

Importancia de la expresión y actividad de la β -caroteno 15,15' monooxigenasa y la vitamina A. Su papel en la producción animal. Revisión

E. García-López, M. O. Mora Izaguirre¹

Programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal,
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México.
Recibido Junio 23, 2011. Aceptado Marzo 02, 2012.

Importance of the expression and activity of β -carotene 15, 15' monooxygenase and vitamin A. Its role in animal production. A Review.

ABSTRACT. β -carotene, one of the most common carotenoids in the diet of domestic animals, is transformed into vitamin A by the enzyme β -carotene-15, 15' monooxygenase, with a conversion efficiency that depends on the animal species, among other factors. The domestic chicken is one of the most efficient converters of β -carotene into vitamin A. Among ruminants, bovines effect this conversion with five times less efficiency than goats, which explains in large part the differences in fat color between these species. The present review focuses on the main characteristics of the carotenoids and their metabolism in ruminants and non-ruminants, on the conversion of β -carotene to retinoids and other apocarotenoids by the two proposed models of central line and eccentric way; on different forms of vitamin A and their activity in the cells; and on regulation of the expression and activity of the enzymes β -carotene-15, 15 'monooxygenase. The intent of the authors is to highlight the importance of this enzyme in the conversion of β -carotene to vitamin A and in energy metabolism, which have an impact on animal production.

Key words: Animal production, BCMO1, Carotenoids, Vitamin A,

RESUMEN. El β -caroteno, uno de los carotenoides más comunes en la dieta de los animales domésticos, se transforma en vitamina A por la enzima β -caroteno-15, 15' monooxigenasa, con una eficiencia de conversión que depende de la especie animal, entre otros factores. El pollo doméstico es una de las especies más eficientes en dicha conversión. Entre los rumiantes, los bovinos realizan esta conversión con cinco veces menos eficiencia que los caprinos, lo que explica en gran medida las diferencias entre estas especies en el color de su grasa. En esta revisión se enfoca las principales características de los carotenoides y su metabolismo en rumiantes y no rumiantes; la conversión de β -caroteno en retinoides y otros apocarotenoides mediante los dos modelos propuestos, la vía central y la vía excéntrica; las diferentes formas de vitamina A y su actividad en las células; y la regulación de la expresión y actividad de la enzima β -caroteno-15,15' monooxigenasa. Los autores procuraron remarcar la importancia de esta enzima en la conversión de β -caroteno en vitamina A y en el metabolismo energético con repercusión en la producción animal.

Palabras Clave: BCMO1, Carotenoides, Producción animal, Vitamina A

¹Autor para la correspondencia, e-mail: ofemora2001@yahoo.com.mx

Introducción

El color y la apariencia son el primer contacto que tiene el consumidor con un alimento, condicionando sus preferencias e influenciando su elección. El color está relacionado con las cualidades sensoriales y la composición química, por lo tanto, éste es uno de los factores que define la calidad de un producto alimentario (OIE, 2003; Minguez *et al.*, 2005). Entre los pigmentos vegetales contenidos en frutas y vegetales se encuentran el β -caroteno y la luteína. Estos pigmentos son importantes en la dieta de los animales por su contribución como precursores de vitamina A y en el caso particular de la luteína, por su capacidad pigmentante en las aves. En bovinos, el principal pigmento responsable de dicho color es el β -caroteno y en segundo grado la luteína (Barrón-Gutiérrez *et al.*, 2004). Estos carotenoides pueden además de dar color, actuar como antioxidantes frente a radicales libres de muy diversa naturaleza y origen, inhiben el proceso de auto-oxidación lipídica, por lo que su presencia en las membranas celulares evita los consecuentes procesos detrimentales a nivel celular, entre otras actividades (Minguez *et al.*, 2005). Los animales acumulan carotenoides en sus tejidos a través de la ingestión de estos compuestos, pero en casos particulares como en bovinos engordados en pastoreo, la pigmentación amarilla del tejido adiposo limita su comercialización debido al rechazo del producto por los consumidores, quienes perciben que la carne proviene de animales viejos o de desecho (Barrón-Gutiérrez *et al.*, 2004). En esta revisión se abordan las características de los principales carotenoides, la importancia de la expresión y actividad de la enzima β -caroteno 15, 15' monooxigenasa (BCMO1), enzima responsable de formación de vitamina A. Se mencionan las diferentes formas de la vitamina A y su actividad a nivel celular. Se abordan los temas de la regulación de la expresión y de la actividad de la BCMO1, con lo que se busca remarcar la importancia

de esta enzima en la conversión de β -caroteno a vitamina A y en el metabolismo, lo que tendrá una repercusión en la producción animal.

Carotenoides

En 1837, Berzelius llamó xantofilas a los pigmentos amarillos de hojas de otoño, los cuales fueron solubles en alcohol. Posteriormente, en 1944 con la separación cromatográfica de estos pigmentos, Tswett mostró que son una compleja mezcla de "policromos", los cuales se dividieron en dos grupos: uno soluble en hidrocarburos llamado "carotenos" y el otro, poco soluble en ese solvente pero soluble en etanol denominado "xantofilas". Las dos clases fueron agrupadas juntas bajo el término general de "carotenoides" (Goodwin, 1954).

Según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés), el término carotenoide es usado para todas las estructuras poliisoprenoides con dobles enlaces conjugados (Allen, 1964) y se aplica a un gran número de compuestos liposolubles que colorean de amarillo a rojo (su espectro de luz visible se encuentra entre 400 a 500 nm). La coloración de estos compuestos se debe a la presencia de una serie de dobles enlaces en posición trans (IUPAC, 1974; Delgado *et al.*, 2000).

Todos los carotenoides son derivados del licopeno (Goodwin, 1992) con estructura acíclica de $C_{40}H_{56}$ (IUPAC, 1974; Goodwin, 1992).

Los carotenoides son compuestos formados de ocho unidades isoprenoides (hidrocarburo de cinco átomos de carbono), cuyo orden es invertido desde el centro de la molécula (Delgado *et al.*, 2000), su estructura general es de tipo alifática o acíclica alifática (Karrer y Jucker, 1948; IUPAC, 1974; Minguez *et al.*, 2005; Sadmann, 2006). La fórmula de los carotenoides se escribe y se enumera como se presenta en la Figura 1. La molécula se toma como un dímero y la mitad izquierda se numera comenzando por el carbono que se enlaza a dos

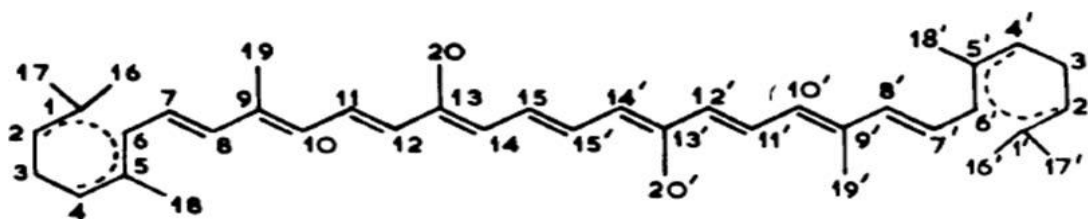


Figura 1. Estructura general de los carotenoides.

Tomado de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada y la Unión Internacional de Bioquímica, 1974.

metilos y se prosigue de manera lineal hasta el carbono 15, luego se procede a numerar los metilos de izquierda a derecha hasta el número 20. La mitad derecha se numera de manera homóloga de derecha a izquierda con numeración primada (Figura 1).

Entre 600 (Yeum y Russell, 2002; Sadmann, 2006) y 700 (Minguez *et al.*, 2005) carotenoides han sido aislados y caracterizados hasta el momento. La diversidad exhibida por los carotenoides se da por diferentes cambios químicos en las moléculas, entre los que se observan la ciclización, migración de dobles enlaces, hidrogenación parcial, introducción de grupos hidroxilo, cetónico o metoxilo e incluso introducción de puentes de oxígeno, elongación o acortamiento de la cadena, etc. (Karrer y Jucker, 1948; IUPAC, 1974; Goodwin, 1992; Clydesdale, 2000; Sadmann, 2006). En la Figura 2 se muestra la estructura química de los carotenoides más importantes en la producción animal, entre los que se destacan el β -caroteno y la luteína.

