



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

**DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN DE β -CAROTENO-15,15'
OXIGENASA EN TRES ESPECIES DE RUMIANTES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

CARLOS JOVITO ALVAREZ ALONSO

ASESOR. Dr. ARMANDO SHIMADA MIYASAKA

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO

2009



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.

Con especial cariño a mi familia

que siempre me ha apoyado

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4 por brindarme la oportunidad de recibirme en sus aulas para poder llevar a cabo mis estudios profesionales.

A un gran Doctor y Profesor Emérito de la FESC, Tutor de esta tesis Dr. Armando Shimada Miyasaka.

A la Doctora Ofelia Mora Izaguirre por su valiosa asesoría y gran apoyo brindado en el Laboratorio de RuMeN, además de ser pilar fundamental en la elaboración de este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México campus Querétaro, Instituto de Neurobiología, en especial al Laboratorio A-03 de Biología Molecular.

A la Unidad de Proteogenómica en especial a la Dra. Anaid Antaramian y a la M en C Adriana González.

A la M en C Laura González por la atención brindada.

En general a todos mis compañeros del laboratorio A-03.

INDICE GENERAL

Resumen.	1
Abstract	3
I. Introducción.	4
II. Revisión de Literatura	6
2.1 Situación actual de la producción de bovinos, ovinos y caprinos.	6
2.1.1 Estimadores de importancia en el ganado ovino, bovino y caprino	7
2.2 Carotenoides.	9
2.2.1 Principales características de los carotenoides	10
2.2.2 Metabolismo de β -carotenos en el organismo animal e importancia de la enzima β CMO1	12
2.3 Mecanismos de acción de la enzima BCOM1	15
2.4 Retinoides	16
2.4.1 Receptores de Acido Retinoico	17
III. Justificación	19
IV. Hipótesis	19
V. Objetivos	20
5.1 General	20
5.2 Específicos	20
VI. Material y Métodos.	21
VII. Resultados	22
7.1 β CMO1 <i>Ovis aries</i>	23
7.2 β CMO1 <i>Capra hircus</i>	24
7.3 Alineación β CMO1 <i>Bos taurus</i> , β CMO1 <i>Ovis aries</i> β CMO1 <i>Capra hircus</i>	25
7.4 Alineamiento nucleótidos β CMO1 <i>Ovis aries</i> – β CMO1 <i>Capra hircus</i>	27
7.5 Secuencia de aminoácidos β CMO1	29

7.6 Alineación secuencia de Aminoácidos	29
7.7 Análisis estadístico PCR Cuantitativo	31
VIII. Discusión	33
8.1 Secuencia de cDNA para la enzima β CMO1 de ovinos y caprinos	33
8.2 Expresión de β CMO1	34
IX. Conclusiones	37
X. Técnicas empleadas	38
10.1 Purificación de RNA (RNeasy, Qiagen)	38
10.2 Transcripción Reversa (RT)	38
10.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR convencional)	39
10.4 Electroforesis en geles de agarosa	39
10.5 PCR Cuantitativo	41
10.6 Transformación de células competentes <i>E. coli</i> X-L Blue	42
10.7 Clonación en Vector TOPO (TOPO TA Cloning)	42
10.8 Digestión enzimática del DNA	43
10.9 Ligación del DNA	44
XI. Literatura citada	45

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Resumen de la Producción Nacional 2007	8
Cuadro 2. Resumen Nacional Población Ganadera 2007	8
Cuadro 3. Diferencias en la expresión de β CMO1.	32
Cuadro 4. Similitud β CMO1 <i>Ovis aries</i> con otras especies reportadas en el Gen Bank	35
Cuadro 5. Similitud β CMO1 <i>Capra hircus</i> con otras especies reportadas en el Gen Bank	35

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. Principales carotenoides y su estructura química	10
Figura 2. Metabolismo del β -caroteno en la célula	13
Figura 3. Ruptura central del β -caroteno por acción de la enzima BCMO1.	16
Figura 4. Formas estructurales que ocurren en retinoides y β -caroteno	17
Figura 5. Mecanismo de acción de retinoides	18

RESUMEN.

El β -caroteno es el principal precursor de la vitamina A en el organismo animal, los animales lo obtienen de los alimentos para luego metabolizarlo y almacenarlo. Los bovinos pueden acumular β -caroteno y otros carotenoides en tejido adiposo y por lo tanto presentar coloración amarilla en la grasa; mientras que los ovinos y caprinos aparentemente convierten todo el β -caroteno de la dieta en vitamina A, por lo que no presentan pigmentación amarilla de la grasa. En los rumiantes se ha visto que el β -caroteno proveniente de la ingesta, pasa intacto al intestino delgado donde se absorbe y una parte de este es convertido en vitamina A por acción de la enzima β -caroteno 15,15' oxigenasa. Esto puede significar que existen variaciones en la actividad enzimática de β -caroteno 15,15' oxigenasa a nivel tisular entre bovinos, ovinos y caprinos; o bien posibles diferencias en la secuencia de nucleótidos de la región codificante del gen de dicha enzima, o también distintos niveles en la expresión de β -caroteno 15,15' oxigenasa entre estas especies de rumiantes. Con el objetivo de obtener la secuencia de nucleótidos de la región codificante del gen de la 15,15'oxigenasa de ovinos y caprinos y comparar su expresión en hígado y duodeno con bovinos, se extrajo el RNA total a partir de tejido duodenal y hepático de dichas especies, posteriormente se obtuvo el DNA complementario por medio de la técnica de transcripción reversa. A partir del DNA complementario se realizó la técnica de PCR convencional mediante el uso de oligonucleótidos específicos basados en el gen β -caroteno 15,15' oxigenasa de *Bos taurus* (β CMO1 *Bos taurus* GenBank número de acceso DQ008469) para obtener las regiones codificantes de la β -caroteno 15,15' oxigenasa de ovino y caprino. Una vez obtenida la secuencia completa de la enzima de ovinos y caprinos se midió su expresión en estas especies comparándola con la de bovinos, esto mediante la prueba de PCR

cuantitativo (en tiempo real), usando para ello los cebadores sentido 5': ACGCTGCTGGAAATGTTCTC y el cebador antisentido 3': GGTCGATGATGTGGAGTGAG. Los resultados obtenidos nos muestran que la secuencia de nucleótidos de la enzima β CMO1 de *Ovis aries* corresponde en un 94% y la de *Capra hircus* corresponde en un 95% de similitud con respecto a la secuencia conocida de BCMO1 de *Bos taurus*. Por otro lado, respecto a los resultados obtenidos de la prueba de PCR cuantitativo muestran que la expresión del mensajero de la enzima β -caroteno 15,15' oxigenasa es mayor en tejido hepático para la especie ovina, mientras que para las especies bovina y caprina la expresión del RNAm para tal enzima es igual sin importar su origen ($P < 0.01$).

Palabras clave: β -caroteno-15,15'oxigenasa, β -caroteno, bovinos, ovinos, caprinos, cDNA, Vitamina A, grasa amarilla.

SUMMARY.

β -carotene is the main precursor of vitamin A in animals; they obtain it from feed and then it will be metabolized, stored or used. Bovines can accumulate β -carotene and other carotenoids in adipose tissue and therefore deposit yellow fat; whereas sheep and goats apparently cleave all β -carotene into vitamin A, therefore they do not show yellow pigmentation of the fat. In ruminants β -carotene pass intact to small intestine where it will be absorbed and some will be cleaved into vitamin A by action of the enzyme β -carotene 15, 15' oxygenase. This means that there are variations in enzymatic activity, or in nucleotide sequence of the codification region of the gene, as well as in expression levels among these ruminant species. With the aim of obtaining the nucleotide sequence of 15, 15' oxygenase of sheep and goat ovine, and comparing its expression in liver and duodenum with bovines, total RNA was extracted from duodenum and liver, cDNA was obtained using the RT-PCR technique. RT was made using oligo (dT)₁₂₋₁₈ primer and PCR were made using the primers specific based on the gene β -carotene 15,15' oxygenase of *Bos taurus* (β CMO1 *Bos taurus* GenBank number of access DQ008469) to obtain the codification region of β -carotene 15,15' oxygenase of sheep and goat. Expression of β CMO1 was detected in agarose gel with band of 339 bp. The results will be confirmed with Real Time PCR, with BCMO1 primers: Forward 5'-CGCTGCTGGAAATGTTCTC; Reverse 5'- GGTCGATGATGTGGAGTGAG. The results show in sheep 94% of similarity and goat 95% of similarity with bovine BCMO1. Real time PCR results shows that ovine liver has the highest expression ($P < 0.01$).

Key words: β -carotene-15,15' oxygenase, β -carotene, bovines, sheep and goat ovine, cDNA, Vitamin A, yellow fat.

I. INTRODUCCION.

En México existen más de 120 millones de hectáreas dedicadas a la actividad ganadera, donde se pastorean el ganado bovino, ovino y caprino. Aunque la producción de bovinos en praderas y agostaderos es la actividad predominante en la mayor parte del país, se hace más evidente en los estados del sur, donde existe una extensa superficie a ser pastoreada. La engorda de bovinos con dietas altas en concentrados esta limitada por la necesidad de importar dichos insumos. Aun así, en los estados del norte del país, la engorda en corral es un sistema de producción generalizado, por lo tanto los ganaderos deben hacer competitivos sus sistemas de producción, reduciendo al mínimo sus costos; es aquí donde el pastoreo tomara mayor importancia como un sistema económicamente viable.¹

Y en éste sentido, la vitamina A juega papel importante en el metabolismo ya que participa en la síntesis de glicoproteínas, y es esencial para mantener la integridad de los epitelios. Algunos signos mas comunes de deficiencia son xeroftalmia (condición caracterizada por resequedad e irritación de la cornea y conjuntiva del ojo que resulta en nubosidad e infección oftálmica); queratinización del epitelio respiratorio, que traen como resultado severas infecciones respiratorias, dificultades reproductivas incluyendo abortos y nacimientos con neonatos débiles, asociados al espesamiento de la secreción vaginal (alteración del epitelio reproductor), fallas reproductivas debidas a efectos adversos sobre el epitelio espermatoogénico; se pueden observar también depósitos de ácido úrico en riñones, corazón, hígado y bazo debido a la creciente excreción urinaria del sulfato inorgánico. La vitamina A interviene en la formación normal del hueso, una hipovitaminosis tipo A crea una base común al desarrollo esquelético anormal la cual

provee una actividad osteoblástica creciente. Desórdenes nerviosos, ataxia y convulsiones ocurren como resultado de la obstrucción parcial de la medula espinal por la compresión de la columna vertebral en animales en crecimiento.^{2,3}

La vitamina A es indispensable para mantener funciones en el organismo animal como la visión: participa en el funcionamiento de la retina, adquiriendo la capacidad para adaptar la visión a distintas intensidades de luz; epitelios: ayuda a mantener la normalidad de las mucosas de la boca, pre-estómagos e intestinos, protegiéndolos contra enfermedades infecciosas y permitiendo así que cumplan óptimamente con sus funciones; aparato respiratorio: les proporciona mayor fortaleza contra neumonías y pulmonías; aparato reproductivo de las hembras: desarrollo normal de la placenta y del embrión, mejor desarrollo óseo del feto, dando lugar al nacimiento de neonatos sanos. Reanudación rápida del proceso reproductivo; aparato reproductivo del macho: aumenta la actividad sexual, así como la calidad del semen.^{4,5}

Con éstos antecedentes, resulta importante conocer las diferencias en la expresión de la enzima β -caroteno 15,15'oxigenasa entre bovinos, ovinos y caprinos, así como posibles cambios en la secuencia de nucleótidos de la región codificante del gen de dicha enzima entre especies, lo que permitirá a futuro establecer los mecanismos que afectan la actividad de esta enzima y será de ayuda para proveer los niveles correctos de precursores o vitamina A como tal a cada especie.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1 Situación actual de la producción de bovinos, ovinos y caprinos.

La producción bovina, ovina y caprina se realiza en todo el mundo, principalmente en regiones agrícolas cuyas condiciones las hacen susceptibles a ser pastoreadas, con sistemas de producción que van desde tradicionales a modernos. Gran parte de los bovinos, ovinos y caprinos destinados según su caso a la producción de carne, leche o lana, son alimentados bajo sistemas de pastoreo, ello debido a un mayor margen de rentabilidad que redundaría en la disminución de gastos de producción por concepto de alimentación; por tanto el alimento consumido proviene de la ingesta de forrajes, los cuales dependiendo de la especie, época del año y estado de maduración tendrán una concentración variable de nutrientes, entre los cuales podemos destacar a las vitaminas liposolubles y sus precursores.

Durante la época de lluvias los forrajes y las leguminosas crecen en abundancia y es cuando contienen mayor cantidad de carotenoides, de éstos compuestos destaca el β -caroteno, principal precursor de la vitamina A. En esta época el ganado en pastoreo tiene la mejor oportunidad para obtener y almacenar vitamina A en su organismo; sin embargo, en la época de secas el ganado se alimenta con muy poco forraje verde y/o consume pajas o forrajes secos de mala calidad, por lo que su organismo quedará con reservas muy limitadas de ésta vitamina. Es decir, los rumiantes domésticos en pastoreo sufren durante su vida productiva de continuas fluctuaciones en sus reservas de vitamina A, lo que aunado a otras deficiencias de nutrientes (principalmente energía y proteína) provoca desnutrición, baja en la producción de carne y leche, mala calidad de carne, problemas reproductivos y mayor susceptibilidad a contraer enfermedades infecciosas.^{6,7}

Se sabe que pollos, ratas, perros, gatos, ovejas y cabras aparentemente convierten todo el β -caroteno de la dieta en vitamina A, pero los bovinos, equinos, hurones y humanos, no convierten todo el β -caroteno en vitamina A, por lo que acumulan carotenoides en adipocitos y pueden presentar grasa amarilla. Esto significa que existen diferencias en la actividad enzimática de la β -caroteno 15,15'oxigenasa entre especies animales (BCO).⁸

2.1.1 Estimadores de importancia en el ganado bovino, ovino y caprino.

El total nacional de la población de ganado bovino para el año 2005 fue de 30, 989,622 cabezas, de las cuales 28, 797,622 corresponden al ganado bovino productor de carne, mientras que 2, 197,346 se estima que fueron afines a la producción de leche. Por su parte el resumen en la producción nacional correspondiente al año 2007 estimó que México produjo 1, 635,040 Toneladas de carne de bovino y 10, 345,982 Toneladas de leche. El consumo *per cápita* de carne de bovino es de 15.5 (kilogramos/habitante/2005), y para el consumo *per cápita* de leche de bovino es de 117.2 (litros/habitante/2005).⁹

El inventario ganadero ovino para el año 2005 estimó un total nacional de 7, 207,406 cabezas. México produjo 48,534 toneladas de carne de ovino y 4,519 toneladas de lana sucia en el año 2007 destacando el Estado de México, Hidalgo, Veracruz, Puebla y Zacatecas entre los mayores productores de ovinos en el país. Se ha estimado que alrededor de 50,000 productores a nivel nacional se dedican a la cría de ovinos, aunque únicamente 34% de ellos vive totalmente de esta especie. También que, aproximadamente 120,000 artesanos trabajan la lana. Estos datos nos revelan la importancia socioeconómica de la especie. El consumo *per cápita* de carne de ovino es de 0.8 (kilogramos/habitante para el año 2005).⁹

Por su parte el inventario ganadero caprino en el año 2005 estimó un total nacional de 8, 870,312 cabezas, entre los mayores productores a nivel nacional encontramos los Estados de Coahuila, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí y Guerrero.

México produjo en el año 2007 42,837 toneladas de carne de caprino, además de 167,423 toneladas pertenecientes a la producción de leche de caprino. Por su parte el consumo per cápita de carne de cabra es de 0.4 (kilogramos/habitante para el año 2005). Se estima que aproximadamente 150,000 productores a nivel nacional dependen total o parcialmente de la especie caprina.⁹

Cuadro 1. Resumen de la producción nacional 2007.

