa
- Solución dNTPs (10mM)
- Gel para DNA con 1% agarosa y bromuro de etidio

Preparar las siguientes reacciones

Reactivo	5'RACE	Control 5'RACE	3'RACE	Control 3'RACE
Gene Racer 5'Primer (10 μ M)	3 μ l	3 μ l	-	-
Oligo esp. Reverse (10 μ M)	1 μ l	-	-	-
Primer Control B.1 (10 μ M)	-	1 μ l	-	-
Gene Racer 3'Primer (10 μ M)	-	-	3 μ l	3 μ l
Oligo esp. Forward (10 μ M)	-	-	1 μ l	-
Primer Control A (10 μ M)	-	-	-	1 μ l
RT Template	1 μ l	-	1 μ l	-
HeLa RT Template	-	1 μ l	-	1 μ l
Buffer PCR HiFi 10X	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l
dNTP Solution (10 mM)	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l
TAQ Platinum (50 U/ μ l)	0.5 μ l	0.5 μ l	0.5 μ l	0.5 μ l
MgSO ₄ (50 mM)	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l
Agua estéril	36.5 μ l	36.5 μ l	36.5 μ l	36.5 μ l
Volumen total	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl

Condiciones y ciclos para la PCR

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94° C	2 minutos	1
94° C	30 segundos	5
72° C	2 minutos	
94° C	30 segundos	5
70° C	2 minutos	
94° C	30 segundos	20 a 25
68° C	30 segundos	

72° C	2 minutos	
72° C	10 minutos	1
4° C	infinito	1

Al final de la reacción se debe correr un gel de agarosa para verificar si se obtuvo el producto de PCR deseado.

- Si solamente se obtuvo una banda muy ligera de DNA, entonces se recomienda purificar del gel el fragmento.
- Si se obtuvieron múltiples bandas entonces se puede realizar un PCR anidado (ver manual).

Se recomienda realizar un Southern Blotting para confirmar que el producto sea efectivamente producto de la RACE.

El producto final de la PCR se deberá clonar con TOPO Cloning reaction para secuenciar posteriormente.

Amplificación de los extremos de cDNA

Amplificación del extremo 3'

Transcripción reversa

1. Emplear de 1 pg a 100 ng de RNA poli A+ en tubo de microcentrífuga, ajustar el volumen a 10 µl con agua DEPC y desnaturalizar a 75°C/5 minutos y luego poner en hielo.
2. Añadir

Buffer RT 5x	10	µl
DNTP's 20 mM	1.5	µl
Adaptor primer dT 10 µM	8	µl
Inhibidor de Rnasa 20 U/µl	1	µl
Transcriptasa reversa (100-200 U/µl)	1	µl
Agua DEPC cbp	50	µl

Incubar a 37°/60 min.
Usar tres controles negativos: uno sin RNA, otro sin transcriptasa, y el último sin primer.
3. Diluir la reacción anterior a un volumen final de 1 ml con buffer TE.

Amplificación

4. Colocar en tubos de 0.5 ml una serie de reacciones de PCR variando la concentración del cDNA. Usar un control sin cDNA.

cDNA diluido	0-20	µl
Buffer de amplificación 10x	5	µl
dNTP's 20 mM	5	µl
Adaptor primer dT 10 µM	1.6	µl
Adaptor primer 10 µM	3.2	µl
Oligo específico 3'	3.2	µl
DNA polimerasa (1 ó 2 U)	1	µl
Agua cbp	50	µl
5. Cubrir las reacciones con 50 µl de aceite mineral y amplificar en termociclador con el siguiente programa

5min/94°	5min/55°	40min/72°	1 ciclo
40seg/94°	1min/55°	3min/72°	30 ciclos
40seg/94°	1min/55°	15min/72°	1 ciclo

Tiempo Infinito/4°
6. Analizar el resultado de la reacción anterior en un gel de agarosa. Si no hay producto visible, añadir más polimerasa y continuar 15 a 20 ciclos más; o reamplificar alcuotas de la reacción.
7. Remover el aceite mineral de las muestras purificando con 150 µl cloroformo.

Clonar en vector y células competentes.

Amplificación del extremo 5'

Transcripción reversa

1. Emplear de 1 pg a 100 ng de RNA poli A+ en tubo de microcentrífuga, ajustar el volumen a 10 µl con agua DEPC y desnaturalizar a 75°C/5 minutos y luego poner en hielo.
2. Añadir

Buffer RT 5x	4 µl
DNTP's 20 mM	1 µl
Oligo específico 5' 10 µM	4 µl
Inhibidor de RNasa 20 U/µl	1 µl
Transcriptasa reversa (100-200 U)	1 µl
Agua DEPC cbp	20 µl

Incubar a 37°/60 min.

Usar tres controles negativos: uno sin RNA, otro sin transcriptasa, y el último sin primer.

Purificación del producto de RT

3. Remover el exceso de oligonucleótidos diluyendo la reacción anterior en 2 ml de agua y luego microconcentrar centrifugando a 2000-3000 rpm (500 a 1100 g) por 20 minutos a temperatura entre 4 y 25°C.

Repetir la dilución y centrifugar de nuevo.

Transferir a un tubo de 0.5 ml y reducir el volumen a 10 µl en un evaporador rotacional de vacío.

⇒ Alternativamente se puede precipitar dos veces con acetato de amonio 2.5M y 3 vols de etanol.

4. Añadir al cDNA en vol de 10 µl

Buffer 5x transferasa terminal	4 µl
dATP 1 mM	4 µl
Transferasa terminal	10-25 unidades
5. Inactivar la transferasa terminal calentando 3 minutos a 80°C. Diluir a 1 ml con buffer TE.