Los carotenoides son responsables del color en algunas especies de diatomeas (Bertrand, 2010), levaduras y bacterias (Simpson, 1983; Choi *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2009) hongos y frutas (Minguez *et al.*, 2005; Bertrand, 2010; von Lintig, 2010).

Aunque los animales son incapaces de sintetizarlos *de novo*, sí pueden depositar el pigmento que absorben, tal cual o con alguna alteración de la estructura básica (Simpson, 1983; Deming y Erdman, 1999; Sammer *et al.*, 2001). El color entre rojo y amarillo en la carne, piel, grasa y/o exoesqueleto del camarón, salmón, cangrejo, langosta, carpa o flamenco es debida a los carotenoides contenidos en el alimento; el pollo de engorda utiliza luteína para pigmentar la piel provocando una coloración amarilla. En la producción animal los carotenoides se han usado para pigmentar la piel y la yema del huevo de las aves (Hammershøj *et al.* 2010), para mejorar la respuesta inmune (β -caroteno y luteína), para aumentar la calidad del semen (luteína) (Mangiagalli y Martínez, 2010), para mejorar la calidad de los embriones (β -caroteno en combinación con vitamina E) (Sales *et al.*, 2008) e incluso como predictores del sistema de alimentación de donde provienen los animales (Röhrle *et al.*, 2011).

En el caso de los bovinos la acumulación de β -caroteno, proveniente de los forrajes, resulta detrimental para la comercialización de las canales (Simpson, 1983; Mora y Shimada, 2001; OIE, 2003; Barrón-Gutiérrez *et al.*, 2004; Minguez *et al.*, 2005).

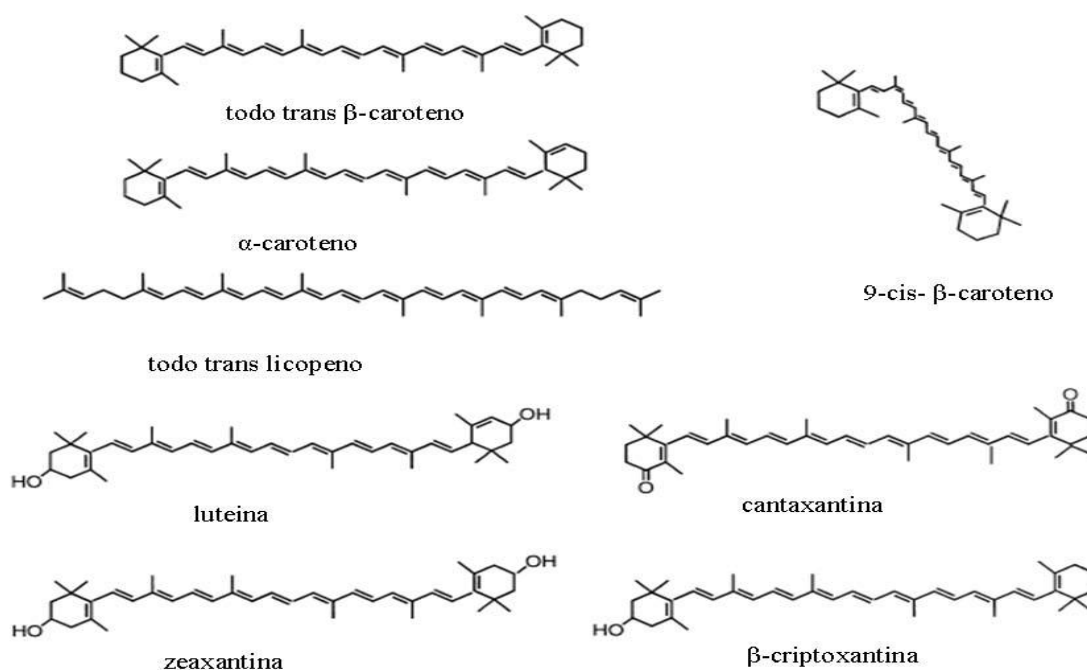


Figura 2. Estructuras de carotenoides comunes. Carotenos: todo trans β -caroteno, α -caroteno, todo trans licopeno, 9-cis- β -caroteno, 13-cis- β -caroteno; xantofilas: luteína, zeaxantina, cantaxantina, β -criptoxantina

Tomado de During, A., H. Earl and E. H. Harrison, 2004. Intestinal absorption and metabolism of carotenoids: insights from cell culture. Arch. Biochem. Biophys. 430:77.

El 90% de los carotenoides circulantes y absorbidos en humanos incluyen al β -caroteno, licopeno, luteína, zeaxantina y β -cryptoxantina. Otros carotenoides tales como violaxantina y neoxantina son comunes en la dieta humana pero no se observa absorción en las mismas proporciones que los carotenoides antes mencionados, implicando que el primer nivel de selección específica para la absorción ocurre en el intestino (Bhosale y Bernstein, 2007).

Los mecanismos para la selectiva afinidad de los carotenoides, aun no está completamente entendido, aunque las proteínas de unión a los carotenoides juegan un importante papel en la acumulación de estos compuestos en los tejidos. Estas proteínas pueden actuar como receptores celulares de superficie, transportadores transmembranales, enzimas metabólicas, mediadores biológicos actuando como ligando ó en los sitios de deposición y estabilización del ligando (Bhosale y Bernstein, 2007).

Metabolismo de los carotenoides en animales

En el lumen intestinal, los carotenoides se encuentran mezclados con otros lípidos dentro de las micelas (Deming y Erdman, 1999; Mora y Shimada, 2001; Minguez *et al.*, 2005). En animales no rumiantes, se ha observado que en función del tipo de grasa ingerida, la eficiencia en la absorción cambia. Los triglicéridos de cadena corta o media producen una absorción reducida, mientras que los triglicéridos de cadena larga la aumentan. Elementos como la fibra y los sustitutos de las grasas (como los poliésteres de glucosa) interfieren con su absorción (Minguez *et al.*, 2005).

Respecto al metabolismo o degradación ruminal de los carotenoides, Mora (2001) determinó que la tasa de desaparición de β -caroteno a nivel ruminal está asociada a la tasa de desaparición de la materia seca y del contenido celular; también descarta al rumen-retículo como un lugar en el que exista una alta degradación (utilización por los micro-organismos ruminales) de β -caroteno. Por ello se descarta que la diferencia encontrada en la pigmentación de la grasa de bovinos y cabras, sea debido a cambios del β -caroteno en el rumen-retículo (Mora, 2001).

El β -caroteno, al ser una molécula no polar, se localiza hidrofóbicamente al centro de las micelas, mientras que las xantofilas se acumulan en la superficie debido a sus grupos polares (Deming y Erdman, 1999). El proceso de absorción requiere que la micela se emulsifique, alcance al enterocito y libere a los carotenoides y a los otros lípidos dentro de la célula (Deming y Erdman, 1999). En bovino, una vez dentro del enterocito, del 5 al 7% del β -caroteno absorbido es convertido en vitamina A. Incluso, si la concentración de carotenoides

aumentan, el porcentaje convertido a vitamina A se mantiene en niveles proporcionalmente bajos, lo cual es debido a la estructura del sitio activo de la BCMO1 en esta especie, que será explicado posteriormente. El resto de los carotenoides y los lípidos de la micela pasan a la sangre sin sufrir modificaciones y se incorporan en los quilomicrones. Estos carotenoides pueden ser depositados en diferentes órganos y tejidos, como hígado o tejido adiposo principalmente, así como en pulmón, riñón, piel y medula espinal (Deming y Erdman, 1999; Mora y Shimada, 2001; Minguez *et al.*, 2005).