Producción	Toneladas
Carne en canal bovino	1,635,040
Carne en canal ovino	48,534
Carne en canal caprino	42,837
Leche de bovino	10,354,982
Leche de caprino	167,423
Lana Sucia	4,519

Cuadro 2. Resumen Nacional Población Ganadera 2005.

Especie	No. de Cabezas
Bovinos productores de Carne	28,797,622
Bovinos productores de leche	2,197,346
Ovinos	7,207,406
Caprinos	8,870,312

2.2 Carotenoides.

Los carotenoides y esencialmente el β -caroteno, son los principales precursores de vitamina A en el organismo animal; son sintetizados por plantas, hongos y bacterias fotosintéticas; se caracterizan por ser compuestos liposolubles responsables de la coloración amarilla, naranja y roja de las flores, frutos, aves, insectos y organismos marinos. Los animales los obtienen de los alimentos para luego metabolizarlos, acumularlos en sus tejidos o utilizarlos como fuente de vitamina A.¹⁰ Químicamente, los carotenoides se definen como compuestos formados de ocho unidades isoprenoides (cinco carbonos) cuyo origen es invertido desde la molécula central.¹¹

Estos compuestos se consideran como derivados del licopeno, originados a partir de reacciones de hibridación, deshidrogenación, ciclización, inserción de oxígeno, migración de dobles enlaces, migración de metilos, elongación o acortamiento de cadena.¹¹ 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 el espectro de luz visible se localiza en los 400 y 500 nm, correspondientes a los colores rojo, naranja y amarillo.¹²

Los carotenoides son compuestos hidrofóbicos y por tanto se localizan en sitios lipofílicos dentro de las células, así como en las membranas celulares. En la figura 1 se muestra la estructura química de algunos de los carotenoides más importantes.

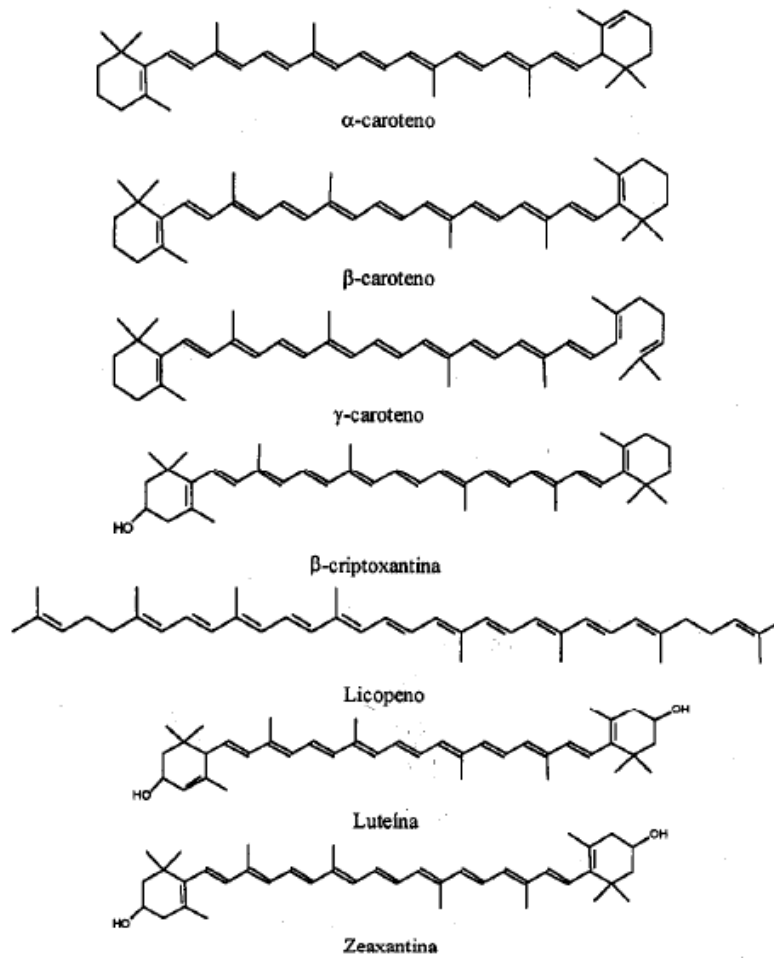


Figura 1. Principales carotenoides y su estructura química.

2.2.1 Principales características de los carotenoides.

Los carotenoides son pigmentos orgánicos que se encuentran de forma natural en plantas y otros organismos fotosintéticos como algas, algunas clases de hongos y bacterias. Se conoce la existencia de más de 700 compuestos pertenecientes a este grupo.⁴ Los carotenoides son el grupo más representativo de los tetraterpenos, compuestos que se caracterizan por una estructura con 40 átomos de carbono, aunque no todos los carotenoides se ajustan estrictamente a esta regla.

Estos átomos de carbono se encuentran ordenados formando cadenas poliénicas conjugadas en ocasiones terminadas en anillos de carbono. A los carotenoides que contienen átomos de oxígeno se les conoce más específicamente como oxicarotenoides o xantofilas. Los restantes constituyen el grupo de los llamados carotenos. Su color, que varía desde amarillo pálido, pasando por anaranjado, hasta rojo oscuro, se encuentra directamente relacionado con su estructura: los enlaces dobles carbono-carbono interactúan entre sí en un proceso llamado conjugación. Mientras el número de enlaces dobles conjugados aumenta, la longitud de onda de la luz absorbida también lo hace, dando al compuesto una apariencia más rojiza.⁴ Por ejemplo, el fitoeno que posee únicamente tres enlaces dobles conjugados absorbe luz en el rango ultravioleta y apareciendo por tanto incoloro a la vista, el licopeno, compuesto que confiere su color rojo al tomate contiene 11 enlaces dobles conjugados. Existen también carotenoides de color verde (ζ -Caroteno), amarillo (β -caroteno), y anaranjado (neurosporaxantina). En organismos fotosintéticos los carotenoides desempeñan un papel vital en los centros de reacción, ya sea participando en el proceso de transferencia de energía, o protegiendo el centro de reacción contra la auto oxidación.^{4,13}

En los organismos no fotosintéticos, los carotenoides han sido vinculados a los mecanismos de prevención de la oxidación. Los animales son incapaces de sintetizar carotenoides y deben obtenerlos a través de su dieta, siendo estos compuestos importantes por su función biológica como pro-vitamina A. Como ejemplo de estos compuestos en la naturaleza, podemos citar al carotenoide mejor conocido, el que da al grupo su nombre, el β -caroteno, encontrado en zanahorias y responsable de su color anaranjado brillante.¹³

El color rosado del flamenco y el del salmón, y la coloración roja de las langostas, también son producidos por carotenoides. Entre las aplicaciones más importantes de los

carotenoides podemos mencionar su uso como pigmentos naturales, así como su papel como complemento alimenticio.¹⁴

2.2.2 Metabolismo de β -caroteno en el organismo animal e importancia de la enzima 15'15 oxigenasa.

En los rumiantes se ha visto que el β caroteno contenido en el alimento 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 en vitamina A por acción de la enzima β -caroteno 15,15'oxigenasa (β CMO1).¹⁴ La vitamina A libre y el β -caroteno son incorporados a las micelas mixtas para luego ser absorbidos por transporte activo como retinol o β -caroteno en el duodeno. Dentro de las células de la mucosa intestinal, la vitamina A se re-esterifica a palmitato y otros esterios, y juntos vitamina A y β -caroteno se incorporan a los quilomicrones y pasan al conducto linfático para en el caso de la vitamina A ser almacenada en las células del parénquima del hígado como esterios de retinil.⁴ Para liberar y usar estos esterios se requiere de la enzima hidrolasa del retinilpalmitato; la cual produce la forma libre del retinol que es transportada a los tejidos periféricos ligada a la proteína transportadora del retinol.¹⁵ En el caso de β -caroteno, éste puede ser de nuevo cortado por la β CMO1 hepática y convertido en vitamina A, o bien pasar a la circulación unido a lipoproteínas (de alta densidad en el caso de bovino) y depositarse en aquellos tejidos donde existan lípidos, principalmente en el tejido adiposo y en el cuerpo lúteo en las hembras. En la figura 2 se ilustran los mecanismos de entrada y transformación del β -caroteno en las diferentes formas de vitamina A en la célula.

Parte del retinol se puede transformar en retinal y ácido retinoico para ser transportado a la circulación portal. Otros tejidos tales como el pulmón y el riñón pueden también hidrolizar al β -caroteno.¹⁶

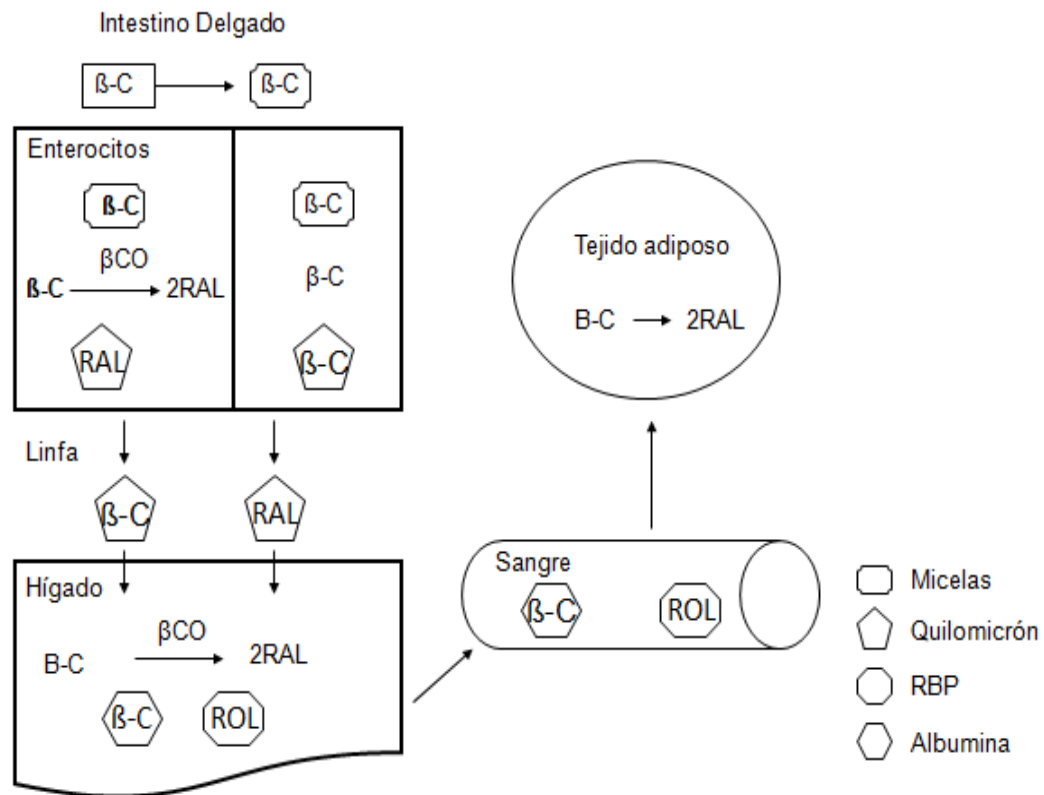


Figura 2. Mecanismos de entrada y transformación del β -caroteno en las diferentes formas de vitamina A en la célula. El β -Caroteno se une a lipoproteínas y quilomicrones para ser introducido al citoplasma del enterocito. Luego la enzima β -caroteno 15,15' oxigenasa rompe al β -Caroteno en su enlace central dando origen a dos moléculas de retinal (aldehído), que a su vez por acción de la enzima ROLDH (retinol deshidrogenasa) lo convierte en retinol (alcohol), pero si la enzima RALDH (retinal deshidrogenasa) ejerce sobre el retinal dará origen al ácido retinoico.

Respecto a su papel en el metabolismo, la vitamina A juega un papel primario en la síntesis de glicoproteínas, dicha vitamina es esencial para mantener la integridad de los epitelios, por lo que una hipovitaminosis o deficiencia de vitamina A nos crea una variedad amplia de signos en animales con carencias de vitamina A. Algunos signos mas comunes

de deficiencia son xeroftalmia (condición caracterizada por resequedad e irritación de la cornea y conjuntiva de el ojo que resulta en nubosidad e infección oftálmica); queratinización del epitelio respiratorio, que traen como resultado severas infecciones respiratorias, dificultades reproductivas incluyendo abortos y nacimientos con neonatos débiles, asociados al espesamiento de la secreción vaginal (alteración del epitelio reproductor), fallas reproductivas debidas a efectos adversos sobre el epitelio espermatogénico; se pueden observar también depósitos de ácido úrico en riñones corazón, hígado y bazo debido a la excreción urinaria creciente del sulfato inorgánico. La importancia de la vitamina A en la formación normal del hueso se relaciona con una variedad de signos, tal deficiencia crea una base común al desarrollo esquelético anormal la cual provee una actividad osteoblástica creciente.¹⁵ Desordenes nerviosos, ataxia y convulsiones ocurren como resultado de la obstrucción parcial de la medula espinal por la compresión de la columna vertebral en animales en crecimiento. La exoftalmia y el incremento de la presión cerebroespinal se presentan en los casos de deficiencia de vitamina A aparentemente, como resultado de la presión excesiva asociada con la constricción de la columna espinal y el foramen óptico.¹⁶

El metabolismo de la vitamina A ha sido ligada con la vitamina E (como un antioxidante en la estabilización de las membranas biológicas), vitamina D (en el metabolismo del hueso), esteroides (deficiencia de vitamina A reduce la síntesis de colesterol), escualeno (la deficiencia incrementa la síntesis de escualeno) y coenzima Q o ubiquinona (la deficiencia incrementa la síntesis de ubiquinona en hígado). La deficiencia de vitamina A causa atrofia de glándulas adrenales y reduce la gluconeogenesis hepática, por lo que la vitamina A esta implicada de cierta manera con la biosíntesis de esteroides suprarrenales y del glucógeno.¹⁷

2.3 Mecanismos de acción de la enzima β CMO1.

Hasta la fecha se han propuesto dos mecanismos de acción para la ruptura del enlace central de β -caroteno por la enzima β CMO1. El primer mecanismo reportado por Olson y Hayaishi en 1965 es el de "dioxigenasa".⁵ Este requiere la presencia de oxígeno molecular y produce el intermediario inestable dioxetano, mismo que es convertido rápidamente en retinal (se muestra en la figura 3). Recientemente se propuso la reacción de "monoxigenasa".¹⁸ En este último modelo los autores mencionan que para que se 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 aun requiere calificar la naturaleza del complejo que debe formarse con un metal, probablemente hierro, requerido para la epoxidación; así como para la extensión en el intercambio de oxígeno de naturaleza molecular o del agua.¹⁹

El β -caroteno es hidrolizado en el intestino por acción enzimática de la β -caroteno 15,15'-oxigenasa para producir retinal que a su vez se reduce para formar retinol. Una vez que el β -caroteno se encuentra en el intestino delgado este se solubiliza por acción de los componentes biliares y en conjunto con otros lípidos pasa a formar parte de las micelas que el organismo absorbe mediante las vellosidades intestinales.¹² En la figura 3 se ilustra la acción de la enzima β CMO1 y la importancia del β -caroteno como provitamina A.

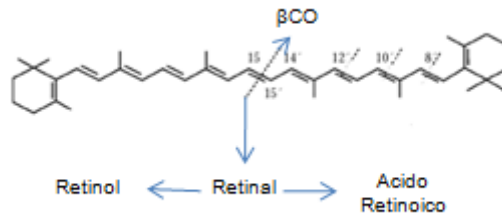


Figura 3. Ruptura central del β-Caroteno por acción de la enzima BCMO1.