Amplificación

6. Colocar en tubos de 0.5 ml una serie de reacciones de PCR variando la concentración del cDNA. Usar un control sin cDNA,

cDNA diluido	0-20 µl
Buffer de amplificación 10x	5 µl
dNTP's 20 mM	5 µl
Adaptor primer dT 10 µM	1.6 µl
Adaptor primer 10 µM	3.2 µl
Oligo específico 5'	3.2 µl
DNA polimerasa (1 ó 2 U)	1 µl
Agua cbp	50 µl

-
7. Cubrir las reacciones con 50 μ l de aceite mineral y amplificar en termociclador con el siguiente programa

5min/94°	5min/55°	40min/72°	1 ciclo
40seg/94°	1min/55°	3min/72°	30 ciclos
40seg/94°	1min/55°	15min/72°	1 ciclo
Tiempo infinito/4°			

8. Analizar el resultado de la reacción anterior en un gel de agarosa. Si no hay producto visible, añadir más polimerasa y continuar 15 a 20 ciclos más; o reamplificar alícuotas de la reacción.
8. Remover el aceite mineral de las muestras purificando con 150 μ l cloroformo.
9. **Clonar** en vector y células competentes.

RT-PCR Cuantitativa

RNA Amplification Kit (2015137; Roche)

Equipo

Termociclador Light Cycler (Roche, Alemania)
LightCycler-RNA amplification kit SYBR green (Roche)

1. Preparar la siguiente reacción en tubos capilares especiales para el equipo empleado

Mezcla de reacción	4 μ l
Solución de resolución	2 μ l
Mezcla de oligonucleótidos (0.5mM)	2 μ l
Mezcla de enzima (RT-PCR)	0.4 μ l
Cloruro de magnesio 25mM	1 μ l
RNA total	500 ng
Agua	cbp 20 μ l
2. Centrifugar para bajar y mezclar los ingredientes de la reacción
3. Poner los capilares en el rotor
4. Amplificar en termociclador

Condiciones de amplificación

Transcripción reversa 55 °C/10 min;
Desnaturalización 95 °C/30 seg;
Amplificación
40 ciclos de 95 °C/10 seg
60 °C/15 seg
72 °C/35 seg

Desnaturalización a 0.1 °C/seg
95 °C/2 seg
65 °C/15 seg
95 °C/10 seg

Enfriamiento 35 °C/30 seg

Las lecturas del amplificado fueron realizadas durante la extensión de cada ciclo de amplificación y durante la tercera parte de la desnaturalización.

Importante: Antes de comenzar a correr la muestra de interés debe realizarse una curva estándar amplificando cantidades conocidas de DNA (ver manual del usuario del Termociclador Light Cycler, Roche).

**Transformación de células competentes
E. coli X-L Blue**

1. Poner 5 μ l (200 ng) del DNA ligado al vector de interés en 50 μ l de células competentes *E. coli* XL-Blue
2. Incubar 30 minutos en hielo
3. Incubar 3 minutos a 42 °C
4. Incubar 3 minutos en hielo
5. Añadir a la reacción 500 μ l de medio Luria-Broth estéril
6. Incubar 30 minutos a 37 °C en agitación
7. Sembrar de 80-120 μ l de medio en cajas de medio Agar-LB con ampicilina
8. Incubar a 37 °C durante no más de 20 horas
9. Seleccionar las clonas positivas

Clonación en vector y células TOPO (TOPO TA Cloning Kit for Sequencing, Invitrogen)

Material extra no incluido en el kit:

- Baño maría a 42° C
- Cajas de medio LB con 50-100 µg/ml de ampicilina o 50 µg/ml de kanamicina (dos por transformación)
- Incubadoras a 37° C con y sin agitación

Preparación

- Se necesitará un vial de células competentes y dos cajas de cultivo por cada transformación
- Equilibrar el baño maría a 42° C
- Poner el vial de medio SOC de la caja 2 a temperatura ambiente
- Poner las cajas de cultivo a 37° C por 30 minutos
- Descongelar en hielo los viales de células competentes

Ligación

Preparar la siguiente reacción

Producto fresco de PCR	0.5 a 4 µl
Solución salina	1 µl
Agua estéril	<u>cbp 5 µl</u>
TOPO vector	1 µl

1. Mezclar e incubar 5 minutos a temperatura ambiente (para productos de más de 1 kb se puede incrementar el tiempo hasta 30 minutos).
2. Poner en hielo o dejar a -20 °C toda la noche.

Transformación

1. Colocar 2 µl de la reacción anterior en un vial de células competentes y mezclar pero no por pipeteo.
2. Incubar en hielo 5 a 30 minutos
3. Colocar a 42 °C por 30 segundos sin agitar.
4. Inmediatamente poner los tubos en hielo.
5. Agregar 250 µl de medio SOC a temperatura ambiente.
6. Tapar el tubo y ponerlo horizontalmente para agitarlo (200 rpm) a 37 °C por una hora.
7. Rociar 10 a 50 µl de cada transformación en una caja de cultivo e incubar a 37 °C toda la noche. Se recomienda colocar en los medios de cultivo dos volúmenes diferentes de células transformadas para asegurar que las colonias estén bien espaciadas.
8. Una reacción eficiente produce cientos de colonias. Tomar aprox. 10 colonias (blancas) para el análisis.