No hay evidencia de que exista circulación sanguínea de β -caroteno en ratas, cerdos, pollos, cuyes, cabras, borregos y conejos, debido a una conversión más eficiente a vitamina A (Mora, 1998).

Además de sustrato para la formación de vitamina A, los carotenoides actúan como antioxidantes, por ejemplo, protegiendo a los fotoreceptores de la apoptosis inducida por estrés oxidativo en la retina (Chucair *et al.*, 2007), participan en la prevención de la obesidad, del cáncer, de las enfermedades degenerativas y son importantes en procesos biológicos tales como la reproducción, el desarrollo embrionario, la diferenciación celular y la inmunidad (Mayne *et al.*, 1996; Minguez *et al.*, 2005; Römer y Fraser, 2005; Sadmann, 2006; Nagao, 2009; von Lintig, 2010), además de intervenir en el control del metabolismo. Esto último se debe a que la vitamina A es ligando de los receptores nucleares denominados receptores de ácido retinoico (RAR) y receptor X de retinoides (RXR) (Kloer y Schulz, 2006; von Lintig, 2010).

La capacidad de conversión a vitamina A de los diversos carotenoides es variable; por ejemplo β -caroteno tiene 100% de actividad provitamina A mientras la luteína no es convertida en vitamina A (Simpson, 1983). En el Cuadro 1 se muestran diferentes carotenoides y su actividad de provitamina A.

Si se logra advertir las diferencias en el metabolismo de los carotenoides, tanto en no rumiantes como en rumiantes, esto permitirá la futura formulación de dietas con compuestos específicos para cada especie y aportar el carotenoide indicado para inducir los procesos biológicos deseados.

Conversión de β -caroteno a vitamina A

Se han propuesto dos vías oxidativas (ver Figura 3) para la conversión de β -caroteno a vitamina A (Allen y Hayaishi, 1965; Allen, 1989; Mora y Shimada, 2001; Kloer y Schulz, 2006):

1) Ruptura central, la cual ocurre en el doble enlace central 15, 15'. El producto de este tipo de

Cuadro 1. Tipos representativos de carotenoides y apocarotenoides con actividad de pro vitamina

Carotenoides	Actividad (%)
β -caroteno	100
Neo- β -caroteno	38
α -caroteno	50-54
Neo- α -caroteno	13
3, 4,-Dehidro- β -caroteno	75
3, 4, 3'-4'-Bisdehidro- β -caroteno	38
γ -caroteno	42-50
7, 8'-Dihidro- γ -caroteno	20-40
β -caroteno-5', 6'-epoxido	21
α -caroteno-5, 6-epoxido	25
β -caroteno-5, 6, 5', 6'-diepoxido	Activo
3-ceto- β -caroteno	52
3-hidroxi- β -caroteno	50-60
4-hidroxi- β -caroteno	48
β -Apo-2'-carotenal	Activo
β -Apo-8'-carotenal	72
β -Apo-10'-carotenal	Activo
β -Apo-12'-carotenal	120
Licopeno	Inactivo
Luteína	Inactivo

Adaptado de Simpson (1983).

división son dos moléculas de retinal debido a la actividad enzimática de la BCMO1.

2) Ruptura excéntrica, que puede ocurrir en uno o más de los otros dobles enlaces. Sus productos pueden ser un β -apo-carotenal largo y otro corto; por ejemplo, ciclocitral y β -apo-8'-carotenal, si acaso la ruptura ocurriera en el doble enlace 8'. Experimentalmente se ha demostrado que los β -apocarotenales pueden ser convertidos a β -caroteno. La enzima responsable se denomina β -caroteno 9', 10-oxigenasa (BCMO2).

A mediados de los años 50's se dio la primera descripción de la actividad enzimática para producir vitamina A (Lindqvist y Andersson, 2002). Allen y Hayaishi (1965), encontraron que la enzima requiere oxígeno para llevar a cabo la reacción por lo que tentativamente la denominaron como β -caroteno 15, 15' oxigenasa.

Wyss (2004) menciona que la primera denominación formal de la enzima que produce escisión del β , β -caroteno, fue β -caroteno 15, 15' dioxigenasa (EC 1.13.11.21), tratándose de un mecanismo de dioxigenasa. En trabajos más recientes, como los de Leuenberger *et al.* (2001) y Lindqvist y Andersson (2002), al usar una preparación de β -caroteno 15, 15' dioxigenasa parcialmente purificada de intestino de pollo y β -caroteno, se mostró que sólo una molécula

de oxígeno es incorporada en cada una de las moléculas de retinal producidas. Como resultado, la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular cambió la clasificación de esta enzima a EC 1.14.99.36 y su denominación a β -caroteno 15, 15' monoxigenasa (Leuenberger *et al.*, 2001; Lindqvist y Andersson, 2002). La Figura 4 muestra los dos mecanismos para la división central del β -caroteno que han sido propuestos.

Para determinar la ubicación de la BCMO1 se realizó inmunohistoquímica. Los resultados mostraron que esta enzima se expresa en células epiteliales en varios tejidos, incluyendo retina, células glandulares y de mucosa de estómago, intestino delgado, hígado, próstata, endometrio, tejido mamario, células tubulares de riñón, piel, testículo, ovario, glándula adrenal, colon, así como células de músculo esquelético (Morales, 2006; Kim *et al.*, 2007; 2009; Kim y Oh, 2010; Lietz, 2010; von Lintig, 2010); de pollo, ratón, *Drosophila* (Wyss, 2004), humano (Wyss, 2004; Kim y Oh, 2010), ratas, cerdos, conejos, hurones, gerbos, cabras y bovinos (Mora y Shimada, 2001). Las células epiteliales en general son sensibles a la deficiencia de vitamina A, por lo que la actividad de la BCMO1 puede ser de gran importancia para este tipo celular (von Lintig, 2010).

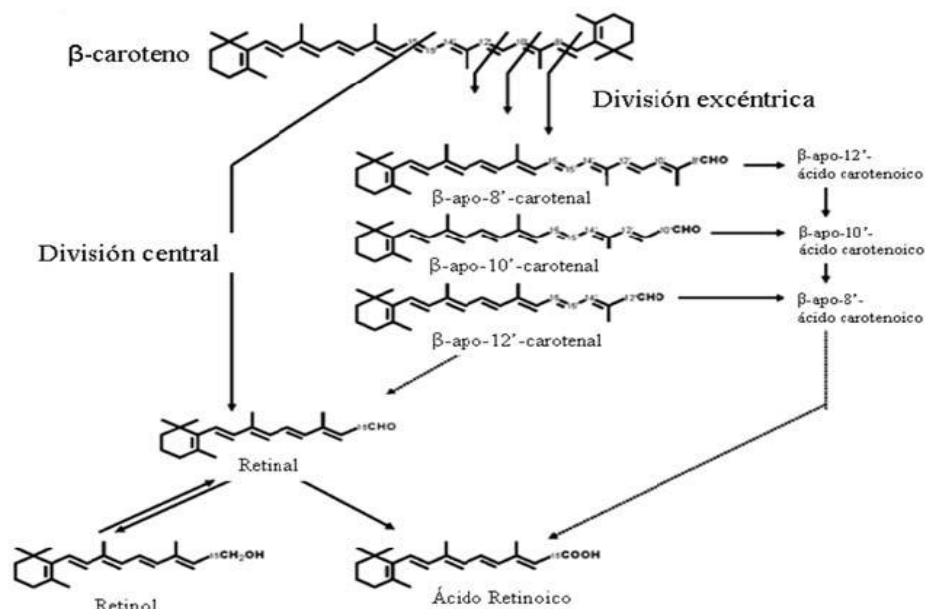


Figura 3. Las principales vías oxidativas en el metabolismo del β-caroteno, división central y excéntrica.

Tomado de During, A., H. Earl and E. H. Harrison. 2004. Intestinal absorption and metabolism of carotenoids: insights from cell culture. Arch. Biochem. Biophys. 430:77.