2.4 Retinoides.

Los retinoides (retinol, retinal y el ácido retinóico) son esenciales para todas las formas de vida animal. Los retinoides son moléculas importantes en el control del ciclo celular, la diferenciación, así como en la muerte celular.⁴ El ácido retinoico todo-trans tiene funciones vitales, se obtiene de la dieta como derivado de la vitamina A, por oxidación enzimática del retinol. La capacidad de éste compuesto para regular la expresión de cientos de genes a través de su unión a los receptores nucleares es bien conocida.

El ácido retinoico es el ligando natural primario para el sistema de transcripción basado en retinoides, el cual es por si mismo un miembro del grupo de receptores nucleares hormonales, el grupo de genes blanco para el sistema de retinoides es amplio y diverso, así como sus efectos, tanto transcripcionales como no-transcripcionales.⁵ La privación o la exposición a un exceso de ácido retinoico puede resultar en anomalías en el desarrollo embrionario y en la fisiología del adulto.¹⁹ En la figura 4 se observa la estructura química de los isómeros principales de retinoides presentes en el organismo animal.

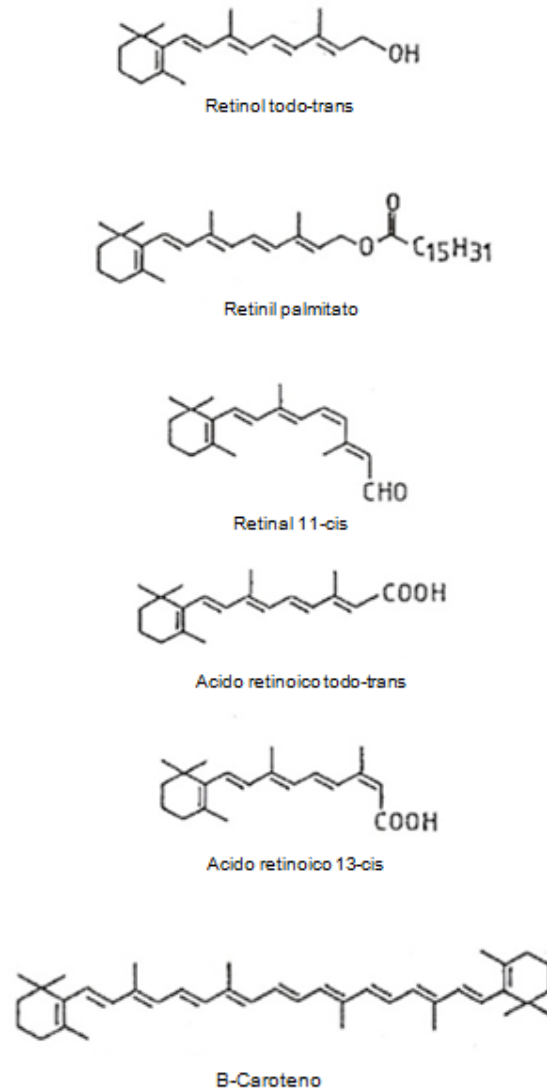


Figura 4. Formas estructurales que ocurren en retinoides y β -caroteno.

2.4.1 Receptores de Acido retinoico.

La acción fisiológica de los retinoides es mediada por los receptores de ácido retinóico (RAR) y los receptores X de retinoides (RXR) estos son miembros de una súper familia de receptores nucleares con factor de transcripción de un ligando dependiente.²⁰

Los receptores para ácido retinoico regulan la expresión de ciertos genes por unión a secuencias cortas de DNA, llamadas elementos de respuesta.

Los RAR tienen muchas diferentes funciones transcripcionales según los requerimientos del organismo del hospedero en la regulación de proteínas positiva o negativamente (activador o inhibidor) refiriéndose hacia ellas como un coactivador o correpresor respectivamente. Por lo que su efecto directo sobre la célula tal y como se observa en la figura 5.

El ácido retinóico todo-trans modula la actividad de la proteína cinasa K, una proteína que regula fundamentalmente funciones celulares tales como proliferación, diferenciación, tumorigenesis y apoptosis.

Se ha demostrado que el ácido retinóico incrementa especifica y rápidamente la acetilcolina con lo que se involucra en el desarrollo de la sinapsis neuromuscular.²¹

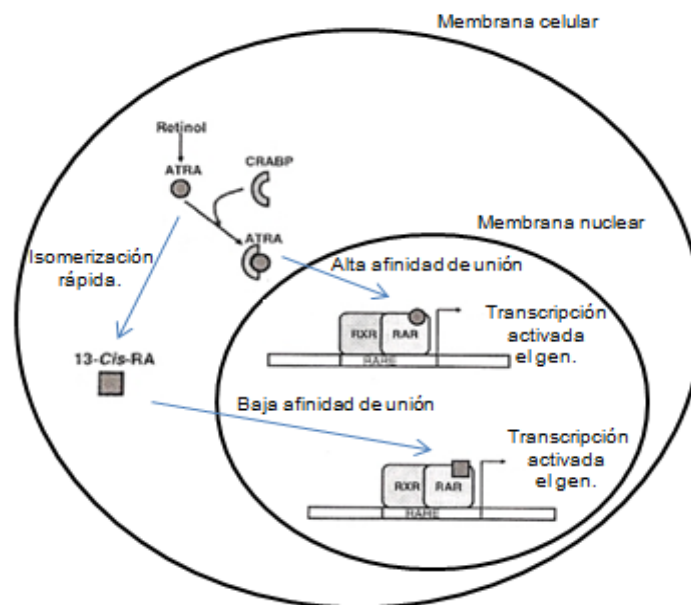


Figura 5. Mecanismo de acción de retinoides. Dentro de la célula el retinol es convertido enzimáticamente a ácido retinóico todo-trans). Este es transportado al núcleo por CRABP (proteína celular ligadora de ácido retinóico). En el núcleo los receptores de ácido retinoico (RAR/RXR) lo heterodimerizan en genes blanco, que a su vez contienen RARE (elementos de respuesta a ácido retinóico).

II. REVISION DE LITERATURA

2.1 Situación actual de la producción de bovinos, ovinos y caprinos.

La producción bovina, ovina y caprina se realiza en todo el mundo, principalmente en regiones agrícolas cuyas condiciones las hacen susceptibles a ser pastoreadas, con sistemas de producción que van desde tradicionales a modernos. Gran parte de los bovinos, ovinos y caprinos destinados según su caso a la producción de carne, leche o lana, son alimentados bajo sistemas de pastoreo, ello debido a un mayor margen de rentabilidad que redundaría en la disminución de gastos de producción por concepto de alimentación; por tanto el alimento consumido proviene de la ingesta de forrajes, los cuales dependiendo de la especie, época del año y estado de maduración tendrán una concentración variable de nutrientes, entre los cuales podemos destacar a las vitaminas liposolubles y sus precursores.

Durante la época de lluvias los forrajes y las leguminosas crecen en abundancia y es cuando contienen mayor cantidad de carotenoides, de éstos compuestos destaca el β -caroteno, principal precursor de la vitamina A. En esta época el ganado en pastoreo tiene la mejor oportunidad para obtener y almacenar vitamina A en su organismo; sin embargo, en la época de secas el ganado se alimenta con muy poco forraje verde y/o consume pajas o forrajes secos de mala calidad, por lo que su organismo quedará con reservas muy limitadas de ésta vitamina. Es decir, los rumiantes domésticos en pastoreo sufren durante su vida productiva de continuas fluctuaciones en sus reservas de vitamina A, lo que aunado a otras deficiencias de nutrientes (principalmente energía y proteína) provoca desnutrición, baja en la producción de carne y leche, mala calidad de carne, problemas reproductivos y mayor susceptibilidad a contraer enfermedades infecciosas.^{6,7}

Se sabe que pollos, ratas, perros, gatos, ovejas y cabras aparentemente convierten todo el β -caroteno de la dieta en vitamina A, pero los bovinos, equinos, hurones y humanos, no convierten todo el β -caroteno en vitamina A, por lo que acumulan carotenoides en adipocitos y pueden presentar grasa amarilla. Esto significa que existen diferencias en la actividad enzimática de la β -caroteno 15,15'oxigenasa entre especies animales (BCO).⁸

2.1.1 Estimadores de importancia en el ganado bovino, ovino y caprino.

El total nacional de la población de ganado bovino para el año 2005 fue de 30, 989,622 cabezas, de las cuales 28, 797,622 corresponden al ganado bovino productor de carne, mientras que 2, 197,346 se estima que fueron afines a la producción de leche. Por su parte el resumen en la producción nacional correspondiente al año 2007 estimó que México produjo 1, 635,040 Toneladas de carne de bovino y 10, 345,982 Toneladas de leche. El consumo *per cápita* de carne de bovino es de 15.5 (kilogramos/habitante/2005), y para el consumo *per cápita* de leche de bovino es de 117.2 (litros/habitante/2005).⁹

El inventario ganadero ovino para el año 2005 estimó un total nacional de 7, 207,406 cabezas. México produjo 48,534 toneladas de carne de ovino y 4,519 toneladas de lana sucia en el año 2007 destacando el Estado de México, Hidalgo, Veracruz, Puebla y Zacatecas entre los mayores productores de ovinos en el país. Se ha estimado que alrededor de 50,000 productores a nivel nacional se dedican a la cría de ovinos, aunque únicamente 34% de ellos vive totalmente de esta especie. También que, aproximadamente 120,000 artesanos trabajan la lana. Estos datos nos revelan la importancia socioeconómica de la especie. El consumo *per cápita* de carne de ovino es de 0.8 (kilogramos/habitante para el año 2005).⁹

Por su parte el inventario ganadero caprino en el año 2005 estimó un total nacional de 8, 870,312 cabezas, entre los mayores productores a nivel nacional encontramos los Estados de Coahuila, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí y Guerrero.

México produjo en el año 2007 42,837 toneladas de carne de caprino, además de 167,423 toneladas pertenecientes a la producción de leche de caprino. Por su parte el consumo per cápita de carne de cabra es de 0.4 (kilogramos/habitante para el año 2005). Se estima que aproximadamente 150,000 productores a nivel nacional dependen total o parcialmente de la especie caprina.⁹

Cuadro 1. Resumen de la producción nacional 2007.

Producción	Toneladas
Carne en canal bovino	1,635,040
Carne en canal ovino	48,534
Carne en canal caprino	42,837
Leche de bovino	10,354,982
Leche de caprino	167,423
Lana Sucia	4,519

Cuadro 2. Resumen Nacional Población Ganadera 2005.

Especie	No. de Cabezas
Bovinos productores de Carne	28,797,622
Bovinos productores de leche	2,197,346
Ovinos	7,207,406
Caprinos	8,870,312

2.2 Carotenoides.

Los carotenoides y esencialmente el β -caroteno, son los principales precursores de vitamina A en el organismo animal; son sintetizados por plantas, hongos y bacterias fotosintéticas; se caracterizan por ser compuestos liposolubles responsables de la coloración amarilla, naranja y roja de las flores, frutos, aves, insectos y organismos marinos. Los animales los obtienen de los alimentos para luego metabolizarlos, acumularlos en sus tejidos o utilizarlos como fuente de vitamina A.¹⁰ Químicamente, los carotenoides se definen como compuestos formados de ocho unidades isoprenoides (cinco carbonos) cuyo origen es invertido desde la molécula central.¹¹

Estos compuestos se consideran como derivados del licopeno, originados a partir de reacciones de hibridación, deshidrogenación, ciclización, inserción de oxígeno, migración de dobles enlaces, migración de metilos, elongación o acortamiento de cadena.¹¹ 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 el espectro de luz visible se localiza en los 400 y 500 nm, correspondientes a los colores rojo, naranja y amarillo.¹²

Los carotenoides son compuestos hidrofóbicos y por tanto se localizan en sitios lipofílicos dentro de las células, así como en las membranas celulares. En la figura 1 se muestra la estructura química de algunos de los carotenoides más importantes.

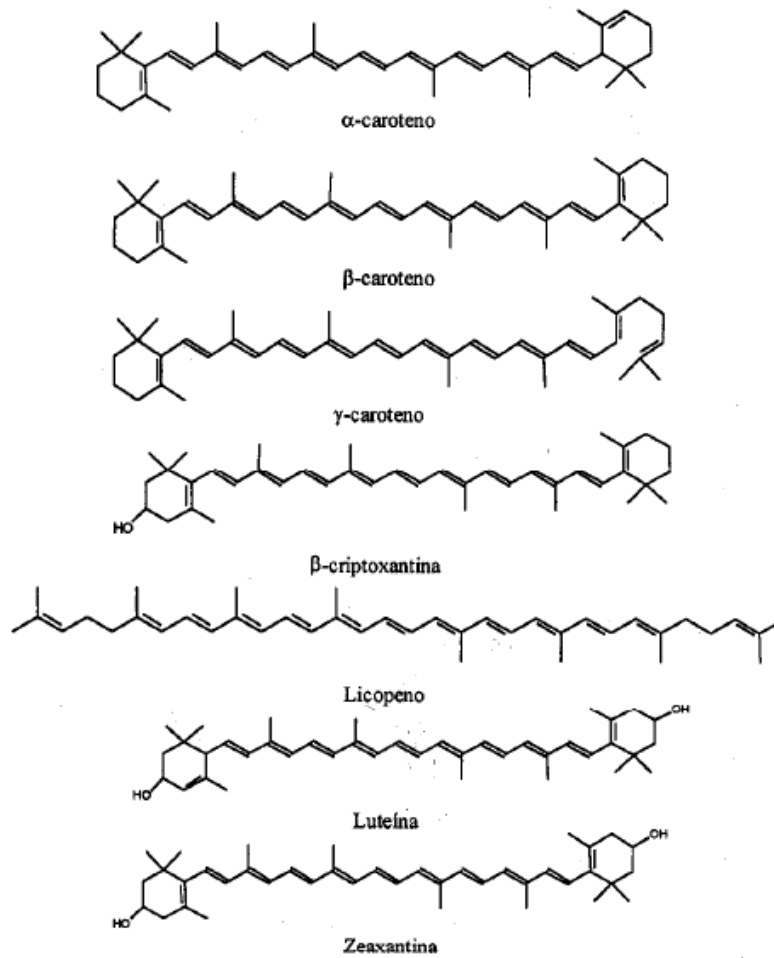


Figura 1. Principales carotenoides y su estructura química.

2.2.1 Principales características de los carotenoides.

Los carotenoides son pigmentos orgánicos que se encuentran de forma natural en plantas y otros organismos fotosintéticos como algas, algunas clases de hongos y bacterias. Se conoce la existencia de más de 700 compuestos pertenecientes a este grupo.⁴ Los carotenoides son el grupo más representativo de los tetraterpenos, compuestos que se caracterizan por una estructura con 40 átomos de carbono, aunque no todos los carotenoides se ajustan estrictamente a esta regla.