Análisis de clonas positivas

1. Tomar 10 colonias y cultivarlas toda la noche en medio LB o SOB con 50 a 100 µg/ml de ampicilina o 50 µg/ml de kanamicina.
2. Aislar el plásmido de DNA.
3. Digerir el plásmido con EcoRI y proceder a secuenciar (ver mapa del vector).

Purificación de DNA con fenol-cloroformo

1. Iniciar con 100-200 μ l de volumen (de ser necesario, adicionar agua estéril)
2. Añadir a la muestra de DNA 1 volumen de fenol:cloroformo (1:1) y mezclar por inversión 3v.
3. Centrifugar a 12000 rpm durante 10 minutos
4. Tomar la fase superior en un tubo nuevo sin tocar la interfase
5. Agregar 2 volúmenes de etanol frío (-20°C) y 1/10 de acetato de sodio 3M
6. Agitar y colocar a -20°C durante 30 minutos
7. Centrifugar a 12000 rpm durante 10 minutos y decantar
8. Lavar la pastilla con 300-500 μ l de etanol al 70%
9. Centrifugar a 12000 rpm durante 10 minutos y decantar
10. Lavar la pastilla con 100 μ l de etanol al 100%
11. Centrifugar a 12000 rpm durante 10 minutos
12. Dejar secar la pastilla a 37°C durante 10 minutos
13. Resuspender en agua estéril

Purificación de DNA de gel (Kit de Concert)

1. Correr el DNA a purificar en un gel de agarosa.
2. Cortar el área del gel con el DNA de interés con una navaja limpia.
3. Pesar el gel (debe ser de menos de 400 mg): para geles de agarosa de <2%, adicionar 30 μ l del buffer L1 (de solubilización del gel) por cada 10 mg de gel.
4. Incubar a 50° C durante 15 minutos mezclando cada 5 minutos. Posterior a que el gel esté completamente disuelto, incubar 5 minutos más.
5. Colocar una columna (spin cartridge) en un tubo de lavado, pipetear la mezcla del paso anterior dentro de la columna y centrifugar a 12 000 x g durante 1 minuto. Desechar el líquido.
6. Lavado opcional: colocar la columna en el tubo de lavado y adicionar 500 μ l del buffer L1, incubar a temperatura ambiente por 1 min. Centrifugar por 1 minuto a 12 000 x g.
7. Colocar la columna en otro tubo de lavado, adicionar 700 μ l del buffer de lavado L2. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente y centrifugar durante 1 minuto a 12 000 x g. Desechar el líquido y volver a centrifugar el mismo tiempo y velocidad para remover el buffer residual.
8. Eluir el DNA con 50 μ l de agua estéril a 65-70° C, puesto directamente en el centro de la columna. Incubar 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugar durante 2 minutos a 12 000 x g.
9. Correr 1 μ l en un gel para verificar la integridad del DNA.

Purificación de DNA de plásmido (Miniprep)

1. Tomar la clona de interés e inocularla en 2-5 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml) y dejar crecer a 37 °C toda la noche en agitación
2. Centrifugar 2 ml de bacterias a 12000 rpm durante 10 min
3. Resuspender el pellet en 300 µl de TENS
4. Agregar 5 µl de RNasa A (10mg/ml)
5. Incubar 5 min a temperatura ambiente
6. Agregar 150 µl de acetato de sodio 3M pH 5.2 y mezclar por inversión
7. Centrifugar 2 minutos a 12 000 rpm
8. Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo
9. Agregar 900 µl etanol 100% (-20°C) y mezclar
10. Centrifugar 2 min a 12 000 rpm y eliminar sobrenadante
11. Lavar con 400 µl de etanol al 70%
12. Centrifugar a 12000 rpm durante 10 minutos
13. Dejar secar la pastilla
14. Resuspender el DNA en agua estéril

Purificación de DNA de plásmido (Maxiprep, Qiagen)

1. Inocular 100-500 μ l de bacterias de la clona de interés en 200 ml de medio LB con ampicilina (100 μ g/ml) en un matraz Erlenmeyer de 1 lt.
2. Dejar en agitación a 37° C toda la noche.
3. Centrifugar el medio a 4° C, 10 000 rpm durante 10 minutos. Drenar el medio.
4. Resuspender el botón en 10 ml de buffer P1 c/RNasa (100 μ g/ml) pipeteándolo. No dejar grumos.
5. Añadir 10 ml de buffer P2 (chechar que no esté precipitado el SDS, si es necesario, disolverlo a 37° C). Mezclar por inversión de 4-6 veces. Incubar a temperatura ambiente por 5 min exactos. Durante este tiempo, preparar el Qiafilter: atornillar la tapa en la salida de la boquilla del cartucho, colocar el cartucho de manera que esté siempre vertical.
6. Añadir 10 ml de buffer P3 a 4° C al lisado y mezclar inmediatamente por inversión 4-6 veces. Pasar al siguiente paso rápidamente.
7. Pasar el lisado en el tonel del cartucho Qiafilter. Incubar a temperatura ambiente por 10 min sin insertar el émbolo. Mientras, equilibrar un Qiagen tip añadiendo 10 ml del buffer QBT y permitir que se vacíe por gravedad.
8. Remover la tapa del Qiafilter. Insertar suavemente el émbolo en el cartucho y filtrar el lisado en el Qiagen tip previamente equilibrado.
9. Pasar el lisado a través de la resina por gravedad.
10. Lavar el Qiagen tip con 30 ml del buffer QC 2 veces. Permitir que pase sólo por gravedad.
11. Eluir el DNA con 15 ml del buffer QF. Colectarlo en un tubo de 50 ml.
12. Precipitar el DNA añadiendo 10 ml de isopropanol a temperatura ambiente. Mezclar y centrifugar a 16 000 g por 45 min a 4° C. Decantar rápidamente.
13. Lavar el botón con 5 ml de etanol al 70% y centrifugar a 15 000 x g por 15 minutos, a 4° C. Decantar cuidadosamente.
14. Lavar el botón con etanol absoluto, sin resuspender. Centrifugar a 15 000 g por 15 minutos, a 4° C. Decantar cuidadosamente.
15. Secar la pastilla a 37° C por aprox. 10 minutos. Resuspender el DNA en 100 μ l de agua estéril. Leer en el espectro a 260 de longitud de onda, las unidades se deben multiplicar por el factor de dilución y por 50 (constante para el DNA), el resultado son los μ g de DNA/ml. Allicuotar y almacenar en congelación.