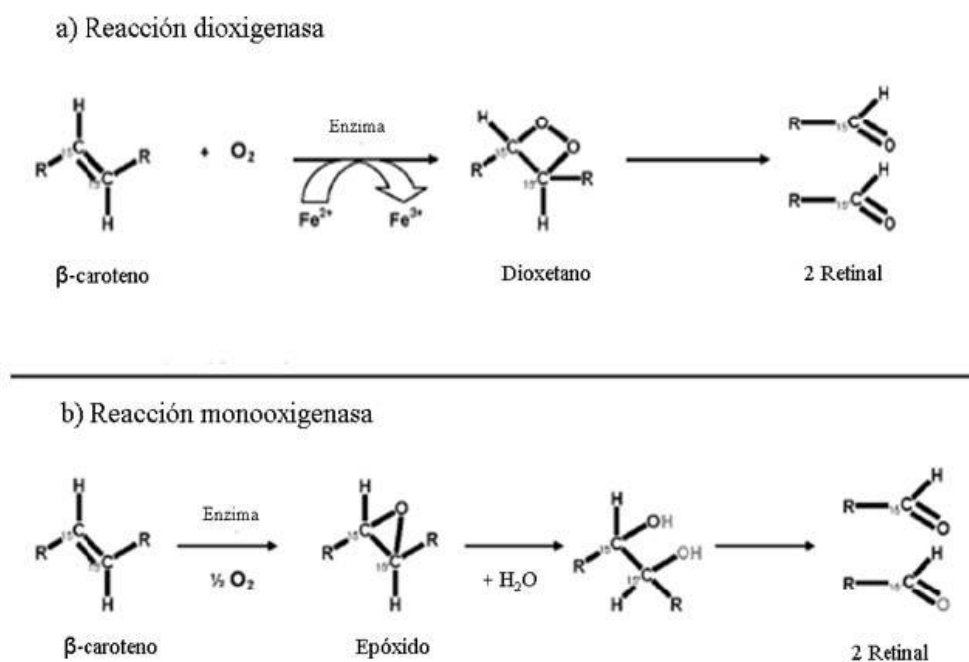


Figura 4. Posibles mecanismos para la división central del β-caroteno.

Tomado de During, A., H. Earl and E. H. Harrison. 2004. Intestinal absorption and metabolism of carotenoids: insights from cell culture. Arch. Biochem. Biophys. 430:77.

Posteriormente se purificó parcialmente la BCMO1 de intestino e hígado de pollo, ratón, *Drosophila* (Wyss, 2004), humano (Wyss, 2004; Kim y Oh, 2010), ratas, cerdos, conejos, hurones, gerbos (Mora y Shimada, 2001), cabras y bovinos (Mora y Shimada, 2001; Álvarez, 2009).

Así mismo, se ha informado la clonación molecular, expresión y caracterización de la BCMO1 en varias especies, incluyendo pollos, mosca de la fruta, humano, ratón, pez cebra, bovino y una bacteria marina denominada 66A03 (Mora y Shimada, 2001; Kim *et al.*, 2009; Kim y Oh, 2010), para determinar si existen diferencias en la forma y función de la misma entre las especies.

Wyss (2004) menciona que Glover *et al.*, (1960), Ganguly *et al.*, (1977), Krinsky *et al.*, (1991), Hansen y Meret (1998), y Sharma *et al.* (1976) sugirieron que, además de la división central del β -caroteno, la división excéntrica es otra vía para la producción de vitamina A (von Lintig y Wyss, 2001; Lakshman, 2004). Tanto von Lintig y Wyss, (2001) como von Lintig y Vogt (2004) citan que Wang *et al.* (1991) proveen evidencia, tanto *in vitro* como *in vivo*, de la formación de apocarotenales y vitamina A a partir de la división del β -caroteno con BCMO2. Incluso se llegó a proponer que los apocarotenales formados por la división excéntrica se acortan subsecuentemente por un mecanismo similar a la β -oxidación, resultando en la formación de una molécula de vitamina A por molécula de β -caroteno (von Lintig y Wyss, 2001; Wyss, 2004).

Recientemente Kloer y Schulz (2006) clonaron la BCMO2 de ratón, pez cebra y humano para su estudio; asimismo Kiefer *et al.*, 2001, publicaron la caracterización molecular y la clonación de la BCMO2 de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) y en *Escherichia coli* (E. coli). Estos estudios realizados con la BCMO2 permiten tener una mejor herramienta para investigar el mecanismo para la formación de vitamina A por una vía alterna. Debido a que los retinoides biológicamente activos promueven la diferenciación celular *in vivo* son generalmente sintetizados localmente y actúan en el mismo sitio de síntesis. Cada una de las BCMO es específica en cada tejido, aunque de ambas, la más importante, para la producción de vitamina A, es la BCMO1 (Kiefer *et al.*, 2001; Wyss, 2004; Kloer y Schulz, 2006; Gudas y Wagner, 2010).

También respecto a la BCMO2, de bovinos y ovinos se han detectado mutaciones relacionadas con el color de la grasa subcutánea y la concentración de β -caroteno en plasma sanguíneo y leche; aun cuando faltan investigaciones al respecto, éstas

se podría utilizar como un predictor genético del amarillamiento de la canal en estas especies (Tian *et al.*, 2010).

De la misma forma, como en el caso de la BCMO1, también se realizó inmunohistoquímica para determinar la expresión de la BCMO2, en las células epiteliales de intestino delgado, mucosa estomacal, células del parénquima hepático, células de Sertoli y Leydig de testículo, túbulos renales, glándula adrenal, células exocrinas pancreáticas, epitelio pigmentado retinal y cuerpo ciliar en el ojo. La BCMO2, pero no la BCMO1, fue detectada en células musculares esqueléticas y cardíacas, tejido conectivo endometrial y prostático, así como en las células endocrinas pancreáticas (von Lintig, 2010).

La existencia de dos enzimas que producen división de los diferentes carotenoides para la formación de vitamina A o apocarotenales, parece indicar que la célula evita o cubre una posible disminución de retinoides a nivel local.

Por otro lado, es necesario determinar posibles asociaciones con proteínas que regulan la entrada de moléculas a través de la membrana celular, el movimiento y la transformación de las mismas por lo que además de estudiar a las BCMO es necesario caracterizar y estudiar las proteínas relacionadas al metabolismo de los carotenoides, remarcando la importancia y el nivel de complejidad del metabolismo de la vitamina A.

Mecanismo de acción de la enzima β -caroteno 15, 15' monooxigenasa

Las enzimas capaces de activar el O₂ se dividen en oxidasas, las cuales usan el oxígeno como un oxidante, y reducen el O₂ en peróxido de hidrógeno o agua; y oxigenasas, las cuales incorporan átomos de oxígeno de la molécula de oxígeno al (los) producto(s). Las monooxigenasas catalizan la incorporación de un átomo de oxígeno, mientras que las dioxigenasas incorporan ambos átomos de oxígeno en el producto (Bugg, 2003).

La mayoría de las enzimas capaces de catalizar la activación del dióxígeno requieren un metal como cofactor, el cual en la mayoría de los casos es hierro ferroso (II) ó férrico (III) (Bugg, 2003).

Mediante espectrofotometría de masas se confirmó la incorporación de oxígeno y agua marcados a los productos obtenidos de la división del caroteno por la BCMO1 (Leuenberger, 2001). La división central oxidativa fue estudiada en los diferentes trabajos realizados por Lakshman y Okoh, 1993; During, *et al.* (1996, 1999, 2001, 2004) Nagao *et al.*, (2000) y Gong, *et al.*, (2006). En la Figura 6 se expone esta división central oxidativa (Bugg, 2003).