Estos átomos de carbono se encuentran ordenados formando cadenas poliénicas conjugadas en ocasiones terminadas en anillos de carbono. A los carotenoides que contienen átomos de oxígeno se les conoce más específicamente como oxicarotenoides o xantofilas. Los restantes constituyen el grupo de los llamados carotenos. Su color, que varía desde amarillo pálido, pasando por anaranjado, hasta rojo oscuro, se encuentra directamente relacionado con su estructura: los enlaces dobles carbono-carbono interactúan entre sí en un proceso llamado conjugación. Mientras el número de enlaces dobles conjugados aumenta, la longitud de onda de la luz absorbida también lo hace, dando al compuesto una apariencia más rojiza.⁴ Por ejemplo, el fitoeno que posee únicamente tres enlaces dobles conjugados absorbe luz en el rango ultravioleta y apareciendo por tanto incoloro a la vista, el licopeno, compuesto que confiere su color rojo al tomate contiene 11 enlaces dobles conjugados. Existen también carotenoides de color verde (ζ -Caroteno), amarillo (β -caroteno), y anaranjado (neurosporaxantina). En organismos fotosintéticos los carotenoides desempeñan un papel vital en los centros de reacción, ya sea participando en el proceso de transferencia de energía, o protegiendo el centro de reacción contra la auto oxidación.^{4,13}

En los organismos no fotosintéticos, los carotenoides han sido vinculados a los mecanismos de prevención de la oxidación. Los animales son incapaces de sintetizar carotenoides y deben obtenerlos a través de su dieta, siendo estos compuestos importantes por su función biológica como pro-vitamina A. Como ejemplo de estos compuestos en la naturaleza, podemos citar al carotenoide mejor conocido, el que da al grupo su nombre, el β -caroteno, encontrado en zanahorias y responsable de su color anaranjado brillante.¹³

El color rosado del flamenco y el del salmón, y la coloración roja de las langostas, también son producidos por carotenoides. Entre las aplicaciones más importantes de los

carotenoides podemos mencionar su uso como pigmentos naturales, así como su papel como complemento alimenticio.¹⁴

2.2.2 Metabolismo de β -caroteno en el organismo animal e importancia de la enzima 15'15 oxigenasa.

En los rumiantes se ha visto que el β caroteno contenido en el alimento 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 en vitamina A por acción de la enzima β -caroteno 15,15'oxigenasa (β CMO1).¹⁴ La vitamina A libre y el β -caroteno son incorporados a las micelas mixtas para luego ser absorbidos por transporte activo como retinol o β -caroteno en el duodeno. Dentro de las células de la mucosa intestinal, la vitamina A se re-esterifica a palmitato y otros esterres, y juntos vitamina A y β -caroteno se incorporan a los quilomicrones y pasan al conducto linfático para en el caso de la vitamina A ser almacenada en las células del parénquima del hígado como esterres de retinil.⁴ Para liberar y usar estos esterres se requiere de la enzima hidrolasa del retinilpalmitato; la cual produce la forma libre del retinol que es transportada a los tejidos periféricos ligada a la proteína transportadora del retinol.¹⁵ En el caso de β -caroteno, éste puede ser de nuevo cortado por la β CMO1 hepática y convertido en vitamina A, o bien pasar a la circulación unido a lipoproteínas (de alta densidad en el caso de bovino) y depositarse en aquellos tejidos donde existan lípidos, principalmente en el tejido adiposo y en el cuerpo lúteo en las hembras. En la figura 2 se ilustran los mecanismos de entrada y transformación del β -caroteno en las diferentes formas de vitamina A en la célula.

Parte del retinol se puede transformar en retinal y ácido retinoico para ser transportado a la circulación portal. Otros tejidos tales como el pulmón y el riñón pueden también hidrolizar al β -caroteno.¹⁶

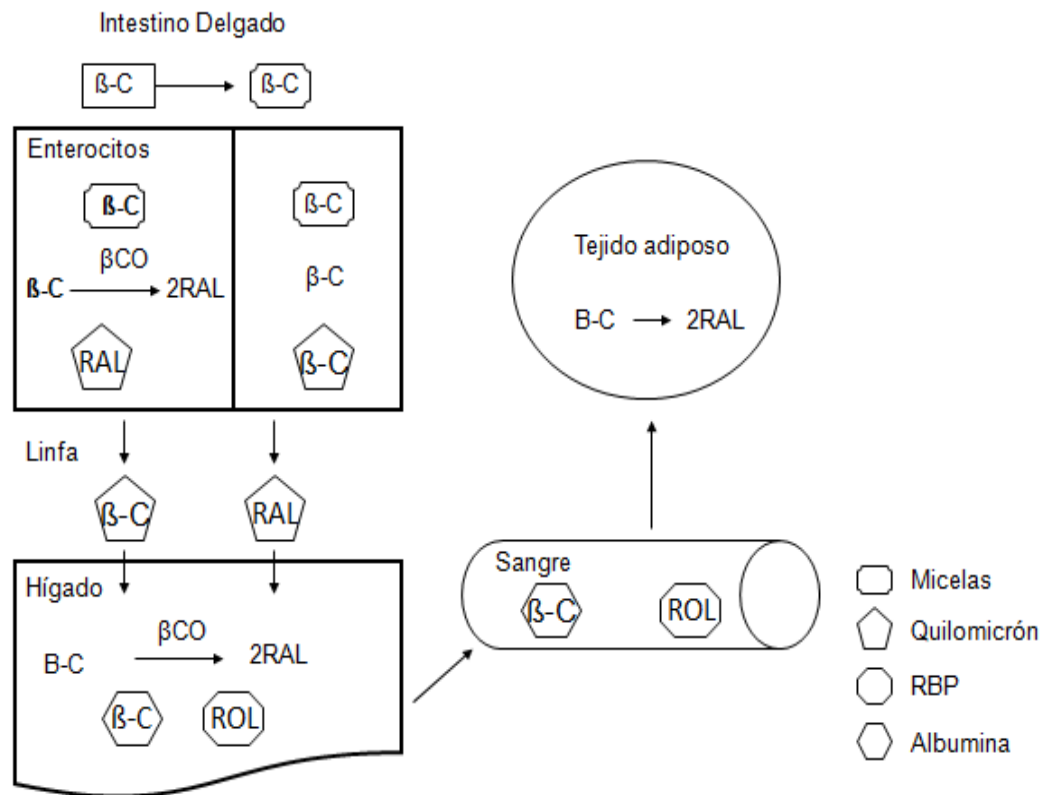


Figura 2. Mecanismos de entrada y transformación del β -caroteno en las diferentes formas de vitamina A en la célula. El β -Caroteno se une a lipoproteínas y quilomicrones para ser introducido al citoplasma del enterocito. Luego la enzima β -caroteno 15,15' oxigenasa rompe al β -Caroteno en su enlace central dando origen a dos moléculas de retinal (aldehído), que a su vez por acción de la enzima ROLDH (retinol deshidrogenasa) lo convierte en retinol (alcohol), pero si la enzima RALDH (retinal deshidrogenasa) ejerce sobre el retinal dará origen al ácido retinoico.

Respecto a su papel en el metabolismo, la vitamina A juega un papel primario en la síntesis de glicoproteínas, dicha vitamina es esencial para mantener la integridad de los epitelios, por lo que una hipovitaminosis o deficiencia de vitamina A nos crea una variedad amplia de signos en animales con carencias de vitamina A. Algunos signos mas comunes

de deficiencia son xeroftalmia (condición caracterizada por resequedad e irritación de la cornea y conjuntiva de el ojo que resulta en nubosidad e infección oftálmica); queratinización del epitelio respiratorio, que traen como resultado severas infecciones respiratorias, dificultades reproductivas incluyendo abortos y nacimientos con neonatos débiles, asociados al espesamiento de la secreción vaginal (alteración del epitelio reproductor), fallas reproductivas debidas a efectos adversos sobre el epitelio espermatogénico; se pueden observar también depósitos de ácido úrico en riñones corazón, hígado y bazo debido a la excreción urinaria creciente del sulfato inorgánico. La importancia de la vitamina A en la formación normal del hueso se relaciona con una variedad de signos, tal deficiencia crea una base común al desarrollo esquelético anormal la cual provee una actividad osteoblástica creciente.¹⁵ Desordenes nerviosos, ataxia y convulsiones ocurren como resultado de la obstrucción parcial de la medula espinal por la compresión de la columna vertebral en animales en crecimiento. La exoftalmia y el incremento de la presión cerebroespinal se presentan en los casos de deficiencia de vitamina A aparentemente, como resultado de la presión excesiva asociada con la constricción de la columna espinal y el foramen óptico.¹⁶

El metabolismo de la vitamina A ha sido ligada con la vitamina E (como un antioxidante en la estabilización de las membranas biológicas), vitamina D (en el metabolismo del hueso), esteroides (deficiencia de vitamina A reduce la síntesis de colesterol), escualeno (la deficiencia incrementa la síntesis de escualeno) y coenzima Q o ubiquinona (la deficiencia incrementa la síntesis de ubiquinona en hígado). La deficiencia de vitamina A causa atrofia de glándulas adrenales y reduce la gluconeogenesis hepática, por lo que la vitamina A esta implicada de cierta manera con la biosíntesis de esteroides suprarrenales y del glucógeno.¹⁷

2.3 Mecanismos de acción de la enzima β CMO1.

Hasta la fecha se han propuesto dos mecanismos de acción para la ruptura del enlace central de β -caroteno por la enzima β CMO1. El primer mecanismo reportado por Olson y Hayaishi en 1965 es el de "dioxigenasa".⁵ Este requiere la presencia de oxígeno molecular y produce el intermediario inestable dioxetano, mismo que es convertido rápidamente en retinal (se muestra en la figura 3). Recientemente se propuso la reacción de "monoxigenasa".¹⁸ En este último modelo los autores mencionan que para que se 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 aun requiere calificar la naturaleza del complejo que debe formarse con un metal, probablemente hierro, requerido para la epoxidación; así como para la extensión en el intercambio de oxígeno de naturaleza molecular o del agua.¹⁹

El β -caroteno es hidrolizado en el intestino por acción enzimática de la β -caroteno 15,15'-oxigenasa para producir retinal que a su vez se reduce para formar retinol. Una vez que el β -caroteno se encuentra en el intestino delgado este se solubiliza por acción de los componentes biliares y en conjunto con otros lípidos pasa a formar parte de las micelas que el organismo absorbe mediante las vellosidades intestinales.¹² En la figura 3 se ilustra la acción de la enzima β CMO1 y la importancia del β -caroteno como provitamina A.

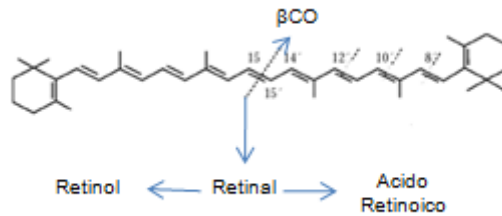


Figura 3. Ruptura central del β -Caroteno por acción de la enzima BCMO1.

2.4 Retinoides.

Los retinoides (retinol, retinal y el ácido retinóico) son esenciales para todas las formas de vida animal. Los retinoides son moléculas importantes en el control del ciclo celular, la diferenciación, así como en la muerte celular.⁴ El ácido retinoico todo-trans tiene funciones vitales, se obtiene de la dieta como derivado de la vitamina A, por oxidación enzimática del retinol. La capacidad de éste compuesto para regular la expresión de cientos de genes a través de su unión a los receptores nucleares es bien conocida.

El ácido retinoico es el ligando natural primario para el sistema de transcripción basado en retinoides, el cual es por si mismo un miembro del grupo de receptores nucleares hormonales, el grupo de genes blanco para el sistema de retinoides es amplio y diverso, así como sus efectos, tanto transcripcionales como no-transcripcionales.⁵ La privación o la exposición a un exceso de ácido retinoico puede resultar en anomalías en el desarrollo embrionario y en la fisiología del adulto.¹⁹ En la figura 4 se observa la estructura química de los isómeros principales de retinoides presentes en el organismo animal.

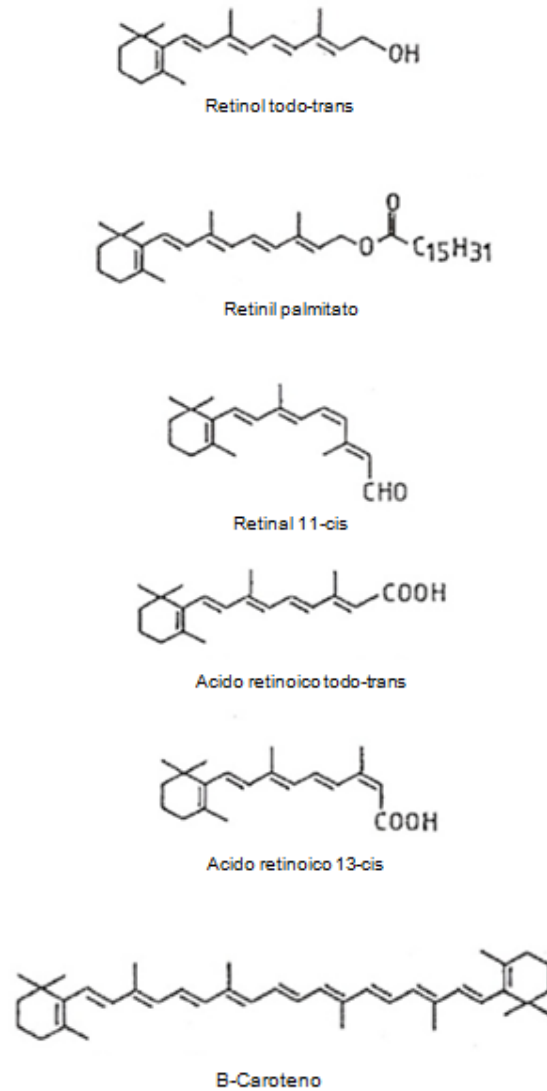


Figura 4. Formas estructurales que ocurren en retinoides y β -caroteno.

2.4.1 Receptores de Acido retinoico.

La acción fisiológica de los retinoides es mediada por los receptores de ácido retinóico (RAR) y los receptores X de retinoides (RXR) estos son miembros de una súper familia de receptores nucleares con factor de transcripción de un ligando dependiente.²⁰

Los receptores para ácido retinoico regulan la expresión de ciertos genes por unión a secuencias cortas de DNA, llamadas elementos de respuesta.

Los RAR tienen muchas diferentes funciones transcripcionales según los requerimientos del organismo del hospedero en la regulación de proteínas positiva o negativamente (activador o inhibidor) refiriéndose hacia ellas como un coactivador o correpresor respectivamente. Por lo que su efecto directo sobre la célula tal y como se observa en la figura 5.

El ácido retinóico todo-trans modula la actividad de la proteína cinasa K, una proteína que regula fundamentalmente funciones celulares tales como proliferación, diferenciación, tumorigenesis y apoptosis.

Se ha demostrado que el ácido retinóico incrementa especifica y rápidamente la acetilcolina con lo que se involucra en el desarrollo de la sinapsis neuromuscular.²¹

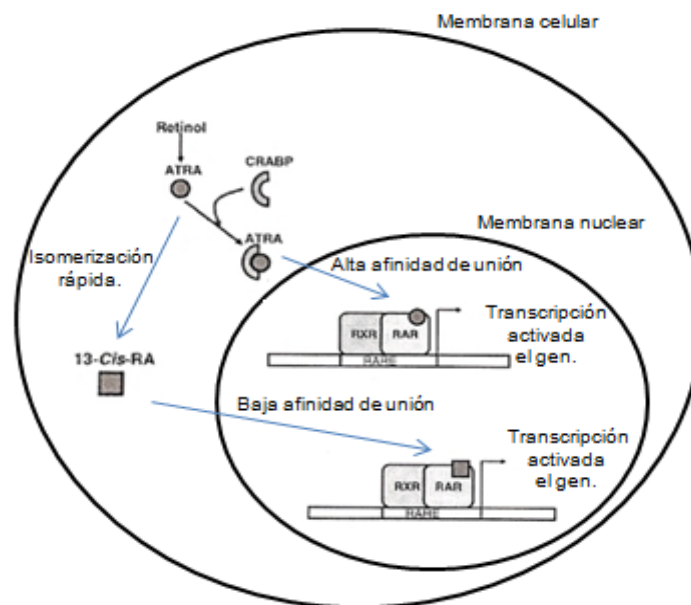


Figura 5. Mecanismo de acción de retinoides. Dentro de la célula el retinol es convertido enzimáticamente a ácido retinóico todo-trans). Este es transportado al núcleo por CRABP (proteína celular ligadora de ácido retinóico). En el núcleo los receptores de ácido retinoico (RAR/RXR) lo heterodimerizan en genes blanco, que a su vez contienen RARE (elementos de respuesta a ácido retinóico).