Electroforesis en geles de agarosa

Electroforesis para DNA

1. Gel de agarosa al 1%:
2. En 30 ml de buffer TBE agregar 0.30 gr de agarosa
3. Hervir (aprox. 35 seg en horno de microondas)
4. Agregar 16 ul de Bromuro de Etidio (0.5 mg/ml)
5. Colocar la mezcla en el molde y se deja secar por 20-30 minutos
6. Aplicar las muestras en un volumen de 10 ul, con jugo azul 1x
7. Correr las muestras en el gel a 80 volts por 30-45 minutos
8. Observar en transiluminador. Es posible visualizar 200 ng de DNA en el gel.
9. Fotografiar con: tiempo de exposición 1 y apertura 8 ó 5.4

Electroforesis para RNA (condiciones desnaturalizantes)

Antes de usar el aparato de electroforesis, debe lavarse de la siguiente manera:

1. Lavar con SDS 0.5% en agua DEPC (c/gasa).
2. Enjuague con agua DEPC
3. Enjuague con H₂O₂ 3% en agua DEPC
4. Enjuague con agua DEPC
5. Enjuague con etanol absoluto
6. Dejar secar

Preparación del gel agarosa/formaldehído (p/30ml):

Agarosa	0.3 gr
Agua	21.6 ml
MOPS 10x	3 ml
Hervir hasta solubilizar y agregar	
Formaldehído 12.3M	5.4 ml
Colocar en el molde y dejar enfriar	

Buffer de corrida :

MOPS 10x	22 ml
Formaldehído 12.3M	13.2 ml
Agua DEPC	184.8 ml

Preparación de la muestra :

Agua + RNA	5 μ l (2-5 μ g)
MOPS/FA	5 μ l (MOPS 10x 20 μ l + FA 32 μ l + Agua 8 μ l)

Calentar a 65° C por 5 minutos y poner en hielo.

Agregar :

Sol. Ficol/BBP	2 μ l (loading buffer)
Bromuro de etidio	1 μ l (1 μ g/ μ l)

Centrifugar 10 segundos

Colocar la muestra en el gel y correr a 80 volts por 30-45 minutos

Observar en transiluminador

Fotografiar

- El gel al 1% es conveniente para moléculas de RNA de 500 pb - 10 kb, un porcentaje mayor es para moléculas más pequeñas.
- Las condiciones desnaturalizantes del gel son necesarias para que el RNA se separe adecuadamente, pues tiende a formar estructuras secundarias.

Solución Ficol/BBP

30 μ l	Ficol
10 μ l	Azul de bromofenol saturado

Buffer MOPS 10x

20g	MOPS
25ml	Acetato de Na 1M, pH 6
10ml	EDTA 0.5 M, pH 8
450 ml	Agua

Ajustar a pH 7 con NaOH (10 N) y guardar protegido de la luz.

Digestión enzimática del DNA

- Se emplean enzimas de restricción que generalmente se encuentran a 10 U/ μ l.
- En promedio se requiere: 3U de enzima/ μ g de DNA a cortar, evitando que la cantidad de enzima en la reacción sea mayor del 10% del volumen final, porque contiene glicerol, que puede inhibir la reacción.
- Para preparar la reacción se deben colocar los reactivos en un tubo de 500 μ l en el siguiente orden:
 1. H₂O
 2. Buffer (10x)
 3. DNA
 4. Enzima de restricción
- La reacción se incuba durante 2 hrs en baño maría a 37° C.
- Al final se recomienda correr un gel, para asegurarnos que la reacción ya se haya llevado a cabo completamente, y descartar digestiones parciales.

Ligación de DNA

Para optimizar la reacción de ligación es necesario hacer varias reacciones con diferentes relaciones molares del vector y el inserto de interés (1:6, 1:12, 2:12...)

Nunca olvidar el control negativo, empleando el vector sin inserto.

El volumen total es de 20 μ l, se usa 1 μ l de T4 ligasa por reacción (1 U/ μ l).

El orden para colocar los reactivos en el vial es el siguiente:

1. Vector
2. Inserto
3. Buffer 10X
4. Agua
5. Ligasa T4

La reacción debe dejarse toda la noche a 16° C si se trata de ligar extremos cohesivos, para que la unión sea más específica. En cambio, si se están ligando extremos romos, se usa a 37° C.

Northern Blot

Objetivo:

- Determinar la cantidad y peso molecular de un RNA mensajero específico en una preparación de RNA total.

La muestra de RNA es transferida y fijada a una membrana de nylon y posteriormente incubada bajo condiciones que favorecen su hibridación con una sonda específica de DNA (o RNA) marcada para localizar al mensajero en cuestión.