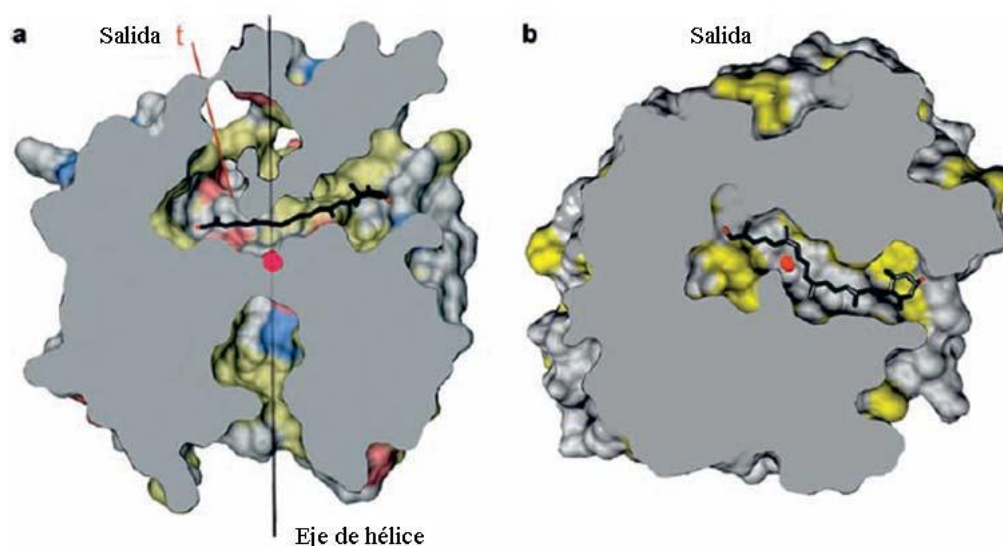


Figura 5. Estructura cristalina de la BCMO2 de *Synechocystis* sp. Cargas positivas, negativas y residuos no polares están representados en azul, rojo y amarillo, respectivamente. El átomo de hierro catalítico está indicado por el círculo rojo, el sustrato es de color negro/rojo. **(a)** el corte a través de la molécula aproximadamente a lo largo del eje de las hélices, revelando un bolsillo que penetra desde el centro a lo largo del eje de las hélices hacia el centro, donde se encuentra el hierro catalítico. Sin embargo, el corte muestra el túnel de unión del sustrato que entra a la proteína desde el lado derecho, cambiando su dirección cerca del centro y el final del túnel sale en la parte superior izquierda. **(b)** Vista del sustrato (3R)-3-hidroxi-8'-β-apo-carotenol en el corte de la enzima.

Tomado de Kloer, D. P. and G. E. Schulz. 2006 Structural and biological aspects of carotenoid cleavage. *Cell. Mol. Life Sci.* 63:2291.

La BCMO1 de pollo, humano y rata ha mostrado tener la misma especificidad por el sustrato para diferentes carotenoides, mostrando actividad para β-caroteno, β-criptoxantina, β-apo-4'-carotenal y β-apo-8'-carotenal, pero no para β-apo-12'-carotenal, luteína y zeaxantina (Grolier *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2009; Lindqvist y Andersson, 2002) y licopeno (Grolier *et al.*, 1997; Lindqvist y Andersson, 2002; Zariphen *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2009), lo cual sugiere: a) al menos uno de los anillos β-ionona es imperativo e insustituible para la ruptura central de las moléculas en los enlaces dobles 15,15'; b) la masa molecular del sustrato debe ser más grande de 30 carbonos, y c) la enzima se une al sustrato formando un saco hidrófobo con el sitio activo al centro (Grolier *et al.*, 1997; Lindqvist and Andersson, 2002; Kim *et al.*, 2009).

La secuencia de aminoácidos de BCMO1 en humano muestra que el 8% de aminoácidos hidrófobos (triptófano, tirosina y fenilalanina) son conservados en la enzima y participan en la formación del saco hidrófobo de unión al sustrato (Lindqvist y Andersson, 2002). Una vez que se alineó las secuencias de la BCMO1 de pollo, humano, ratón, rata (Lindqvist y Andersson, 2002; Morales *et al.*, 2006), bovino y *Drosophila* melano-

gaster (Morales *et al.*, 2006) se encontró seis cisternas conservadas en el sitio activo hidrófobo (Lindqvist y Andersson, 2002; Morales *et al.*, 2006). Recientemente se ha identificado que las tirosinas en las posiciones Y25 e Y326 en la BCMO1 de ratón, se fijan en el doble enlace 15,15' del sustrato, estabilizando la unión (Lietz *et al.*, 2010).

En caso de suspender el abasto de β-caroteno pero proveer acceso a otros carotenoides dietarios, la BCMO1 seguiría produciendo vitamina A al utilizar sustratos alternos, evitando la deficiencia vitamínica, lo cual refleja la importancia de la enzima BCMO1 en el metabolismo celular.

Actividad de la enzima β-caroteno 15, 15' monooxigenasa en las diferentes especies animales

Para la caracterización de la enzima BCMO1, de ratón, rata, pollo, hurón, conejo, cerdo y cuyo se ha usado la fracción sobrenadante a 100,000 × g o precipitada con sulfato de amonio. La reacción es dependiente de oxígeno molecular y no requiere el cofactor nicotinamida dinucleótido para la catálisis (Lindqvist y Andersson, 2002). Se determinó que la enzima es citosólica (von Lintig y Vogt, 2004; Wyss, 2004; Morales, 2006), sin dominios transmembranales o sitios potenciales para glicosilación amino terminal (Takitani *et al.*, 2006).

También se determinó que la enzima requiere hierro iónico como cofactor pero es inhibida por agentes sulfhidrilo, quelantes de hierro (von Lintig y Wyss, 2001; von Lintig y Vogt, 2004; Wyss, 2004) y cianuro (Lindqvist y Andersson, 2002). Asimismo, la enzima nativa tiene la habilidad de dividir el doble enlace 15,15' de una variedad de carotenoides además de β -caroteno, incluyendo α -caroteno, β -apocarotenoles y β -apocarotenales (Lindqvist y Andersson, 2002).

Se ha determinado la constante de Michaelis-Mentel (K_m) promedio para la enzima nativa en las especies antes mencionadas utilizando como sustrato al β -caroteno entre los límites de 1-10 μ M (Goodman *et al.*, 1967; Singh y Cama, 1974; Ershov *et al.*, 1993; Redmond *et al.*, 2001; Lindqvist y Andersson, 2002; von Lintig y Vogt, 2004; Poliakov *et al.*, 2005; Morales, 2006; Kim y Oh, 2009).

El pH óptimo para la reacción fue ligeramente alcalino (7.8 a 8.2) (Lindqvist y Andersson, 2002; von Lintig y Vogt, 2004; Morales, 2006), el K_m de 2-10 μ M y la velocidad máxima de 0.003 - 1.7 nmol de retinal $\text{mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ a 37°C dependiendo de la especie (ver Cuadro 2) (Goodman *et al.*, 1967; Singh y Cama,

1974; Ershov *et al.*, 1993; van Vliet *et al.*, 1996; Redmond *et al.*, 2001; Poliakov *et al.*, 2005; Morales, 2006; Kim y Oh, 2009). La función de esta enzima es promovida por la presencia de tioles (Mora y Shimada, 2001).

Kim y Oh (2010) compilaron los parámetros cinéticos de BCMO1 en diferentes especies, los cuales se muestran en el Cuadro 2. La afinidad y la máxima velocidad de la BCMO1 para el β -caroteno es elevada, lo que indica que el β -caroteno es el sustrato ideal para la enzima (Kim y Oh, 2010).