III. JUSTIFICACIÓN.

El conocer las diferencias en la expresión de la enzima β -caroteno 15,15'oxigenasa entre bovinos, ovinos y caprinos, así como posibles cambios en la secuencia de nucleótidos de la región codificante del gen de dicha enzima entre especies, nos permitirá a futuro establecer los mecanismos que afectan la actividad de esta enzima y será de gran ayuda para administrar los niveles adecuados de sus precursores o vitamina A como tal a cada especie.

IV. HIPÓTESIS.

Existen diferencias en la secuencia de nucleótidos del cDNA en la región codificante para el gen de la enzima β CMO1 entre bovinos, ovinos y caprinos.

La expresión del RNA de la enzima β CMO1 mensajero será diferente en tejido hepático y duodenal y entre especie (bovina, ovina y caprina).

V. OBJETIVOS.

5.1 General.

Determinar la secuencia de la región codificante del gen de la enzima β -caroteno 15,15'oxigenasa en ovinos y caprinos y las diferencias en su expresión en el intestino delgado e hígado de tres especies rumiantes (bovino, ovino y caprino).

5.2 Específicos.

- 1.- Determinar la secuencia de nucleótidos del DNA complementario que codifica para la enzima β -caroteno 15,15' oxígenoasa en ovinos y caprinos.
- 2.- Clonar el cDNA de la enzima β caroteno 15,15' oxígenoasa de ovinos y caprinos en un vector Topo (TOPO TA Cloning kit®, Invitrogen).
- 3.- Cuantificar la expresión de la enzima β -caroteno 15,15'oxigenasa en duodeno e hígado de bovinos, ovinos y caprinos por PCR y PCR de tiempo Real.

VI. MATERIAL Y METODOS.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de RuMeN (Rumiología y Metabolismo Nutricional), ubicado en el Laboratorio A-03 del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México campus Juriquilla, Querétaro.

Se realizó el muestreo aleatorio de duodeno e hígado de bovinos, ovinos y caprinos, cinco de cada especie, en el rastro municipal de la Ciudad de Querétaro. Se transportaron al Instituto de Neurobiología, donde se llevaron a cabo todos los análisis de laboratorio. Una vez en el laboratorio se procedió a la obtención de RNA total (Rneasy kit®, Qiagen, Apéndice 10.1), y a partir de este se realizó una transcripción reversa, con la enzima superscript transcriptasa reversa (RT. Apéndice 10.2) (Lifes Technologies, Inc) se obtuvo el DNA complementario. Una vez obtenido el producto de RT, este fue amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR. Apéndice 10.3) con el uso de cebadores específicos basados en el gen β CMO1 *Bos taurus* (GenBank no. de acceso DQ008469).

Clonación de los cDNA's. Los productos del PCR fueron ligados en un vector TOPO® (apéndice 10.7) y se amplificaron transformando *E. coli*. Se evaluó la efectividad de la transformación mediante la inserción del gen de resistencia a ampicilina. Las bacterias resistentes a dicho antibiótico son aquellas positivas a la transformación. Se colectaron todas las colonias transformadas, y se comprobó la existencia del inserto del gen de interés, para lo cual se secuenció el fragmento en la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología de la UNAM campus Querétaro.

La secuenciación se realizó mediante el empleo del ABI PRISM, 310 Genetic Analyzer. Esta herramienta de biología molecular se basa en la determinación de la secuencia

sucesiva de nucleótidos en una muestra de DNA. El método más popular para hacerlo se llama método de determinación por dideoxinucleótidos, porque utiliza nucleótidos sintéticos durante la reacción.²²

Para secuenciar una muestra de DNA, este se desnaturaliza durante 5 minutos a 94°C, debido a que el templado de DNA que se necesita para secuenciar tiene que ser de cadena sencilla.

Ya obtenida la secuencia completa de la enzima 15,15' oxigenasa de ovinos y caprinos se cuantificó la expresión del RNAm entre estas dos especies comparándola con la presente en los bovinos esto mediante la prueba de PCR cuantitativo (Tiempo real). En la parte final de este trabajo se listan a detalle la técnica empleada mediante la cual pudimos llegar a nuestros resultados de PCR cuantitativo (apéndice 10.5)

VII. RESULTADOS.

En trabajos previos ya se había obtenido la secuencia completa de la región codificante de la enzima β -caroteno 15'15, oxígenoasa de bovinos.²³ Dicho gen se ubica en el cromosoma 8. A.

La secuencia de nucleótidos encontrados en este trabajo a partir de la especie ovino (*Ovis aries*), la cual comparte un 94% de identidad con la especie *Bos taurus*.

7.1 β CMO1. *Ovis aries*

1 cagagccctg cacaatggaa attatatttg gcagaaataa gatggagaaa ctggagcctg
61 tgagggccag agtaaacagc aagattccag cctggctgca gggaaaccct ctgctccgca
121 ggcttggaaat gcacacggtg ggcgagacca gatacaacca ctggttcgat ggcttggcct
181 tgctccagag cttcaccatc agagatggtg aagtctacta caggagcaaa tacctgagaa
241 gtgataccta cactggcaat atcgaagcaa acaggattgt ggtgtcagag ttcggaacaa
301 tggcctatcc agaccctgc aaaaacatat tttccaaagc tttctcctac ctgtcccaca
361 ccatccccga tttcacagac aactgtctga tcaacatcat gaggtgcgga gaagacttct
421 atgcgaccac agaggacaat tcatcacagga ggatcaaccc ccagaccctg ggaaccctgg
481 agaaggttga ttttcgtaaa tacgtggctg taaatctggc aacatcacat cctcactacg
541 atgctgctgg aaatgttctc aacgttggtg catccatcgt ggacaagggg aagacaaaat
601 atgtgatctt taagatccct gccacagtcc cagggggcag gaaggagggc cggagcccc
661 tgaaggatgc ggaggtcttc tgttccatcg ccgcccgcct cctcctttcc ccgagctatt
721 accacagctt cggagtcacc gagaactacg tctgtttcct cgagcagcct ttcaagttgg
781 acatcctcaa gatggccacg gcctacatc ggggcgtgag ctgggcttcc tgcctggcct
841 tccacgggga ggacaagact cacatccaca tcatcgaccg aaggacgagg aagcccgtgc
901 tgaccaagta tcacacggac cccatggtgg tgtttcacca cgtcaacgcc tacgaagagg
961 acggctgcct cctgttcgat gtcacgcct atgaggacgg cagcctctac cagctcttct
1021 gcttggccaa cctgaataag gacttcaagg agaactccag gctcacctcc atgcccaccc
1081 tcaagagggt tgtgctgccc ctccacgtgg acaagaatgc agaagtgggc tccaatttaa
1141 tcaacctgac gtccacaaca gcacgagccc taaaggagaa agatggccaa gtctactgtc
1201 agccagagtt gctctatgaa ggcttagaac tgctcggat caattatgcc cacaatggaa
1261 agccataccg ctatgtcttt gcggtggag tccagtgagg ccctaggcca ttgatttacg
1321 acgcgattcg ccttgccaaa tcctccttga cgtggaaaga ggagaactgc tggccggcgg
1381 agcccctggt cgtgccaca ccaggtgcca aggactatta tgatgggatt atcttatcgg
1441 ccatagtctc taccgatccc cagaagtcgc cttttctgct ggttctcgat gccagaactt
1501 ttacggaact ggcccgtgcg tccatcgatg tggagatgca cctggatata cacgggctgt
1561 tcatcccaga cgaaggctgg gacctgggga agcaggcccc ttcccgggag gcgcccggca
1621 gggctgccgc cggacgagcg gccccaagac ctgacagcct ggaggttttg gtccctgggga
1681 acagctctgc ccagctcacg gctggccccg tcccagggca agggcaggag agtggctcctt
1741 cgtttcattt cgcatttatt ctttctgcag ctgctttgag tcaaggttga aaaacggaaa
1801 cataagtgcg aatcgatgt

Y la secuencia de nucleótidos obtenida a partir de la especie caprina (*Capra hircus*) fue la siguiente, presentando un 95% de identidad con lo reportado de *Bos taurus*.

7.2 β CMO1. *Capra hircus*.

```
1   gagccctg cacaatggaa ataatatttg gcagaaataa gaaggagcaa ctggagcctg
61  tgagggccag agtaacaggc aagattccag cctggctgca ggaaccctg ctccgcaatg
121 ggccctggaag gcacacgggtg ggcgagacca gctacaacca ctggttcgat ggccctggcct
181 tgctccacag cttcaccatc agagatggcg aagtctacta cagaagcaaa tacctgagaa
241 gtgataccta cactgccaat atcgaagcaa acaggattgt ggtgtcagaa ttcggaacaa
301 tggcctatcc agaccctgc aaaaacatat tttccaaagc tttctcctac ctgtcccaca
361 ccatccccga tttcacagac aactgtctga tcaacatcat gaggtgtgga gaagacttct
421 acgcgaccac agagaccagt tacatcagga ggatcaacc cagaccctg gaaaccctgg
481 agaaggttga ttatcgtaaa taggaggctg taaatctggc aacatcgcac cctcaatacg
541 atgctgctgg aaatgttctc aacgttgga cgtccatcgt ggacaagggg aagacaaaat
601 acgtgatctt taagatccct gcccagtc cagggggcag gaaggagggc cggagcccc
661 tgaaggacgc ggaggtcttc tgttccatcg ccgcccgc cctccttcc ccgagctatt
721 accacagctt cggagtcacc gagaactaca tcattttcct cgagcagcct ttcaagttgg
781 acatcctcaa gatggccacg gcctacattc ggggcgtgag ctgggcttcc tgccctggcct
841 tccacgggga ggacaagact cacatcctca tcatcgaccg aaggacgagg aagcccgtgc
901 tgagcaagta tcacacggac cccatggtgg tgtttcacca gctcaacgcc tatgaacagg
961 acggctgcct tcagttcgat gtcacccggt atgaggacgg cagcctctat cagctcttct
1021 gcttgccaa cctgaataag gacttcaagg agaactccag gctaacctcc gtgcccacc
1081 tcaagagggt cgtgcttccc ctccacgtgg acaagaatgc agaagtgggc tccaatttaa
1141 tcaacctgtc gtctacaaca gcacgagccc taaaggagaa agatggccaa gtctactgtc
1201 agccagagtt gctctatgaa ggcttagaac tgccctggat caattatgcc cacaatggaa
1261 agccataccg ctatgtcttt gcggctggag tccagtgagg ccctaggcca ttgatttacg
1321 ccgcgattcg ccttgccaag tcctccttga cgtggaaaga ggagcactga tggcccgtgg
1381 agcccctggt cgtgcccaca ccaggtgcca aggacgagga tgatgggatt atgttatcgg
1441 ccatagtctc taccgatccc cagaagtcgc cttttctgat ggttctcgat gccagaacgg
1501 ttacggaact ggccc
```

7.3 Alineación β CMO1 *Bos taurus* , β CMO1 *Ovis aries*, β CMO1 *Capra hircus*.

```

Ovis aries      AGAGCCCTGCACAATGGA AATTATATTTGGCAGAAATAAGATGGAGAACTGGAGCCTGT
Capra hircus   ----CCCTGCACAATGGA AATAATATTTGGCAGAAATAAGAAGGAGCAACTGGAGCCTGT
Bos taurus     -----ATGGAATAATATTTGGCAGAAATAAGAAGGAGCAACTGGAGCCTGT
                *****

Ovis aries      GAGGGCCAGAGTAAACAGCAAGATTCCAGCCTGGCTGCAGGGAAACCCTCTGCTCCGCAG
Capra hircus   GAGGGCCAGAGTAAACAGCAAGATTCCAGCCTGGCTGCAGGGAAACCCTGCTCCGCAATGG
Bos taurus     GAGGGCCAGAGTAAACAGCAAGATTCCAGCCTGGCTGCAGGGGATCCTGCTCCGCAATGG
                *****

Ovis aries      GCCTGGAATGCACACGGTGGGCGAGACCAGATACAACCACTGGTTCGATGGCCTGGCCTT
Capra hircus   GCCTGGAAGGCACACGGTGGGCGAGACCAGCTACAACCACTGGTTCGATGGCCTGGCCTT
Bos taurus     GCCTGGGATGCACACGGTGGGCGAGACCAGATACAACCACTGGTTCGATGGCCTGGCCTT
                *****

Ovis aries      GCTCCAGAGCTTACCATCAGAGATGGTGAAGTCTACTACAGGAGCAAATACCTGAGAAG
Capra hircus   GCTCCACAGCTTACCATCAGAGATGGCGAAGTCTACTACAGAAGCAAATACCTGAGAAG
Bos taurus     GCTCCACAGCTTACCATCAGAGATGGTGAAGTCTACTACAGGAGCAAATACCTGAGAAG
                *****

Ovis aries      TGATACCTACACTGGCAATATCGAAGCAAACAGGATTGTGGTGTGAGATTTCGGAACAAT
Capra hircus   TGATACCTACACTGGCAATATCGAAGCAAACAGGATTGTGGTGTGAGATTTCGGAACAAT
Bos taurus     TGATACCTACACTGGCAACATCGAAGCAAACAGGATTGTGGTGTGAGATTTCGGAACAAT
                *****

Ovis aries      GGCTATCCAGACCCCTGCAAAAACATATTTTCCAAAGCTTTCTCCTACCTGTCCCACAC
Capra hircus   GGCTATCCAGACCCCTGCAAAAACATATTTTCCAAAGCTTTCTCCTACCTGTCCCACAC
Bos taurus     GGCTATCCAGACCCCTGCAAAAACATATTTTCCAAAGCTTTCTCCTACCTGTCCCACAC
                *****

Ovis aries      CATCCCCGATTTTACAGACAACGTCTGATCAACATCATGAGGTGCGGAGAAGACTTCTA
Capra hircus   CATCCCCGATTTTACAGACAACGTCTGATCAACATCATGAGGTGCGGAGAAGACTTCTA
Bos taurus     TATCCCCGATTTTACAGACAACGTCTGATCAACATCATGAGGTGCGGAGAAGACTTCTA
                *****

Ovis aries      TCGGACCACAGAGGACAATTCATACAGGAGGATCAACCCCGAGACCCTGGGAAACCCTGGA
Capra hircus   CGCGACCACAGAGACCAGTTACATCAGGAGGATCAACCCCGAGACCCTGGGAAACCCTGGA
Bos taurus     CGCGACCACAGAGACCAGTTACATCAGGAGGATCAACCCCGAGACCCTGGGAAACCCTGGA
                *****

Ovis aries      GAAGGTTGATTTTCGTAATAACGTGGCTGTAAATCTGGCAACATCACATCCTCACTACGA
Capra hircus   GAAGGTTGATTTTCGTAATAAGGAGGCTGTAAATCTGGCAACATCGCATCCTCAATACGA
Bos taurus     GAAGGTTGATTTTCGTAATAATGTGGCTGTAAATCTGGCAACATCACATCCTCACTACGA
                *****

Ovis aries      TGCTGCTGGAAATGTTCTCAACGTTGGTACATCCATCGTGGACAAGGGGAAGACAAAATA
Capra hircus   TGCTGCTGGAAATGTTCTCAACGTTGGCAGTCCATCGTGGACAAGGGGAAGACAAAATA
Bos taurus     CGCTGCTGGAAATGTTCTCAATGTTGGCAGTCCATCGTGGACAAGGGGAAGACAAAATA
                *****

Ovis aries      TGTGATCTTTAAGATCCCTGCCACAGTCCAGGGGCGAGGAAGGAGGCGGAGCCCCCT
Capra hircus   CGTGATCTTTAAGATCCCTGCCACAGTCCAGGGGCGAGGAAGGAGGCGGAGCCCCCT
Bos taurus     CGTGATCTTTAAGATCCCTGCCACAGTCCAGGGGCGAGGAAGGAGGCGGAGCCCCCT
                *****

Ovis aries      GAAGGATGCGGAGGTCTTCTGTTCCATCGCCGCCCGCTCCCTCCTTTCCCGAGCTATTA
Capra hircus   GAAGGACGCGGAGGTCTTCTGTTCCATCGCCGCCCGCTCCCTCCTTTCCCGAGCTATTA
Bos taurus     GAAGGACGCGGAGGTCTTCTGTTCCATCGCCGCCCGCTCCCTCCTTTCCCGAGCTATTA
                *****

Ovis aries      CCACAGCTTCGGAGTCACCGAGAACTACGTCGTTTTCCTCGAGCAGCCTTCAAGTTGGA
Capra hircus   CCACAGCTTCGGAGTCACCGAGAACTACATCATTTTCTCGAGCAGCCTTCAAGTTGGA
Bos taurus     CCACAGCTTCGGAGTCACCGAGAACTACATCATTTTCTCGAGCAGCCTTCAAGTTGGA
                *****