Procedimiento

1. Gel de RNA.
2. Transferencia del gel de RNA a una membrana de nylon.
3. Preparación y marcaje de la sonda de DNA.
4. Hibridación de la membrana.
5. Lavado.
6. Autorradiografía.

I. Gel de RNA

Emplear al menos 20 μg de RNA_{total} o 5 μg de RNA_m para correr un gel de agarosa 1% bajo condiciones desnaturalizantes (MOPS y Formaldehído). Es importante dejar correr el RNA hasta tres cuartas partes del gel a 80 volts para que la muestra se separe perfectamente y sean visibles las diferentes bandas de RNA.

Al final se equilibra el gel en buffer TBE 0.5x durante 10 ó 15 minutos.

II. Transferencia del gel de RNA a una membrana de nylon

Todo el manejo y manipulación de la membrana de hibridación, filtros y muestras deberá realizarse en condiciones libres de RNAsas, utilizando guantes limpios y pinzas.

1. Cortar una membrana de nylon (Z-Probe o Hybond) del tamaño exacto del gel que se va a transferir y marcar un extremo con lápiz como referencia para saber de qué lado será transferido el RNA.
 2. Cortar al menos 2 filtros de papel de 3 mm de espesor del mismo tamaño del gel.
 3. Lavar el gel en 0.2 N NaOH ó 0.5 M NaCl durante 30 minutos y neutralizar en buffer de transferencia (TBE 0.5x) dos veces durante 10 minutos.
 4. Humedecer los filtros y la membrana en buffer de transferencia.
 5. Colocar sobre la base de la cámara para transferencia (Tran-Blot SD) uno de los filtros, sobre éste irá la membrana, el gel y un segundo filtro; se deberá cuidar que no se formen burbujas entre las diferentes capas eliminándolas con una pipeta o tubo empleado a manera de rodillo.
 6. Colocar la tapa de la cámara para transferencia y encenderla a 5.5 mA/cm² con 15 volts (no más de 25 volts) durante 15 a 25 minutos.
 7. Fijar el RNA a la membrana ya sea por medio de luz UV (en un transiluminador con el RNA hacia abajo, durante 2 a 5 minutos a 312 nm) o por medio de calor (en buffer de transferencia a 80°C durante 30 min). La membrana se almacena seca en un sobre de papel filtro o en una bolsa de plástico.
-

III. Preparación y marcaje de la sonda de DNA

Se recomienda usar sondas de 200 a 1000 pb, la concentración de la sonda en la mezcla de hibridación deberá dar 10^6 cpm/ml (10-50 ng de sonda/ml), la actividad específica de la sonda deberá ser 10^8 cpm/ μ g.

Es importante confirmar la pureza de la sonda antes de ser marcada (se recomienda el empleo de kits como las columnas para purificar fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa -Concert Gel Extraction-).

El marcaje de la sonda se inicia con 25 ng de DNA aprox., mismo que es desnaturizado a 96°C durante 3 minutos y enfriado inmediatamente en hielo, entonces se sigue el protocolo de "Random Primer Labeling Kit", en este procedimiento se forma nuevo DNA a partir del DNA de la sonda inicial empleando una DNA-polimerasa (Klenow) y una mezcla de hexanucleótidos uno de ellos marcado radiactivamente (dATP P^{32}). La reacción se incubaba a 37°C durante 30 minutos a toda una noche.

La sonda marcada se purifica con una columna (Quick Spin Column, Sephadex G50) para eliminar los nucleótidos no incorporados y obtener únicamente el DNA marcado:

1. Tomar la columna e invertirla varias veces para resuspender el medio.
2. Quitar la tapa de arriba y luego la de abajo, manteniendo la columna siempre en posición vertical.
3. Poner la columna en un tubo colector dentro de un tubo Falcon de 15 ml y centrifugar 1100 g/2 min. Descartar el buffer eluido.
4. Manteniendo la columna en posición vertical, pipetear en el centro la muestra de DNA en un volumen de 100 μ l (con agua estéril). Poner un tubo colector nuevo.
5. Centrifugar a 1100 g/4 min.
6. El líquido eluido contiene la sonda marcada de DNA.

Siempre que se trabaje con radiactividad se deberá usar guantes y mamparas de acrílico, así como un contador Geiger para detectar cualquier contaminación de sustancias radiactivas al lugar de trabajo.

Tomar una muestra de la sonda marcada (2 μ l en 5 ml de líquido de centelleo) para contar el número de centelleos por minuto y calcular la cantidad de sonda que se empleará para hibridar.

IV. Hibridación de la membrana

1. Humedecer la membrana en SSC 6x y colocarla en un tubo de hibridación, cuidar que la cara en donde se transfirió el RNA quede hacia arriba y que la membrana se adhiera perfectamente a la pared del tubo sin que se formen burbujas.
 2. Agregar al tubo 1 ml de solución de hibridación por cada 10 cm^2 de superficie de la membrana y prehibridar durante 2 hrs (0.5-24 hrs) a 42°C .
 3. Desnaturizar la sonda marcada a 100°C durante 10 minutos y enfriar rápidamente en hielo.
 4. Pipetear el volumen deseado de sonda en el tubo de hibridación y dejar hibridando toda la noche a 42°C .
-

V. Lavado de la membrana

1. Poner un volumen de 2x SSC/0.1% SDS agitar y descartar el líquido, repetir la operación una vez más.
2. Poner un volumen mayor (1/3 de la capacidad del tubo) de 2x SSC/0.1% SDS e incubar 5 minutos y descartar el líquido y repetir el procedimiento.
3. Lavar dos veces con 1x SSC/0.1% SDS con mismo volumen que en el caso anterior e incubando 10 minutos.
4. Lavar cuatro veces con 0.1x SSC/0.1% SDS e incubar 5 minutos cada vez.
5. Al finalizar el último lavado envolver la membrana húmeda en plástico SaranWrap, de manera que no escurra o salga líquido.