Lo expuesto anteriormente ilustra las diferentes observaciones hechas en los estudios realizados con la BCMO1 de las diversas especies animales, además que la actividad y la eficiencia específica para la conversión de los carotenoides a vitamina A. A este respecto, Mora (1998) encontró que en bovinos la síntesis a partir de carotenoides en vitamina A, es cinco veces menor a lo existente en caprinos, y esto explicaría las diferencias en la coloración de su grasa. De igual forma, se ha estimado que en humanos del 60 al 70% del β -caroteno ingerido se convierte directamente a retinal, mientras que el remanente se deposita

Cuadro 2. Parámetros cinéticos de la BCMO1 con diferentes carotenoides como sustrato

Substrato	Especie fuente	K_m (μ M)	V_{max} (nmol $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$)	V_{max}/K_m	Referencia
α -caroteno	Bacteria marina	169	0.78	4.6×10^{-3}	Kim <i>et al.</i> , 2009
	Rata	6.2	4.3×10^{-5}	6.9×10^{-6}	Goodman <i>et al.</i> , 1967
	Pollo	370	9.4	2.5×10^{-2}	Kim y Oh, 2009
β -caroteno	Bacteria marina	37	45	1.2	Kim <i>et al.</i> , 2009
	Humano	7.1	10	1.4	Lindqvist y Andersson, 2002
	Ratón	6.0	0.04	6.7×10^{-3}	Redmond <i>et al.</i> , 2001
	Pollo	26	32	1.2	Kim y Oh, 2009
	Rata	5.7	1.7×10^{-3}	6.7×10^{-3}	Goodman <i>et al.</i> , 1967
	Conejo	67	0.05	7.5×10^{-4}	Ershov <i>et al.</i> , 1993
	Cuyo	9.5	0.06	6.3×10^{-3}	Singh y Cama, 1974
	<i>Drosophila melanogaster</i>	5.0	-	-	Von Lintig y Wyss, 2001
	Bacteria marina	382	0.26	6.9×10^{-4}	Kim <i>et al.</i> , 2009
	Pollo	690	9.2	1.3×10^{-2}	Kim y Oh, 2009
β -Criptoxantina	Bacteria marina	29	10	0.34	Kim <i>et al.</i> , 2009
	Rata	6.7	1.8×10^{-4}	2.69×10^{-5}	Goodman <i>et al.</i> , 1967
	Humano	30	0.90	0.03	Lindqvist y Andersson, 2002
β -Apo-4'-carotenal	Pollo	290	38	0.13	Kim y Oh, 2009
	Bacteria marina	147	7.9	5.4×10^{-2}	Kim <i>et al.</i> , 2009
	Pollo	180	17	9.4×10^{-2}	Kim y Oh, 2009
β -Apo-8'-carotenal	Rata	8.5	1.8×10^{-4}	2.1×10^{-5}	Goodman <i>et al.</i> , 1967
	Pollo	190	21	0.11	Kim y Oh, 2009
β -Apo-10'-carotenal	Rata	9.2	1.4×10^{-4}	1.5×10^{-5}	Goodman <i>et al.</i> , 1967
β -Apo-12'-carotenal	Rata	7.7	2.1×10^{-4}	2.7×10^{-5}	Goodman <i>et al.</i> , 1967

Adaptado de Kim y Oh. (2010).

intacto en el hígado y el tejido adiposo. Así que la enzima BCMO1 de bovino y humano tienen una actividad similar, pigmentando la grasa de ambas especies. En cerdos, la absorción de β -caroteno es limitada, siendo la tasa de conversión de este compuesto a vitamina A de 40 a 1 en base a la cantidad (100 mg kg^{-1}) en la dieta (Schweigert *et al.*, 2001). En roedores, el β -caroteno se divide enteramente en retinal, por lo que no existe β -caroteno en circulación (Wyss, 2004).

La actividad de la BCMO1 (expresada en pmol de retinal/mg de proteína por hora) varía mucho entre especies. Según Morales (2006), es de 190 a 415 en cabras, de 6.3 a 14.9 en ratas y hasta 330 en pollos, mientras Wyss *et al.*, (2000) determinaron una actividad de 2500 en esta última especie. La diferencia encontrada en la actividad en la BCMO1 de pollo, puede ser debida al nivel de purificación alcanzada y de la cantidad de enzima presente en cada experimento.

Puesto que aún no ha sido posible purificar completamente la BCMO1, se han realizado mientras tanto experimentos con la BCMO2 para de inicio, determinar por analogía la actividad de la BCMO1. Kloer *et al.* (2005), Kloer y Shultz (2006) reportaron la estructura cristalina de la BCMO2 de *Synechocystis* sp como modelo de las BCMO formadoras de retinal. Esta enzima tiene siete hélices β . El punto central de la hélice es relativamente plano y consiste en lazos cortos que conectan a cada una de las hélices. En contraste, en la parte superior de la hélice se extienden lazos con hélices cortas formando un domo. El centro activo de la BCMO2 está localizado cerca del eje de las hélices en la parte superior. La característica más prominente es un gran túnel por donde entra el sustrato desde uno de los lados, en una dirección perpendicular al eje de las hélices, pasando por el sitio activo, donde se encuentra el hierro, saliendo el (los) producto(s) paralelo al eje de las hélices (modelo propuesto de la BCMO2 en la Figura 5). El modelo muestra al hierro unido a histidinas reacomodadas en el eje de las siete hélices. Tomando como base este modelo, Morales *et al.*, (2006) determinaron que en el bovino existen histidinas conservadas en las posiciones 172, 237, 308 y 513 en la secuencia de aminoácidos. Al comparar las secuencias de aminoácidos de *Synechocystis* y el bovino, se observan varios residuos conservados en las tiras β que están asociadas a la transferencia del electrón durante la catálisis. Las tiras β 20, β 24 y β 28 tienen la mayoría de las regiones conservadas entre especies, y muestran un total de cuatro residuos de ácido

glutámico conservados; en la β 6 tiene un ácido aspártico conservado en todas las especies excepto en *Synechocystis*. Esta característica está presente en la tira β 32; y la β 10 muestra un ácido aspártico movido en una posición en *Synechocystis* (Kloer *et al.*, 2005; Morales *et al.*, 2006; Kloer y Schulz, 2006). Estos hallazgos permiten especular que las diferencias encontradas en la actividad enzimática de la BCMO1 entre las especies se deben a las diferencias en el sitio activo.

Lindqvist y Andersson (2007) en un análisis de secuencias y alineamiento de la BCMO1 de humano, ratón, rata y pollo, mostraron seis cisteínas conservadas en el centro del sitio activo.

Debido a la naturaleza bioquímica de los aminoácidos encontrados en el sitio activo, la unión de sustrato se ve favorecida; además por la naturaleza hidrófoba de la cisteína se fomenta la carga electro-negativa y durante la catálisis, la presencia del nitrógeno de la histidina, es capaz de captar el protón de la cisteína en el momento de la unión al sustrato. Por lo que las mutaciones cambian la forma, la carga eléctrica y la función del sitio activo de la BCMO1, siendo ésta la posible razón de las diferencias de actividad de la BCMO1 entre las especies estudiadas hasta el momento.

En apoyo a la idea anterior, Lindqvist y Anderson (2007), encontraron una mutación en el gen de la β -caroteno 15, 15' monooxigenasa llamada T170M. Esta mutación corresponde al reemplazamiento de una treonina conservada por una metionina que disminuye la actividad de la enzima del 90%. Aunque la función de la treonina aún no está clara, la sustitución de este residuo hidrofílico por el residuo de metionina hidrofóbica cambia el sitio activo y por lo tanto la actividad. Existe un residuo histidina 172, uno de los cuatro coordinados con el hierro del centro catalítico de la enzima, que estabiliza el hidrogeno que está unido al residuo treonina 170, por lo que el cambio a un residuo metionina en esta posición desestabiliza la unión o cambia de posición el hierro ferrico (Fe^{3+}), comprometiendo la capacidad catalítica de la enzima.