```

Ovis aries
Capra hircus
Bos taurus
 CATCCTCAAGATGGCCACGGCCTACATTGCGGGCGTGAGCTGGGCTTCTGCCTGGCCTT
 CATCCTCAAGATGGCCACGGCCTACATTGCGGGCGTGAGCTGGGCTTCTGCCTGGCCTT
 CATCCTCAAGATGGCCACGGCTTACATTGCGGGGTGTGAGCTGGGCTTCTGCCTGGCCTT

Ovis aries
Capra hircus
Bos taurus
 CCACGGGGAGGACAAGACTCACATCCACATCATCGACCGAAGGACGCGGAAGCCCGTGT
 CCACGGGGAGGACAAGACTCACATCCTCATCATCGACCGAAGGACGCGGAAGCCCGTGT
 CCACGGGGAGGACAAGACTCACATCCACATCATCGACCGAAGGACGCGGAAGCCCGTGT

Ovis aries
Capra hircus
Bos taurus
 GACCAAGTATCACACGGACCCCATGGTGGTGTTCACCACGTCAACGCCTACGAAGAGGA
 GAGCAAGTATCACACGGACCCCATGGTGGTGTTCACCAGCTCAACGCCTATGAACAGGA
 GACCAAGTATCACACGGACCCCATGGTGGTATTCACCACGTCAATGCCTACGAGGAGGA
 ** *****

Ovis aries
Capra hircus
Bos taurus
 CGGCTGCCTCCTGTTTCATGTCATCGCCTATGAGGACGGCAGCCTCTACCAGCTCTTCTG
 CGGCTGCCTCAGTTTCATGTCATCGCCTATGAGGACGGCAGCCTCTATCAGCTCTTCTG
 CGGCTGCCTCCTGTTTCATGTCATCGCCTACCTACGAGGACGGCAGCCTCTACCAGCTCTTCTA
 ***** * *****

Ovis aries
Capra hircus
Bos taurus
 CTTGGCCAACCTGAATAAGGACTTCAAGGAGAACTCCAGGCTCACCTCCATGCCACCCT
 CTTGGCCAACCTGAATAAGGACTTCAAGGAGAACTCCAGGCTAACCTCCGTGCCACCCT
 CTTGGCCAACCTGAACGAGGACTTCAAGGAGAACTCCAGGCTCACCTCCATGCCACCCT

Ovis aries
Capra hircus
Bos taurus
 CAAGAGGTTTGTGCTGCCCTCCACGTGGACAAGAATGCAGAAGTGGGCTCCAATTTAAT
 CAAGAGGTTTCGTGCTTCCCTCCACGTGGACAAGAATGCAGAAGTGGGCTCCAATTTAAT
 CAAGAGGTTTCGTGCTTCCCTCCACGTGGACAAGAATGCAGAAGTGGGCTCCAATTTAAT

Ovis aries
Capra hircus
Bos taurus
 CAACCTGACGTCCACAACAGCAGCAGCCCTAAAGGAGAAAGATGGCCAAGTCTACTGTCA
 CAACCTGTCGTCTACAACAGCAGCAGCCCTAAAGGAGAAAGATGGCCAAGTCTACTGTCA
 CAAACTGTCGTCTACAACAGCAGCAGCCCTAAAGGAGAAAGATGACCAGGTCTACTGTCA
 *** **

Ovis aries
Capra hircus
Bos taurus
 GCCAGAGTTGCTCTATGAAGGCTTAGAACTGCCTCGGATCAATTATGCCACAATGGAAA
 GCCAGAGTTGCTCTATGAAGGCTTAGAACTGCCTCGGATCAATTATGCCACAATGGAAA
 GCCGGAGTTGCTCTGTGAAGGCTTAGAACTGCCTCACATCAATTATGCCACAATGGGCA
 *** *****

Ovis aries
Capra hircus
Bos taurus
 GCCATACCGCTATGTCTTTGCGGCTGGAGTCCAGTGGAGCCCTAGGCCATTGATTTACGA
 GCCATACCGCTATGTCTTTGCGGCTGGAGTCCAGTGGAGCCCTAGGCCATTGATTTACGC
 GCCATACCGCTATATCTTTGCTGCTGGAGTCCAGTGGAGCCCTAGGCCATTGATTTACGC

Ovis aries
Capra hircus
Bos taurus
 CGCGATTGCGCTTGCCAAATCCTCCTTGACGTGGAAAGAGGAGAACTGCTGGCCGGCGGA
 CGCGATTGCGCTTGCCAAAGTCCCTTACGTGGAAAGAGGAGAACTGCTGGCCGGCGGA
 CGCGATTGCGCTTGCCAAAGTCCCTTGACGTGGAAAGAGGAGAACTGCTGGCCGGCGGA

Ovis aries
Capra hircus
Bos taurus
 GCCCCTGTTTCGTGCCACACCAGGTGCCAAGGACTATATGATGGGATTATCTTATCGGC
 GCCCCTGTTTCGTGCCACACCAGGTGCCAAGGACGAGGATGATGGGATTATGTTATCGGC
 GCCCCTGTTTCGTGCCACACCAGGTGCCAAGGACGAGGATGATGGGATTATCTTATCGGC

Ovis aries
Capra hircus
Bos taurus
 CATAGTCTTACCAGTCCCGAAGTGCCTTTTCTGCTGGTTCTCGATGCCAGAACTTT
 CATAGTCTTACCAGTCCCGAAGTGCCTTTTCTGATGGTTCTCGATGCCAGAACTTT
 CATAGTCTTACCAGTCCCGAAGTGCCTTTTCTGCTGGTTCTCGATGCCAGAACTTT

Ovis aries
Capra hircus
Bos taurus
 TACGGAAGTGGCCCGTGGCTCCATCGATGTGGAGATGCACCTGGATATCCACGGGCTGTT
 TACGGAAGTGGCCCG-----
 TACGGAAGTGGCCCGCGCGTCCGTGATGTGGAGATGCACCTGGATTTCCACGGGCTGTT

Ovis aries
Capra hircus
Bos taurus
 CATCCCAGACGAAGGCTGGGACCTGGGGAAGCAGGCCCTTCCCGGAGGGCCGGCCAG

 CATCCCAGATGCAGGACGGACCCGGGGAAGCAGGCCCTTCCAGGAGGGCCGGCCAG

Ovis aries GGCTGCCGCCGGACGAGCGGCCCAAGACCTGACAGCCTGGAGGTTTTGGTCTGGGGAA
Capra hircus -----
Bos taurus GGCTGCCGCCGGACGTGCGGCCCAAGAACTGACAGCCTGGAGGCTTTGGTCTGGGGAC

Ovis aries CAGCTCTGCCAGCTCACGGCTGGCCCCGTCCAGGGCAAGGGCAGGAGAGTGGTCTTTC
Capra hircus -----
Bos taurus CAGCTCCGCCAGCTCACGGCTGTCCCGCCCCGGGGGAAGGGCGGGAGAGTGGTCTTTC

Ovis aries GTTTCATTTGCGATTTATTTCTTTTGCAGCTGCTTTGAGTCAAGGTTGAAAAACGGAAC
Capra hircus -----
Bos taurus GTTCCATTTGCGACATATTTCTTTCCGACGTGCTTTGAGTCAAATTTGAAACGGAAC

7.4 Alineación nucleótidos β CMO1 *Ovis aries* - β CMO1 *Capra hircus*.

Ovis aries AGAGCCCTGCACAATGGAATATATTTGGCAGAAATAAGATGGAGAACTGGAGCCTGT
Capra hircus ---CCCTGCACAATGGAATAATATTTGGCAGAAATAAGAAGGAGCAACTGGAGCCTGT

Ovis aries GAGGGCCAGAGTAAACAGCAAGATTCCAGCCTGGCTGCAGGGAAACCCTCTGCTCCGCAG
Capra hircus GAGGGCCAGAGTAAACAGCAAGATTCCAGCCTGGCTGCAGGGAAACCCTGCTCCGCAGTGG

Ovis aries GCCTGGAATGCACACGGTGGGCGAGACCAGATACAACCCTGGTTCGATGGCCTGGCCTT
Capra hircus GCCTGGAAGGCACACGGTGGGCGAGACCAGCTACAACCCTGGTTCGATGGCCTGGCCTT

Ovis aries GCTCCAGAGCTTACCATCAGAGATGGTGAAGTCTACTACAGGAGCAAATACCTGAGAAG
Capra hircus GCTCCACAGCTTACCATCAGAGATGGCGAAGTCTACTACAGAAGCAAATACCTGAGAAG

Ovis aries TGATACCTACACTGGCAATATCGAAGCAAACAGGATTGTGGTGTGAGTTCGGAACAAT
Capra hircus TGATACCTACACTGGCAATATCGAAGCAAACAGGATTGTGGTGTGAGTTCGGAACAAT

Ovis aries GGCTATCCAGACCCCTGCAAAAACATATTTTCAAAGCTTTCTCCTACCTGTCCCACAC
Capra hircus GGCTATCCAGACCCCTGCAAAAACATATTTTCAAAGCTTTCTCCTACCTGTCCCACAC

Ovis aries CATCCCCGATTTACAGACAACGTCTGATCAACATCATGAGGTGCGGAGAAGACTTCTA
Capra hircus CATCCCCGATTTACAGACAACGTCTGATCAACATCATGAGGTGCGGAGAAGACTTCTA

Ovis aries TCGACCACAGAGGACAATTCATACAGGAGGATCAACCCCCAGACCCCTGGAAACCCTGGA
Capra hircus CGCGACCACAGAGACCAGTTACATCAGGAGGATCAACCCCCAGACCCCTGGAAACCCTGGA

Ovis aries GAAGGTTGATTTTCGTAATAACGTGGCTGTAAATCTGGCAACATCACATCCTCAATACGA
Capra hircus GAAGGTTGATTATCGTAATAAGGAGGCTGTAAATCTGGCAACATCGCATCCTCAATACGA

Ovis aries TGCTGCTGGAATGTTCTCAACGTTGGTACATCCATCGTGGACAAGGGGAAGACAAAATA
Capra hircus TGCTGCTGGAATGTTCTCAACGTTGGCAGTCCATCGTGGACAAGGGGAAGACAAAATA

Ovis aries TGTGATCTTTAAGATCCCTGCCACAGTCCCAGGGGGCAGGAAGGAGGGCCGGAGCCCCCT
Capra hircus CGTGATCTTTAAGATCCCTGCCACAGTCCCAGGGGGCAGGAAGGAGGGCCGGAGCCCCCT

Ovis aries GAAGGATGCGGAGGTCTTCTGTTCCATCGCCGCCGCTCCCTCCTTTCCCCGAGCTATTA
Capra hircus GAAGGACGCGGAGGTCTTCTGTTCCATCGCCGCCGCTCCCTCCTTTCCCCGAGCTATTA

Ovis aries
Capra hircus
 CCACAGCTTCGGAGTCACCGAGAACTACGTCGTTTTCTCGAGCAGCCTTCAAGTTGGA
 CCACAGCTTCGGAGTCACCGAGAACTACATCATTTTTCTCGAGCAGCCTTCAAGTTGGA
 ***** ** *****

Ovis aries
Capra hircus
 CATCCTCAAGATGGCCACGGCCTACATTCGGGGCGTGAGCTGGGCTTCTGCCTGGCCTT
 CATCCTCAAGATGGCCACGGCCTACATTCGGGGCGTGAGCTGGGCTTCTGCCTGGCCTT

Ovis aries
Capra hircus
 CCACGGGGAGGACAAGACTCACATCCACATCATCGACCGAAGGACGCGGAAGCCCGTGT
 CCACGGGGAGGACAAGACTCACATCCTCATCATCGACCGAAGGACGCGGAAGCCCGTGT

Ovis aries
Capra hircus
 GACCAAGTATCACACGGACCCCATGGTGGTGTTCACCACGTCAACGCCTACGAAGAGGA
 GAGCAAGTATCACACGGACCCCATGGTGGTGTTCACCAGCTCAACGCCTATGAACAGGA
 ** ***** **

Ovis aries
Capra hircus
 CGGCTGCCTCCTGTTCGATGTCTCGCCTATGAGGACGGCAGCCTCTACCAGCTCTTCTG
 CGGCTGCCTCAGTTCGATGTCTCCGGTATGAGGACGGCAGCCTCTATCAGCTCTTCTG
 ***** * *****

Ovis aries
Capra hircus
 CTTGGCCAACTGAATAAGGACTTCAAGGAGAACTCCAGGCTCACCTCCATGCCACCCT
 CTTGGCCAACTGAATAAGGACTTCAAGGAGAACTCCAGGCTAACCTCCGTGCCACCCT

Ovis aries
Capra hircus
 CAAGAGGTTGTGCTGCCCTCCACGTGGACAAGAATGCAGAAGTGGGCTCCAATTTAAT
 CAAGAGGTTGTGCTGCCCTCCACGTGGACAAGAATGCAGAAGTGGGCTCCAATTTAAT
 ***** **

Ovis aries
Capra hircus
 CAACCTGACGTCCACAACAGCAGGACCCCTAAAGGAGAAAGATGGCCAAGTCTACTGTCA
 CAACCTGTCGTCTACAACAGCAGGACCCCTAAAGGAGAAAGATGGCCAAGTCTACTGTCA
 ***** **

Ovis aries
Capra hircus
 GCCAGAGTTGCTCTATGAAGGCTTAGAACTGCCTCGGATCAATTATGCCACAATGGAAA
 GCCAGAGTTGCTCTATGAAGGCTTAGAACTGCCTCGGATCAATTATGCCACAATGGAAA

Ovis aries
Capra hircus
 GCCATACCGCTATGTCTTTGCGGCTGGAGTCCAGTGGAGCCCTAGGCCATTGATTTACGA
 GCCATACCGCTATGTCTTTGCGGCTGGAGTCCAGTGGAGCCCTAGGCCATTGATTTACGC

Ovis aries
Capra hircus
 CGCGATTGCGCTTGCCAAATCCTCCTTGACGTGGAAAGAGGAGAACTGCTGGCCGGCGGA
 CGCGATTGCGCTTGCCAAAGTCCCTTGACGTGGAAAGAGGAGAACTGATGGCCCGTGGGA
 ***** **

Ovis aries
Capra hircus
 GCCCCTGTTGCTGCCACACCAGGTGCCAAGGACTATATGATGGGATTATCTTATCGGC
 GCCCCTGTTGCTGCCACACCAGGTGCCAAGGACGAGGATGATGGGATTATGTTATCGGC
 ***** *

Ovis aries
Capra hircus
 CATAGTCTTACCAGTCCCCAGAGTGCCTTTTCTGCTGGTTCTCGATGCCAGAACTTT
 CATAGTCTTACCAGTCCCCAGAGTGCCTTTTCTGATGGTTCTCGATGCCAGAACGGT
 ***** *