VI. Autorradiografía

Exponer la membrana a una película (Storage Phosphor Screen) para autorradiografía durante toda la noche y escanear en el STORM para ver el resultado.

Soluciones

TBE 5x

0.5 M	Ácido bórico	96.9 g/l
0.5 M	Tris	32.8 g/l
10 mM	EDTA	7.45 g/l

SSC 20x

3 M	NaCl	175 g/l
0.3 M	Citrato trisódico	88 g/l

SDS 20%

20%	Dodecil sulfato de sodio	200 g/l
-----	--------------------------	---------

Solución Denhardt 50x

1%	Albúmina sérica bovina	1 g/100 ml
1%	Polivinilpirrolidona	1 g/100 ml
1%	Ficoll	1 g/100 ml

Solución de hibridación

5x	SSC	25 ml SSC 20x/100 ml
5x	Solución Denhardt	10 ml S.Denhardt 50x/100ml
50 %	Formamida	50 ml Formamida/100 ml
1 %	SDS	5 ml SDS 20x
100µg/ml	DNA de espermatozoos de salmón *	

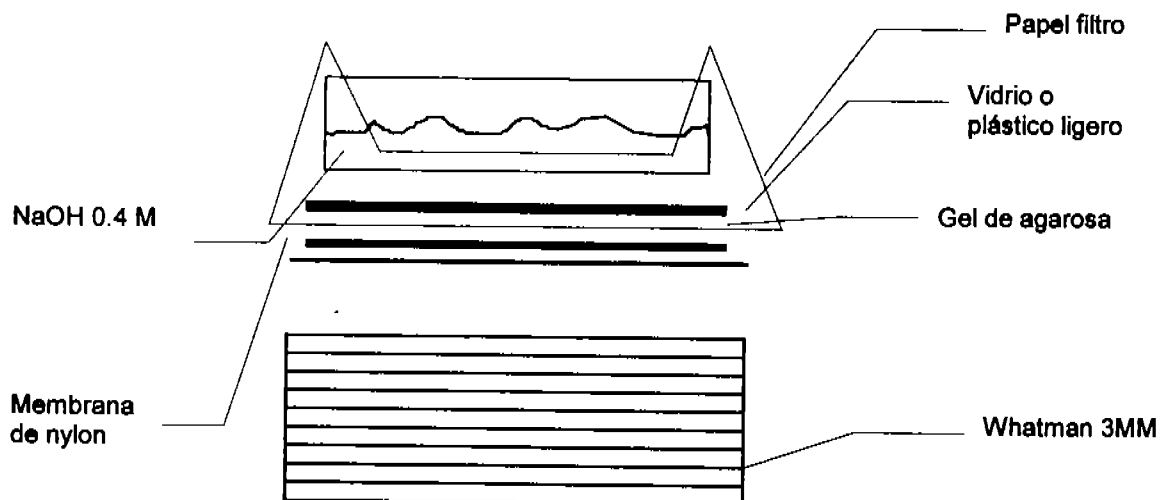
*Agregarse al momento de usar (100 µl de DNA a concentración de 10 mg/ml en 900 ml de agua libre de RNAsas).

Southern Blot

Correr en un gel de agarosa el DNA que interesa hibridar y tomar una fotografía para observar al final la banda que hibridó.

Transferencia del DNA del gel a la membrana de nylon

1. Usar guantes siempre, para evitar ensuciar la membrana, pues interferiría con la transferencia. Enjuagar los guantes con agua, para quitarles el talco.
2. Cortar aprox. 10 rectángulos de papel Whatman 3 MM del mismo tamaño del gel, así como una membrana de nylon (Zeta-probe blotting membrane, Bio-Rad) y dos tiras largas de papel filtro uno del largo y otro del ancho del gel.
3. La membrana de nylon se prehumedece en agua destilada, después se pasa a NaOH 0.4 M y se coloca en una charola sobre una cama con las 10 capas de papel Whatman.
4. Sobre la membrana de nylon se coloca el gel de agarosa con el DNA que se va a transferir.
5. Humedecer en el NaOH 0.4 M las tiras de papel filtro, colocarlas sobre el gel por su porción central dejando colgar los extremos y pasar por encima una pipeta a manera de rodillo para evitar que se formen burbujas.
6. Encima colocar un vidrio o plástico ligero del tamaño y forma del gel.
7. Sobre el plástico colocar una charola de la misma forma con solución de NaOH 0.4 M.
8. Introducir los extremos del papel filtro en la solución de NaOH 0.4 M y dejar que se difunda la solución hacia el gel.



-
9. Dejar que se transfiera el DNA a la membrana durante toda la noche a temperatura ambiente.
 10. Retirar la membrana (no olvidar marcar con lápiz los pocillos y el frente del gel), lavar con agua y secar al aire sobre papel filtro.
 11. Guardar la membrana en un sobre de papel filtro o en una bolsa de plástico en refrigeración.