Metabolismo y función de los retinoides

Como se mencionó anteriormente, los retinoides son moléculas formadas de cuatro unidades isoprenoides. En los años recientes el término retinoide se ha aplicado a los compuestos naturales con actividad de vitamina A y sus análogos sintéticos, con o sin actividad biológica de retinol. La estructura química de dos retinoides se observa en la Figura 6. Los tres retinoides que se encuentran en la naturaleza (Mora, 1998) son:

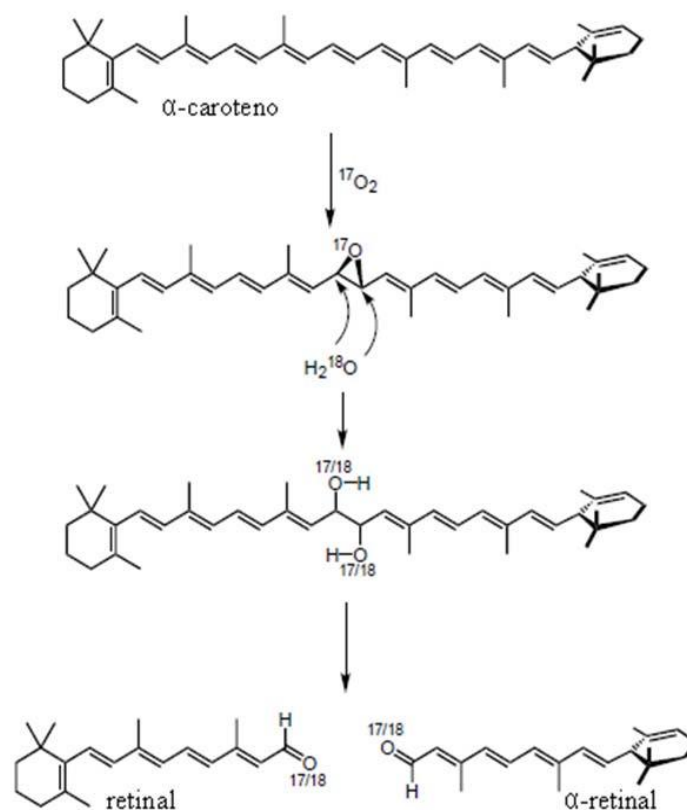


Figura 6. Formación de vitamina A por la β -caroteno 15, 15 mono-oxigenasa.

Tomado de Bugg, T. D. H. 2003 Dioxygenase enzymes: catalytic mechanisms and chemical models. *Tetrahedron* 59, 7075-7101.

1) retinol, también denominado vitamina A, axeroftol, axerol

2) retinaldehído, denominado también como retinal, y

3) ácido retinoico

La vitamina A preformada es consumida como esteres de retinol, los cuales al llegar al intestino, sufren hidrólisis y el retinol libre pasa a través de la mucosa intestinal a los enterocitos donde se reesterifica con ácidos grasos de cadena larga principalmente saturados por acción de la enzima lecitin-retinol acil transferasa, la cual está unida a la membrana celular. El hígado es el principal sitio de almacenamiento de la vitamina A, con más del 95% del total de retinoides que se encuentran en forma de esteres de retinol, predominantemente como retinil palmitato y estearato, en todas las especies hasta hora estudiadas como lo son pollo, rata, ratón, cerdo, cabra, bovino, herbo, huron, y humano (Mora, 1998).

El receptor de membrana Stra6 facilita la entrada de vitamina A a la célula, lo cual permite definir los tipos de célula con elevada especificidad. El receptor Stra6 se expresa en altos niveles en la barrera sangre/órgano y en diversos tipos celulares durante el desarrollo y en los adultos; así mismo, la elevada expresión de Stra6 es sugestivo del requerimiento de la intervención de retinol (Gudas y Wagner, 2011). Así, los retinoides biológicamente activos generalmente se sintetizan localmente. El interrogante de cómo se regula esta síntesis, requiere futura investigación (Gudas y Wagner, 2011). Otro tópico importante en la investigación del retinol, es el transporte de la vitamina A de una célula a otra que ocurre, al parecer en el desarrollo embrionario, así como entre células adyacentes. Aún no hay suficiente información disponible acerca de si la vitamina A se mueve entre las células, o si las moléculas de señalización se elaboran en respuesta a la vitamina A (Gudas y Wagner, 2011).

Aún no está claro si la vitamina A de origen dietético puede influenciar fisiológicamente el balance energético y el almacenamiento de grasa en el ratón (Lobo *et al.*, 2010).

Investigadores como Chawla y Lazar (1994), Xue *et al.* (1996) y Kawada *et al.* (2000) citadas por Brandenbourt y Hu (2005), mencionan que los carotenoides provitamina A y la vitamina A en su forma de ácido retinoico todo trans inhiben potentemente la diferenciación clonal de líneas celulares de preadipocitos de cerdos.

Por otro lado, García-Rojas *et al.*, (2010), estudiaron el efecto de ácidos grasos como ácido pristánico y ácido fitánico, vitamina A (ácido retinoico todo trans y 9-cis) y carotenoides (β -caroteno y luteína) en la expresión de PPARy y su coactivador PGC-1 α durante la diferenciación del tejido adiposo bovino. Determinaron que el ácido fitánico y vitamina A (tanto ácido retinoico todo trans y 9-cis) fueron los mejores activadores de la expresión de PPARy y que la combinación de los ácidos retinoicos todo trans y 9-cis fue el mejor activador de la expresión de PGC-1 α .

Para la esterificación de la vitamina A, hay una proteína celular ligadora de retinol II (CRBP II, por sus siglas en inglés), que se une al retinal recién

formado por la BCMO1 y lo presenta a la proteína lecitina retinol aciltransferasa que cataliza la síntesis de ésteres de retinil para almacenar de esta forma la vitamina A en el hígado (MacDonald y Ong, 1988; Boulanger *et al.*, 2003; Yamaguchi *et al.*, 2007).

Es necesario que una vez formada la vitamina A, ésta sea esterificada para su almacenamiento. Por esto Boulanger *et al.* (2003) proponen un mecanismo de inducción coordinada para la expresión de CRBP II y BCMO1, señalando que ambas están reguladas por los ligandos de PPAR, los que regulan la expresión secuencial de ambas enzimas para metabolizar el β -caroteno (Boulanger *et al.*, 2003; Poliakov *et al.*, 2005). Esto es debido a que el promotor del gen CRBP II tiene una secuencia específica reconocida por el heterodímero de receptor nuclear de hormonas, RXR y PPAR (During *et al.*, 1998) (ver Figura 7).

Dentro del papel fisiológico de la vitamina A se encuentra la diferenciación y el crecimiento celular, la reproducción y la visión (Lewis, *et al.*, 1990). La vitamina A (en su forma de ácido retinoico) también interviene en los mecanismos de defensa celular. A este respecto los resultados del estudio de Pinos-Lagos *et al.* (2011), muestran que la vitamina A produce señalización simultánea con el desarrollo de

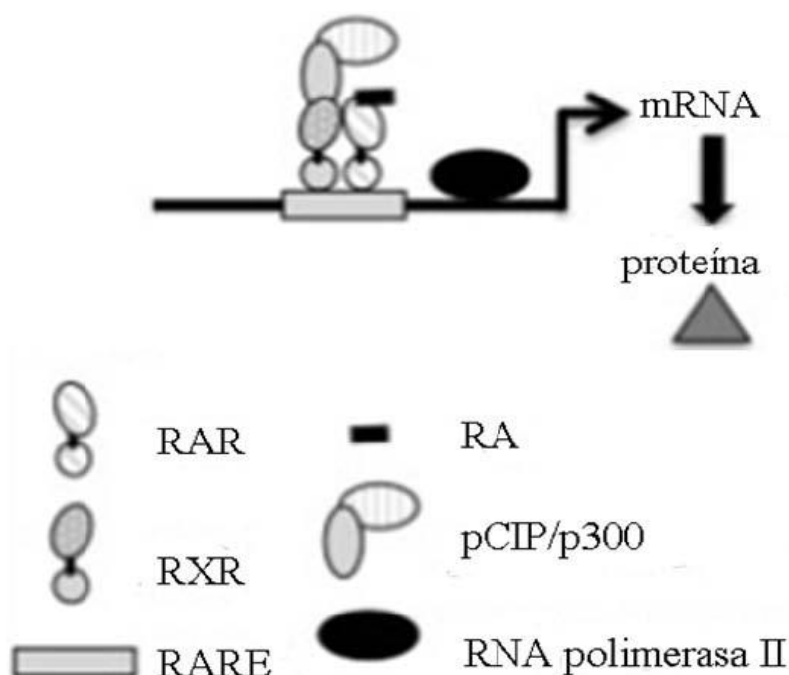


Figura 7. Respuesta transcripcional al ácido retinoico. Se muestran los factores de transcripción, elementos de respuesta, ácido retinoico y RNA polimerasa; complejo que promueve la transcripción de un gen.