Ovis aries
Capra hircus
 TACGGAAGTGGCCCGTGCCTCCATCGATGTGGAGATGCACCTGGATATCCACGGGCTGTT
 TACGGAAGTGGCC-----

7.5 Secuencia de aminoácidos de la enzima β CMO1 de bovinos, ovinos y caprinos.

Aminoácidos BCM01. *Bos taurus*

MEIIFGRNKKEQLEPVRARVTGKIPAWLQGILLRNGPGMHTVGETRYNHWF DGLALLHSFTIRDGEVYR SKYLRS DTYTANIEANRIVVSE
FGTMAYPDPCKNIFSKAFSYLSHTIPDFTDNCLINIRRCGEDFYATTE TSYIRRINPQTLETLEKVD FRKYVAVNLATSHPHYDAAGNVLNV
GTSIVDKGKTKYVIFKIPAPVPGGRKEGRSPLKDTEVFC SIAAHSLLSPSYH SFGVSENYIIFLEQPFKLDILKMATAYIRGVSWASCLAF
HGEDKTHIHIIDRRTRKPVPTKYHTDPMVVFHVNAYEEDGCLLFDVIT YEDGSLYQLFYLANLNEDFKENSRLTSMPTLKR FVPLPHVDKN
AEVGSNLIKLSSTTARALKEKDDQVYCQPELLCEGLELPHINYAHNGQP YRYIFAAGVQWSPRPLIYAAIRLAKS SLLTWE EHCWPAEPLFV
PTPGAKDEDDGIILSAIVSTDPQKSPFLVL DARTFTELARASVDVEMHLD FHGLFIPDAGRDPGKQAPSQEA PARAAAGRAAPRTDSLEAL
VLGTSSAQLTAVPAPGEGRESGSPSFHFAHILSAAALSQNS ETET*X

Aminoácidos CBM01. *Ovis aries*

MEIIFGRNKMEKLEPVRARVNSKI PAWLQGNPLLRPGRMHTVGETRYNHWF DGLALLQSFTIRDGEVYR SKYLRS DTYTGNIEANRIVVSE
FGTMAYPDPCKNIFSKAFSYLSHTIPDFTDNCLINIMRCGEDFYATTE DNSYRRINPQTLG TLEKVD FRKYVAVNLATSHPHYDAAGNVLNV
GTSIVDKGKTKYVIFKIPATVPGGRKEGRSPLKDAEVFC SIAARSLSPSYH SFGVTENYVVFLEQPFKLDILKMATAYIRGVSWASCLAF
HGEDKTHIHIIDRRTRKPVLT KYHTDPMVVFHVNAYEEDGCLLFDV IAYEDGSLYQLFCLANLNKDFKENSRLTSMPTLKR FVPLPHVDKN
AEVGSNLI NLTSTTARALKEKDGQVYCPELLYEGLELPRIN YAHNGKPYRYVFAAGVQWSPRPLIYDAIRLAKS SLLTWE ENCWPAEPLFV
PTPGAKDYDGIILSAIVSTDPQKSPFLVL DARTFTELARASIDVEMHLDI HGLFIPDEGWDLGKQAPSREAPARAAGRAAPRDSLEVL
VLGNSSAQLTAGVPVPGQGQESGSPSFHFAF ILSAAALSQG*KTET*VX

Aminoácidos BCM03. *Capra hircus*

MEIIFGRNKKEQLEPVRARVTGKIPAWLQGTLLRNGPGRHTVGETSYNHWF DGLALLHSFTIRDGEVYR SKYLRS DTYTANIEANRIVVSE
FGTMAYPDPCKNIFSKAFSYLSHTIPDFTDNCLINIMRCGEDFYATTE TSYIRRINPQTLETLEKVDYRK*EAVNLATSH PQYDAAGNVLNV
GTSIVDKGKTKYVIFKIPAPVPGGRKEGRSPLKDAEVFC SIAARSLSPSYH SFGVTENYIIFLEQPFKLDILKMATAYIRGVSWASCLAF
HGEDKTHILIIDRRTRKPVLSKYHTDPMVVFHQ LNAYEQDGCLQFDVIR YEDGSLYQLFCLANLNKDFKENSRLTSPVTLKR FVPLPHVDKN
AEVGSNLI NLSSTTARALKEKDGQVYCPELLYEGLELPRIN YAHNGKPYRYVFAAGVQWSPRPLIYAAIRLAKS SLLTWE EEW*WPVEPLFV
PTPGAKDEDDGIMLSAIVSTDPQKSPFLMVL DARTVTE LAX

7.6 Alineación secuencia de aminoácidos.

secuencia 1 BCM01 *Bos taurus*.

seuencia 2 BCM01 *Ovis aries*.

secuencia 3 BCM01 *Capra hircus*.

Bos taurus ----MEIIFGRNKKEQLEPVRARVTGKIPAWLQGILLRNGPGMHTVGETRYNHWF DGLAL

Capra hircus ----MEIIFGRNKKEQLEPVRARVTGKIPAWLQGTLLRNGPGRHTVGETSYNHWF DGLAL

Ovis aries EPCTMEIIFGRNKMEKLEPVRARVNSKIPAWLQGNPLLRPGMHTVGETRYNHWF DGLAL

***** *:***** .***** * . ** ***** *****

Bos taurus LHSFTIRDGEVYRSKYLRSDTYTANIEANRIVVSEFGTMAYPDPCKNIFSKAFSYLSHT

Capra hircus LHSFTIRDGEVYRSKYLRSDTYTANIEANRIVVSEFGTMAYPDPCKNIFSKAFSYLSHT

Ovis aries LQSFTIRDGEVYRSKYLRSDTYTGNIEANRIVVSEFGTMAYPDPCKNIFSKAFSYLSHT

*:***** .*****

Bos taurus IPDFTDNCLINIRCGEDFYATTETSYIRRINPQTLETLEKVD FRKYVAVNLATSHPHYD

Capra hircus IPDFTDNCLINIMRCGEDFYATTETSYIRRINPQTLETLEKVDYRK-EAVNLATSH PQYD

Ovis aries IPDFTDNCLINIMRCGEDFYATTEDNSYRRINPQTLGTLEKVD FRKYVAVNLATSHPHYD

***** ***** . ***** *****:** *****:**

Bos taurus AAGNVLNVGTSIVDKGKTKYVIFKIPAPVPGGRKEGRSPLK DTEVFCSIAAHSLLSPSY

Capra hircus AAGNVLNVGTSIVDKGKTKYVIFKIPAPVPGGRKEGRSPLK DAEVFCSIAARSLLSPSY

Ovis aries AAGNVLNVGTSIVDKGKTKYVIFKIPATVPGGRKEGRSPLK DAEVFCSIAARSLLSPSY

***** ***** . ***** *****:** *****:**

Bos taurus HSGVSENYIIFLEQPFKLDILKMATAYIRGVS WASCLAFHGEDKTHIHII DRRTKPV

Capra hircus HSGVTENYIIFLEQPFKLDILKMATAYIRGVS WASCLAFHGEDKTHILIIDRRTKPV

Ovis aries HSGVTENYVVFLEQPFKLDILKMATAYIRGVS WASCLAFHGEDKTHIHII DRRTKPV

*****:**:**:***** *****

Bos taurus TKYHTDPMVVFHHVNAYEEDGCLLFDVITYEDGSLYQLFCLANLNEDFKENSRLTSMPTL

Capra hircus SKYHTDPMVVFHQLNAYEQDGLQFDVIRYEDGSLYQLFCLANLNKDFKENSRLTSVPTL

Ovis aries TKYHTDPMVVFHHVNAYEEDGCLLFDVIAIYEDGSLYQLFCLANLNKDFKENSRLTSMPTL

:*****:**:**:***** ***** ***** *****:** *****:**

```

Bos taurus          KRFVLPLHVDKNAEVGSNLIKLSSTTARALKEKDDQVYCQPELLCEGLELPHINYAHNGQ
Capra hircus       KRFVLPLHVDKNAEVGSNLINLSSTTARALKEKDGQVYCQPELLYEGLELPRINYAHNGK
Ovis aries         KRFVLPLHVDKNAEVGSNLINLTSTTARALKEKDGQVYCQPELLYEGLELPRINYAHNGK
                    *****:*****_***** *****:*****:
                    *****:*****:*****_***** *****:*****:

Bos taurus          PYRYIFAAGVQWSPRPLIYAAIRLAKSSLTWKEEHCWPAEPLFVPTPGAKDEDDGIILSA
Capra hircus       PYRYVFAAGVQWSPRPLIYAAIRLAKSSLTWKEEH-WPVEPLFVPTPGAKDEDDGIMLSA
Ovis aries         PYRYVFAAGVQWSPRPLIYDAIRLAKSSLTWKEENCWPAEPLFVPTPGAKDYDGIILSA
                    ****:***** *****: **_***** ****:***

Bos taurus          IVSTDPQKSPFLLVLDARTFTELARASVDVEMHLDFHGLFIPDAGRDPGKQAPSQEAPAR
Capra hircus       IVSTDPQKSPFLMVL DARTVTELAX-----
Ovis aries         IVSTDPQKSPFLLVLDARTFTELARASIDVEMHLDIHGLFIPDEGWDLGKQAPSREAPAR
                    *****:*****_****

```

7.7 Análisis Estadístico PCR cuantitativo.

Para el análisis de los resultados obtenidos en el experimento de PCR cuantitativo, se empleó un diseño estadístico completamente al azar con arreglo factorial, tomando en cuenta el número de copias del mensajero de la β CMO1.

El modelo empleado fue:

$$Y = \mu + E_i + O_j + EO_{ij} + e_{ij}$$

Donde:

Y = Variable de respuesta : número de copias del mensajero de la β CMO1;

μ = Media de la poblacional;

E_i = Efecto de especie en su i-ésimo nivel;

Oj = Efecto del órgano en su j-ésimo nivel;

EOij = interacción especie órgano

e = error experimental.

A partir de este modelo estadístico se obtuvieron los resultados que se muestran en el cuadro 3; que ilustra los niveles de expresión del RNAm para la enzima β CMO1 en tejido hepático y duodenal de bovinos, ovinos y caprinos.

Cuadro 3. Diferencias en la expresión β CMO1.

Especie / Órgano	Niveles de expresión	EE
Ovino hígado	23.162 ^{ab}	0.19
Ovino duodeno	23.054 ^{bc}	0.19
Caprino hígado	22.090 ^c	0.19
Caprino duodeno	22.802 ^c	0.19
Bovino hígado	22.597 ^c	0.19
Bovino duodeno	22.375 ^c	0.19

a, b, c indican diferencias significativas, $P < 0.01$, $n=6$

VIII. DISCUSIÓN.

8.1 Secuencia del cDNA para la enzima β CMO1 de ovinos y caprinos.

La finalización del ganado bovino en pastoreo trae como consecuencia la obtención de canales con la grasa amarilla debido a que los forrajes posee un elevado contenido de carotenoides; y como se ha explicado anteriormente los carotenoides son componentes naturales normales en forrajes verdes, dichos carotenoides dentro del organismo animal cumplen con una función primordial como provitamina A, sin embargo, al ser consumidos en concentraciones elevadas, estos carotenoides y principalmente el β -caroteno, no son metabolizados en su totalidad en el organismo animal y tienden a depositarse en el tejido adiposo.^{24, 25}

Como se ha mencionado a lo largo de este escrito, un objetivo central de este trabajo ha sido comparar la secuencia de nucleótidos de la región del codificante de la enzima β CMO1 entre especies de rumiantes domésticos y que por las características económicas del país ha sido más redituable su producción en pastoreo, además, se sabe que las cabras y los ovinos al ser alimentadas en pastoreo no pigmentan con β -caroteno y por lo tanto no presentan grasa amarilla en sus canales, por tal razón la importancia de conocer y comparar la secuencia de nucleótidos de tal enzima entre estas especies.

Aunque la coloración amarilla de la grasa de la canal por efecto de la finalización en pastoreo no afecta la calidad, ni el valor nutritivo de la carne, esto toma importancia relevante cuando se torna un problema económico, ya que dificulta la comercialización y demerita el precio de las canales de los bovinos, cuya merma es cercana al 10% de estos animales provenientes de pastoreo.²⁶ Tales pérdidas pueden alcanzar hasta 100 millones de pesos al año.²⁷

La enzima β CMO1 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 capacidad de pigmentar los tejidos hacia los cuales se distribuye y almacena posterior a ser formada.²⁸

Dicho lo anterior se decidió trabajar con muestras de hígado y duodeno puesto que se sabe que es donde más expresión existe de BCMO1.²⁸ Hasta ahora no existen reportes de trabajos que hayan realizado estudios o investigaciones sobre determinación de la secuencia de β CMO1 en ovinos y caprinos.

Tal como lo señala Morales⁽²³⁾ en las posiciones 172, 237, 308 y 513 de los aminoácidos se encuentran histidinas unidas a Fe²⁺, lo que señala la alta conservación de éstos sitios, ya que la pérdida de éstas uniones produce pérdida de actividad. Será importante comparar en un futuro los cristales de éstas proteínas, lo que permitirá dilucidar las diferencias entre las actividades de dicha enzima entre éstas tres especies de rumiantes.

8.2 Expresión de β CMO1.

Por reportes previos se sabe que esta enzima también tiene actividad en otros tejidos como riñón, ovario y testículo; sin embargo, también es importante tener en cuenta el número de copias de este mensajero, que 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 esos tejidos, y por lo tanto expresar distinta actividad por especie.^{30,31,32}

A este respecto por medio de la realización de hibridaciones *in situ* se ha observado la expresión de β CMO1 en ovario de hembras bovino, en donde dicha actividad es detectada en células de la granulosa y cuerpo lúteo, mientras que en testículo de bovino

se observó la señal de expresión en células de Leydig y Sertoli.³³ Anteriormente ensayos similares solo habían reportado la expresión en testículo de humano y ratón.^{33,34}

Tomando en cuenta nuestros resultados de PCR cuantitativo podremos comparar la expresión del mensajero para β CMO1, en duodeno e hígado que son los tejidos donde existe más expresión de este. Al analizar el hígado y el duodeno entre bovinos, ovinos y caprinos podemos decir que la expresión solo es mayor en el hígado del ovino, ligeramente menor en duodeno de ovino y resulta con expresiones iguales para hígado y duodeno de caprino y bovino, es decir que se expresa indistintamente el mensajero de β CMO1 en estas últimas especies. En éste sentido debemos recordar que la presencia del mensajero no está necesariamente relacionado con la actividad enzimática, ya que resultados anteriores mostraron que existe una mayor actividad de ésta enzima a nivel intestinal en cabras (5 veces mayor) cuando es comparada con bovinos, lo cual nos lleva a pensar que además de las diferencias en la secuencia de nucleótidos, deben existir diferencias postranccripcionales que explican los resultados obtenidos en éste trabajo y los reportes previos de la literatura.⁽³¹⁾

En los cuadros 4 y 5 se muestran las comparaciones de las regiones codificantes de la β CMO1 con otras especies no rumiantes.

Cuadro 4. Similitud β CMO1 *Ovis aries* con otras especies reportadas en el Gen Bank.

Acceso	Especie	Identidad Máxima
NM001024559.1	<i>Bos taurus</i>	94%
AC204991.6	<i>Rhesus macaque</i>	89%
XM001499593.2	<i>Eqqus caballus</i>	84%
XM546815,1	<i>Canis familiaris</i>	84%
BC126212.1	<i>Homo sapiens</i>	84%
BC125330.1	<i>Mus musculus</i>	80%

Cuadro 5. Similitud β CMO1 *Capra hircus* con otras especies reportadas en el Gen Bank.