Elaboración de la sonda marcada de DNA con ^{32}P

(Kit Random primer DNA labeling, Boeringer)

1. Desnaturalizar el DNA que será empleado para sintetizar la sonda marcada (aprox. 100 ng) en un volumen total de 10 μl , a 96° C por 3 minutos y colocar en hielo
2. Hacer la siguiente mezcla :

dCTP	1 μl
dTTP	1 μl
dGTP	1 μl
Primer mix	2 μl (hexanucleótido aleatorio)
dATP $\alpha^{32}\text{P}$	4 μl
Klenow	1 μl (Agregar al final)
3. Mezclar con el DNA desnaturalizado e incubar a 37° C toda la noche.

Para purificar el DNA marcado se emplean las columnas de Sephadex Quick spin (Boehring). La metodología es la siguiente:

1. Dejar la columna a temp. amb., mezclar por inversión varias veces.
2. Remover la tapadera de arriba y luego la de abajo, dejar pasar el buffer por gravedad (la columna debe estar SIEMPRE vertical).
3. Colocar la columna dentro de un tubo colector con agujeros y ambos dentro de un Falcon de 15 ml. Centrifugar a 1,100g por 2 min (2.6 rpm) en centrífuga de columpio. Decantar el buffer eluido. Colocar la columna en otro tubo colector nuevo.
4. Poner el DNA marcado (en un volumen de 100 μl) en el centro de la columna.
5. Centrifugar a 1,100 g por 4 min.
6. Colectar el líquido eluido que contiene la sonda marcada.

Hibridación del DNA en la membrana

1. Pegar la membrana prehumedecida en la solución 2 dentro del frasco propio del horno de hibridación. Cuidar que la cara a hibridar de la membrana quede hacia el interior del frasco.
 2. Incubar por 30 minutos a 65° C con la solución de prehibridación (15 ml).
 3. Mientras, desnaturalizar la sonda (94° C, 3 minutos e introducir inmediatamente en hielo durante 2 minutos) y diluirla en 8 ml de solución de prehibridación. Usar
-

inmediatamente. La cantidad de radioactividad a usar es 1-4x10⁶ cpm/ml de solución de prehibridación.

4. Decantar el líquido del frasco donde está la membrana y agregar los 8 ml de la solución de prehibridación que contiene la sonda. Dejar girando toda la a 65 °C.
5. Al día siguiente: decantar el líquido en el bote de residuos radiactivos, hacer 2 enjuagues con 10 ml de solución 1 precalentada a 65 °C y decantar.
6. Lavar 2 veces la membrana con solución 1 a 65° C durante 1 hora.
7. Decantar y lavar la membrana con solución 2 precalentada durante 1 hora.
8. Secar la membrana sobre papel filtro.y cubrirla con plástico adherente.
9. Poner la membrana hibridada en contacto con una placa fotográfica para rayos X o bien con la pantalla del Storm.

Solución de prehibridación

1 mM	EDTA
0.5 M	Na ₂ HPO ₄ pH 7.2,
7%	SDS

Solución 1

1 mM	EDTA
40 mM	Na ₂ HPO ₄ pH 7.2
5%	SDS

Solución 2

1mM	EDTA
40 mM	Na ₂ HPO ₄
1%	SDS

Hibridación *in situ* Cortes adheridos a portaobjetos

Preparación del tejido

1. Recolectar muestras de tejido y cortar en cubos pequeños (5 mm aprox.)
2. Fijar en paraformaldehído 3.5% en PBS varios días.
3. Colocar los tejidos en PBS/Sacarosa 10%, y dejar que sedimenten.
4. Colocar los tejidos en PBS/Sacarosa 20%, y dejar que sedimenten.
5. Colocar los tejidos en PBS/Sacarosa 30%, y dejar que sedimenten.
6. Colocar los tejidos en PBS/Sacarosa 30%/Tissue Tek O.C.T. 1:1 por 30 minutos en rotación.
7. Montar los cortes en Tissue Tek O.C.T. y congelar en hielo seco. Guardar a -70°C en recipiente hermético.
8. Hacer cortes en criostato de 20 μm de espesor y adherir en portaobjetos (Superfrost slides).
9. Dejar los portaobjetos en congelador a -20°C toda la noche.
10. Poner portaobjetos 20 minutos a temperatura ambiente y empezar la hibridación.

Importante: Mientras se fija el tejido preparar la sonda de RNA marcada con digoxigenina utilizando RNA Polimerasa T3 y T7, y purificar en columna Sephadex G50, y correr una alícuota en gel de agarosa para verificar la pureza de la sonda.

Hibridación

Realizar los siguientes lavados e incubaciones:

Solución	# Veces	Tiempo (min)	Temperatura
PBT	2	8	Ambiente
Metanol 50%/PBT	1	3	Ambiente
Metanol 100%/PBT	2	3	Ambiente
Metanol 66%/PBT	1	3	Ambiente
Metanol 50%/PBT	1	3	Ambiente
Metanol 33%/PBT	1	3	Ambiente
PBT	2	5	Ambiente
PBT/Mezcla Hib 1:1	1	5	Ambiente
Mezcla Hibridación	1	5	Ambiente
Mezcla Hibridación	1	60	65°C en cámara de formamida 50%
Mezcla Hib/sonda*	1	Toda la noche	65°C

* Mezcla Hib/sonda: por cada portaobjetos

1. Calentar 500 μ L de mezcla de hibridación a 70° C
2. Agregar 2 a 4 μ L de sonda
3. Calentar la mezcla a 68° C/10 min.
4. Poner 2 minutos en hielo
5. Colocar sobre un portaobjetos.

Anticuerpo

Realizar los siguientes lavados e incubaciones para agregar el anticuerpo:

Solución	# Veces	Tiempo	Temperatura
Mezcla de hibridación	2	10	Solución a 65° C
Mezcla de hibridación	2	45	Solución a 65° C
TBST/Mezcla de Hib.	1	10	Solución a 65° C
TBST	2	15	Ambiente en cámara húmeda
Solución de bloqueo 1x	1	60	Ambiente
Anticuerpo*	1	Toda la noche	4° C

*Anticuerpo: por cada portaobjetos

1. 250 μ L solución de bloqueo + 1 μ L anticuerpo
2. Agitar 1 hora a 4° C
3. Diluir a 1 ml con TBST
4. Poner sobre el portaobjetos

Revelado

Realizar los siguientes lavados e incubaciones para agregar el anticuerpo:

Solución	# Veces	Tiempo	Temperatura
TBST	2	10	Ambiente
TBST	2	45	Ambiente
NTMT	2	10	Ambiente
Solución reveladora*	1	Toda la noche	Ambiente en cámara oscura

* Solución reveladora: para dos portaobjetos

- 1.5 ml NTMT
- 3.5 μ L BCIP
- 4.5 μ L NBT

Lavado final

Solución	# Veces	Tiempo	Temperatura
PBT	3	5	Ambiente

Montar en Glicerol al 90%, colocar cubreobjetos y sellar con esmalte de uñas.

Soluciones

Mezcla de hibridación

Solución Stock	Conc. Final	Total 300 ml.
Formamida	50%	150 ml
SCC (20x pH 4.5 ác. Cítrico)	1.3 x	19.5 ml
EDTA (0.5 M, pH 8)	5 mM	3 ml
RNA levadura (20 mg/ml)	50 µg/ml	750 µl
Tween 20 (10%)	0.2 %	6 ml
CHAPS (10%)	0.5 %	15 ml
Heparina (50 mg/ml)	100 µm/ml	600 ml
Agua		105 ml

TBST

	1 litro	1 litro
NaCl	8 g	27.4 ml de 5M
KCl	0.2 g	2.7 ml de 1M
1 M Tris-HCl pH 7.5	25 ml	25 ml
Tween 20	11 g	11 g
Agua	Aforar a 1 litro	Aforar a 1 litro

NTMT

	10 ml	50 ml
NaCl 5M	0.2 ml	1 ml
Tris-HCl pH 9.5 2M	1 ml	5 ml
MgCl ₂ 2M	0.5 ml	2.5 ml
Tween-20 10%	1 ml	5 ml
Agua	7.3 ml	37.5ml

Ensayo enzimático para β CO

Purificación de proteína S9

1. Lavar el tejido con NaCl al 0.9% y tomar aprox. 2 gr de tejido.
2. Homogenizar el tejido en 20 ml de buffer de fosfato*
3. Centrifugar a 9000 x g durante 20 minutos
4. Obtener el sobrenadante (S9), allicuotarlo y guardarlo a -20 °C

*Buffer de fosfato (pH 7.7)

100 mmol/l	Fosfato de potasio
4 mmol/l	Cloruro de magnesio
30 mmol/l	Nicotinamida
1 mmol/l	Dithitritol

Cuantificación de la proteína por el método de Bradford

Preparar el reactivo de Bradford con los siguientes reactivos

100 mg	Coomasie Brilliant Blue G-250
50 ml	etanol (95%)
100 ml	ácido fosfórico

Aforar a 1 lt y agitar hasta que no quede colorante sin entrar en solución

Filtrar con papel Whatman

Técnica

1. Para realizar la curva estándar preparar por duplicado tubos con 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 μ l de proteína (albúmina*)
2. Llevar el volumen a 200 μ l con PBS y mezclar
3. Agregar 5 ml de reactivo de Bradford y mezclar
4. Leer en espectrofotómetro a 595 nm antes de 1 hr.
5. El blanco se prepara con 200 μ l de PBS y 5 ml de Bradford
6. Para leer las muestras colocar 100 μ l del extracto proteico más 100 μ l de PBS y 5 ml de reactivo de Bradford, mezclar y leer su concentración en el espectrofotómetro.

*Albúmina

1 mg/ml (0.010g/10 μ l), homogenizar a baño maría, allicuotar y congelar.

Ensayo enzimático

1. En un tubo de 50 ml cubierto con aluminio colocar:
 - 2 ml buffer de incubación
 - 2 mg proteína S9
 - 2.8 μ mol/l β -caroteno
2. Incubar durante 1 hora a 37 °C en un baño maría en agitación
3. Detener la reacción con 2 ml de etanol
4. Agregar un volumen de etanol para eliminar las proteínas
5. Extraer usando 2 volúmenes de hexano y pasar el sobrenadante a un tubo nuevo
6. Evaporar en atmósfera de nitrógeno
 - Reconstituir en
 - 200 μ l agua
 - 500 μ l acetónitrilo
 - 50 μ l formaldehído

-
7. Cuantificar el retinal formado en HPLC a 380 nm con columna TSK gel ODS-80 Ts C18 por fase reversa con una fase móvil de acetonitrilo:agua (90:10 v/v) con 0.1% de acetato de amonio.

Buffer de incubación

100 mM	Fosfato de potasio
2 mM	Cloruro de magnesio
15 mM	Nicotinamida
5 mM	Glutaciona
1.7 mM	Duodesil sulfato de sodio
6 mM	Ácido taurocólico
0.2 g/l	Fosfatidilcolina
120 mg/l	α -Tocoferol

Buffer de congelación

100 mM	Fosfato de potasio
4 mM	Cloruro de magnesio
30 mM	Nicotinamida
1 mM	Ditioneitol
50 mM	Cloruro de sodio