Acceso	Especie	Identidad Máxima
NM001024559.1	<i>Bos taurus</i>	95%
AC204991.6	<i>Rhesus macaque</i>	90%
XM001499593.2	<i>Eqqus caballus</i>	85%
XM546815,1	<i>Canis familiaris</i>	84%
BC126212.1	<i>Homo sapiens</i>	84%
BC125330.1	<i>Mus musculus</i>	81%

IX. CONCLUSIONES.

- Existen diferencias en la secuencia de nucleótidos de la región codificante de la enzima β -Caroteno 15,15' oxigenasa entre la especie bovina, ovina y caprina.
- La expresión del mensajero de la enzima β -Caroteno 15,15' oxigenasa es mayor para la especie ovina ($P < 0.01$), mientras que para los bovinos y caprinos la expresión del RNAm es igual sin importar su origen.
- Las diferencias en la secuencia de nucleótidos de la región codificante de la enzima β CMO1 entre las tres especies de rumiantes estudiadas en éste trabajo no explican las similitudes en la expresión del mensajero de dicha enzima, ni las diferencias en actividad encontradas de reportes previos. Se puede pensar que dichas diferencias podrán ser atribuidas a modificaciones postranscripcionales de la β CMO1.

IX. CONCLUSIONES.

- Existen diferencias en la secuencia de nucleótidos de la región codificante de la enzima β -Caroteno 15,15' oxigenasa entre la especie bovina, ovina y caprina.
- La expresión del mensajero de la enzima β -Caroteno 15,15' oxigenasa es mayor para la especie ovina ($P < 0.01$), mientras que para los bovinos y caprinos la expresión del RNAm es igual sin importar su origen.
- Las diferencias en la secuencia de nucleótidos de la región codificante de la enzima β CMO1 entre las tres especies de rumiantes estudiadas en éste trabajo no explican las similitudes en la expresión del mensajero de dicha enzima, ni las diferencias en actividad encontradas de reportes previos. Se puede pensar que dichas diferencias podrán ser atribuidas a modificaciones postranscripcionales de la β CMO1.

X. TECNICAS EMPLEADAS.

A continuación se describen las técnicas de Laboratorio antes mencionadas de manera más detallada.

10.1 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 *B* mercaptoetanol. Homogenizar con una jeringa insulínica.
- 2.- Centrifugar el lisado por tres minutos a máxima velocidad y tomar solo el sobrenadante en un tubo nuevo.
- 3.- Agregar un volumen de etanol al 70 % al lisado homogenizado y mezclar muy bien, homogenizando.
- 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 en la misma columna secuencialmente. Eliminar el líquido del tubo colector.
- 5.- Agregar 70 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 de buffer RPE en la columna y centrifugar por dos minutos a máxima velocidad. Este paso puede repetirse para quitar cualquier residuo de etanol de la columna.
- 7.- Volver a centrifugar a máxima velocidad por un minuto.
- 8.- Transferir la columna a un tubo colector nuevo y agregar 30 μ l de agua libre de RNasa directamente en la columna. Eluir centrifugado por un minuto a 10 000 rpm.
- 9.- Leer en espectrofotómetro, para calcular la concentración del RNA.
- 10.- Almacenar en alícuotas a -70° C.

10.2 Transcripción reversa (RT).

Transcripción reversa.

- 1.- Preparar la siguiente reacción en un tubo de 500 μ l
2 mg de RNA
6 μ l de Buffer RT 5x.
0.75 μ l DNAsa.
cbp 30 μ l de agua.
- 2.- Incubar a T ambiente durante 15 minutos.
- 3.- incubar a 70 ° C durante 5 minutos.
- 4.- Añadir los siguientes reactivos
1 μ l oligonucleótido sentido (Oligo dT 5 mM)
1 μ l dNTP's (10 mM)
- 5.- Incubar a T ambiente durante 5 minutos.
- 6.- Incubar en hielo mientras se añade
2 μ l Buffer 5x.
3 μ l DTT (0.1M)
1 μ l inhibidor RNAsa.
- 7.- Homogenizar e incubar 42° C durante 2 minutos.
- 8.- Añadir 1 μ l de enzima RT-Superscript II (Invitrogen)
- 9.- Incubar a 42° C durante 50 min.
- 10.- Incubar 70° C durante 15 minutos.
- 11.- Poner el cDNA en hielo.

10.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR convencional).

1.- Preparar la siguiente reacción.

1 µl MgCl 50mM

5 µl Buffer 10x.

1 µl DNTP's 10mM

1 µl Oligo sentido (10mM)

1 µl Oligo antisentido (10mM)

3 µl cDNA.

0.5 µl Taq polimerasa (Invitrogen)

37.5 µl Agua

2.- Incubar 2 minutos a 94° C.

3.- Incubar 40 ciclos de:

45 segundos a 94° C.

1 minuto a 56° C.

1 minuto a 72° C.

4.- Incubar finalmente 2 minutos a 72° C.

5.- Mantener en refrigeración.

10.4 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.- Calentar 30 segundos en horno de microondas.

4.- Agregar 16 µl de bromuro de Etidio (0.5 mg/ml)

5.- Colocar la mezcla en el molde y dejar solidificar por 30 minutos.

6.- Aplicar las muestras en un volumen de 10µl con jugo azul 1x.

7.- Correr las muestras en el gel a 80 voltios durante 45 minutos.

8.- Observar en transiluminador. Es posible visualizar 20 ng de DNA en el gel.

9.- Fotografiar con tiempo de exposición 1 y apertura de 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.- Enjuagar 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 / formaldehido (p/30ml).

Agarosa 0.3gr

Agua 21.6 ml

MOPS 10x 3 ml

Hervir hasta solubilizar y agregar

Formaldehido 12.3 M 5.4 ml

Colocar en el molde y dejar enfriar.

Buffer de corrida.

MOPS 10x 22ml

Formaldehido 13.2 ml

Agua DEPC 184.8 ml

Preparación de la muestra

Agua + RNA 5µl (2-5 µl)

MOPS/FA 5µl (MOPS 10x 20 µl + FA 32µl + Agua 8µl)

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

Agregar

Sol. Ficoll/BBP 2 µl (loading buffer)

Bromuro de Etidio 1µl (1µg/µl)

Centrifugar 10 segundos

Colocar la muestra en el gel y correr a 80 voltios por 45 minutos

Observar en el 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

30µl Ficol

10µl Azul de bromofenol saturado

Buffer MOPS 10x

20g MOPS

25ml Acetato de Na 1M, pH 6

10 ml EDTA 0.5 M, pH 8

450 ml Agua.

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

10.5 PCR Cuantitativo.

RNA amplificación 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	4µl
Solución de resolución	2µl
Mezcla de oligonucleótidos (0.5mM)	2µl
Mezcla de enzima (RT-PCR)	0.4µl
Cloruro de Magnesio 25mM	1µl
RNA total	500 ng
Agua	cbp 20 µl

2.- Mezclar los ingredientes de la reacción y centrifugar para bajarlos.

3.- Colocar los capilares en el rotor.

4.- Amplificar en el 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

72° 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 de usuario del Termociclador Light Cycler, Roche).

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

- 1.- Poner 5µl (200 ng) del DNA ligado al vector de interés en 50 µl de células competentes *E. coli* X-L 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 µl de medio Luria-Broth estéril.
- 6.- Incubar 30 minutos a 37° C en agitación.
- 7.- Sembrar de 80 – 120 µl de medio en cajas de medio de cultivo Agar-LB con ampicilina.
- 8.- Incubar a 37° C durante no más de 20 horas.
- 9.- Seleccionar las clonas positivas.

10.7 Clonación en Vector y Células TOPO (TOPO TA Cloning Kit for Sequencing, Invitrogen).

Material extra no incluido en el Kit.

- Baño maria a 42° C.
- Células de medio LB con 50-100µg/ml de ampicilina.

Preparación.

- Se necesita un vial de células competentes y dos cajas de cultivo para cada transformación.
- Equilibrar el baño maria a 42° C.
- Poner el vial de medio SOC de la caja dos 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 5 µl
Solución salina	1 µl
TOPO vector	1 µl
Agua estéril	cbp 5 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 de 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 clonas estén bien espaciadas.
- 8.- Una reacción eficiente produce cientos de colonias. Tomar aproximadamente 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.
- 2.- Aislar el plásmido de DNA.
- 3.- Digerir el plásmido con EcoR1 y proceder a secuenciar (ver mapa del vector).

10.8 Digestión enzimática del DNA.

- Se emplean enzimas de restricción que generalmente se encuentran a 10 U µl.
- En promedio se requiere: 3U de enzima/µg de DNA a cortar, evitando que la cantidad de enzima en la reacción sea mayor del 10% del volumen final, por que contiene glicerol que puede inhibir la reacción.
- Para preparar la reacción se debe colocar los reactivos en un tubo de 500µl en el siguiente orden

- 1.- H₂O
- 2.- Buffer (10x)
- 3.- DNA
- 4.- Enzima de restricción

- La reacción se incuba durante dos horas en baño maria a 37° C.
- Al final se recomienda correr un gel, para asegurarnos que la reacción se haya llevado a cabo completamente, descartando así digestiones parciales.

10.9 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 (1U/ 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 está ligando extremos romos, se usa a 37° C.

XI. LITERATURA CITADA.

1. [www.fao.org.mx/Nutrición humana en el mundo en desarrollo](http://www.fao.org.mx/Nutrición%20humana%20en%20el%20mundo%20en%20desarrollo), 2002.
2. Frye T, Williams S & Graham T. Vitamin deficiencies in cattle. *Vet Clin North Am Food Anim. Pract.* 1991. 7(1):217-275.
3. Millemann Y, Benoit-Valiergue H, Bonnin J-P, Fontaine J-J & Maillard R. Ocular and cardiac malformations associated with maternal hypovitaminosis A in cattle. *Vet. Rec.* 2007. 160: 441-443.
4. Blamhoff R & Blamhoff H. Overview of retinoid metabolism and function. *J Neurobiol.* 2006. 66: 606-630.
5. Olson JA, Hayaishi O. The enzymatic cleavage of β -carotene into vitamin A by soluble enzymes of rat liver and intestine. *PNAS.* 1965. 54; 1364 – 1370.
6. Gross J. *Pigments in fruits.* Academic Press. 1987. 303p.
7. Sulik KK, Cook CS & Webster WS. *Teratogens and craniofacial malformations.* 1988.
8. Madem M. Vitamin A in embryonic development. *Nutr. Rev;* 1994. 52: s3-12.
9. www.siap.sagarpa.gob.mx
10. Tee ES. Carotenoids and retinoids in human nutrition. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1992. 31: 103-163.
11. Delgado VF, Jiménez AR & Paredes LO. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains. Characteristics, biosynthesis, processing and stability. *Crit Rev Food. Sci Nut.* 2000. 40: 173-289.
12. Goodwin TW. *Biochemistry of carotenoids.* Vol 1. Plants. 2nd ed. Chapman & Hall, New York. 1992. 1-95.
13. Yang A, Larsen TW & Tume RK. Carotenoids and retinol concentrations in serum, adipose tissue and liver and carotenoid transport in sheep, goats and cattle. *Aust J Agric Res.* 1992. 43: 1809-1817.
14. Yan W, Jang GF, Haeseleer F, Esumi N, Chang J, Kerrigan M, Campiochiario M, Campiochiario P, Palczewski K & Zack DJ. Cloning and characterization of a human beta,beta-15,15'-dioxygenase that is highly expressed in the retinal pigment epithelium. *Genomics.* 2001. 72 193-202.
15. Paik J, During A, Harrison EH, Mendelssohn CL, Lai K & Blaner WS. Expression and characterization of a murine enzyme able to cleave β -carotene: the formation of retinoids. *J. Biol. Chem.* 2001. 276; 32160 – 23168.
16. Redmonton TM, Gentleman S, Duncan T, Yu S, Wiggert B, Gantt E & Cunningham FX. Identification, expression and substrate specificity of a mammalian beta-carotene 15,15'-oxygenase. *J. Biol. Chem.* 2001.276; 6560 – 6565.
17. Judy D, Ribaya-Mercado, ScD, and Jeffrey B, Blumberg, PhD. Vitamin A: Is it a Risk Factor for Osteoporosis and Bone Fracture?. *Nutrition Reviews*, 2007. Vol. 65, No. 10.
18. Olson JA, Shilis ME, Shike M & Ross AC. *Modern Human Nutrition in Health and Disease.* 1998. Pp 525-541.
19. Leuenberg MG, Engeloch-Jarret C & Woogon WD. The reaction mechanism of the enzyme-catalyzed central cleavage of beta-carotene to retinal. *Angew. Chem. Int. Ed, Engl.* 2001. 40; 2613 – 2617.

20. Nezzar H, Chiambaretta F, Marceau G, Blanchon L, Faye B, Dechelotte P, Rigal D, Vincent S. Molecular and metabolic retinoid pathways in the human ocular surface. *Molecular Vision*. 2007.
21. Wu Q, Dawson M, Zheng Y, Hobbs P, Agadir A, Jong L, Li Y, Liu R, Lin B & Zhang XK. Inhibition of trans-Retinoic Acid-Resistant Human Breast Cancer Cell Growth by Retinoid X Receptor-Selective Retinoid. *Molecular and cellular biology*. 1997. 6595 – 6608.
22. Antaramian A, Gonzalez A, Martin C & Sandoval J. Introducción a la Biología Molecular. Unidad de Proteogenómica. Instituto de Neurobiología. UNAM. 2007.
23. Morales A, Rosas A, González A, Antaramian A, Varela-Echavarría A, Shimada A & Mora O. Cloning of the bovine β -carotene-15,15'-Oxygenase and expression in Gonadal Tissues. FESC-UNAM. Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Querétaro. 2005.
24. Morgan JHL, Pickering FS & Everitt GC. Some factors affecting yellow fat colour in cattle. *Proc. New Zeland. Soc Anim*. 1969. *Prod*. 29: 164-175.
25. Yang A, Larsen TW & Tume RK. Effect of Vitamin E supplementation on α -tocopherol and β -carotene concentrations in tissues from pasture and grain-fed cattle. 2002. *Meat Sc*, 60: 35-40.
26. Baron GS. Variación estacional en la coloración del tejido adiposo bovino y su impacto en la ganadería tropical. (Tesis de Maestría). FESC-UNAM 79p. 2001.
27. Mora O & Shimada MA. Causas del color amarillo de la grasa de canales de bovinos finalizados en pastores. 2001. *Vet. Mex*. 32: 63-71.
28. Lindsvist A & Andersson S. Biochemical properties of purified recombinant human beta-carotene 15,15' monooxygenase. *J. Biol. Chem*. 2002. 277: 23942-23948.
29. Kieffer C, Hessel S, Lampert JM, Vogt K, Lederer MO, Breithaupt DE & von Lintig J. Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A. *J. Biol. Chem*. 2001. 276: 14110-14116.
30. Mora O, Romano J L, Gonzalez E, Ruiz F J & Shimada A. Low cleavage activity of 15,15'-dioxygenase to convert β carotene to retinal in cattle comparete with goats, is associated with the yellow pigmentation of adipose tissue. *Int. J. Vit. Nutr. Res*. 2000. 70: 199-205.
31. Paik J, Vogel S, Quadro L, Piantedosi R, Gottesman M, Lai K, Hamberger L, de Moraes Vera M & Blaner WS, Vitamin A: Overlapping delivery pathways to tissues from the circulation. *J. Nutr*. 2004. 134: 276s-280s.
32. Wyss A, Wirtz GM, Waggon WD, Brugger R, Wyss M, Friedlein A, Riss G, Brachmann H & Hunziker W. Expression pattern and localization of β , β -carotene 15,15'-dioxygenase in different tissues. 2001. *Biochem. J*. 354: 521-529.
33. Harada H, Mki R, Mashushige S, & Kato H. Gene Expression of Retinoic Acid Receptors, Retinoid-X Receptors, and Cellular Retinol-Binding Protein I in Bone and Its Regulation by Vitamin A. *The endocrine Society*. 1995.
34. Reilly K, Bailey S & Lane M. Retinoid-Mediated Regulation of Mood: Possible Cellular Mechanisms. *Society for Experimental Biology and Medecine*. 2008.