Tomado de Gudas, L. J. and J. A. Wagner. 2011. Retinoids regulate stem cell differentiation. *J. Cell. Physiol.* 226:322.

la inflamación. También encontraron que los modelos de vacunación y el rechazo de injertos alogénicos (de un individuo a otro perteneciente a la misma especie), son señalizados temporal y espacialmente (restringido a la zona de inflamación) por la vitamina A, reclutando células inflamatorias, promoviendo migración y polaridad (Pino-Lagos *et al.*, 2011). Rhee *et al.* (2011) encontraron que la vitamina A tiene influencia sobre el proceso vascular de la arterioesclerosis. Los modelos animales preclínicos y estudios celulares permiten soportar este concepto. Los retinoides muestran efectos complejos en la proliferación, crecimiento, diferenciación y migración de células musculares lisas vasculares, incluyendo la respuesta a la lesión y a la arterioesclerosis. Las evidencias informadas por Rhee *et al.*, (2011), sugieren que los retinoides están involucrados en la calcificación vascular y la función endotelial, por ejemplo, por la modulación de la vía del óxido nítrico. Además, Rhee *et al.*, (2011) establecieron efectos de los retinoides en el metabolismo de los lípidos y la adipogénesis lo que puede indirectamente influenciar la inflamación y la arterioesclerosis.

La acción de la vitamina A de estimular a las células a la diferenciación se está siendo utilizando para tratar pacientes con ciertos tipos de cáncer como el de la piel, neuroblastoma ó glioblastoma, entre otros, al administrar terapia con vitamina A y luego quimio y radioterapia, resultando en una mejora significativa y elevada sobrevivencia de los pacientes. Con este antecedente el uso de la vitamina A en células neoplásicas se ha procedido al estudio de los inhibidores de desacetilasas de histonas, conducente a una combinación terapéutica para el tratamiento de estos padecimientos (Gudas y Wagner, 2011). Así mismo se ha probado terapia antioxidante con elevadas dosis de vitaminas (combinación de las A, C y E) en casos severos de pancreatitis. Esto se basa en el hecho que estas tres vitaminas se oxidan retirando del medio celular metabolitos oxidantes que de manera natural se producen en la célula y que las lesionan. Los resultados de un estudio mostraron que esta terapia antioxidante no produjo beneficio significativo en los pacientes que tenían pancreatitis severa aguda (Bansal *et al.*, 2011). Con lo mostrado, queda mucho por estudiar de las funciones de la vitamina A en las diferentes células.

Regulación de la expresión de la enzima β -caroteno 15, 15' monooxigenasa

Dos subgrupos de la superfamilia de receptores hormonales nucleares modulan las respuestas celulares a la vitamina A, en su forma de ácido retinoico: los RXR y los RAR. El ácido desoxirribonucleico (ADN) presenta una región denominada

región promotora de los elementos de respuesta del ácido retinoico (RARE) a la cual se unen los factores de transcripción (RAR y/o RXR) y el ácido retinoico, los cuales regulan la transcripción de los genes blanco. Estos factores de transcripción, son altamente expresados en tejido adiposo blanco y tejido adiposo café o pardo. El ácido retinoico auto-modula los niveles de estado estacionario de sus receptores (tanto RAR como RXR). En ratones silvestres, el contenido de lípidos y el potencial termogénico se mostraron dependientes de vitamina A (Ribot *et al.*, 2001).

Boulanger *et al.* (2003) encontraron que los factores transcripcionales relacionados con PPAR se unen al sitio PPRE presente en el promotor de la BCMO1 y concluyeron que al menos PPARY se une específicamente al elemento PPRE y que posiblemente también PPAR α o PPAR β/δ . Así mismo, Boulanger *et al.* (2003), mostraron que en las células TC7 (células de carcinoma de colon humano, subclones de las células Caco-2) existe, además del PPRE, la secuencia AGGTCA A AGGTCA en el promotor de la BCMO1 que no había sido reportado con anterioridad, el cual deriva del sitio de unión preferencial para el heterodímero PPAR/RXR (GGGTCA A AGGTCA), sugiriendo especificidad para la heterodimerización u homodimerización (Boulanger *et al.*, 2003).

Así mismo, la expresión génica de la enzima es afectada por el estado nutricional. La actividad de esta enzima es promovida por dietas que contienen ácidos grasos poli-insaturados en ratas deficientes en cobre. En cambio es inhibida por suplementación con flavonoides en cerdos y por consumo de vitamina A en ratas (ácido retinoico todo trans pero no ácido retinoico 9-cis en hígado; ácido retinoico todo trans y 9-cis en intestino delgado y testículo) (Takitani *et al.*, 2006).

La actividad intestinal de la BCMO1 es promovida por la deficiencia de vitamina A mientras que la suplementación con β -caroteno disminuye la actividad, previniendo así el exceso de retinol; este balance puede efectuarse a nivel de la conversión de β -caroteno a retinal (Takitani *et al.*, 2006).

Lobo *et al.* (2010) mostraron que el RNAm de la BCMO1 y la expresión son inducidas durante la adipogénesis en cultivo celular. También observaron que el ácido retinoico interfiere con la activación transcripcional de PPARY a través de la proteína de unión (C/Ebpa), durante la conversión de preadipocito a adipocito, posiblemente por competencia por cofactores. Adicionalmente, la vitamina A ha sido implicada en el incremento en la capacidad para el metabolismo oxidativo y para inducir la lipólisis de triacil glicéridos almacenados en adipocitos; estos

efectos son explicados, al menos en parte, por la activación directa los receptores de ácido retinoico en los genes blanco. La reducción de la expresión de PPAR γ dependiente de vitamina A (en su forma de ácido retinoico) y la inducción del metabolismo oxidativo así como la lipólisis, resulta en la capacidad reducida de almacenamiento de grasa en el adipocito (Lobo *et al.*, 2010). Consecuentemente, el aumento de la concentración de vitamina A (retinol superior a 5mM) inhibe la diferenciación de los adipocitos y la acumulación de grasa dentro de adipocitos en cultivo *in vitro*. Además, se probó que la adiposidad del ganado bovino se incrementó con dietas de finalización sin suplementación de vitamina A, mejorando el marmoleo y aumentando el contenido de lípidos extraídos con éter (Pickworth *et al.*, 2011).

En el intestino, la expresión del factor de transcripción específico de intestino (del inglés ISX), se observa en las criptas y permite la diferenciación y función celular, pero no es esencial para proliferación del epitelio intestinal; es activado por vitamina A vía RAR que se une al elemento de respuesta de la vitamina A en su forma de ácido retinoico específico (RARE) con el promotor ISX. Una vez activado, ISX reprime el SR-B1 y la expresión de BCMO1, indicando que la vitamina A es absorbida y producida en intestino bajo el control de retroalimentación negativa vía inducción de la expresión de ISX (Lietz *et al.*, 2010).

Regulación de la actividad de la enzima β -caroteno 15, 15' monooxigenasa

El β -caroteno es el precursor de la vitamina A, pero la administración de dosis elevadas de éste en humanos no causa hipervitaminosis ni la consecuente intoxicación (como lo causaría la vitamina A), por lo que se ha sugerido que la síntesis de vitamina A por ruptura de β -caroteno debe ser regulada por los niveles de esta vitamina en el organismo, respondiendo a un sistema de retro-alimentación negativa (Morales, 2006; Lietz *et al.*, 2010). Hay una conversión más efectiva del β -caroteno en ratas alimentadas con bajas dosis dietética de vitamina A comparada con aquellas que reciben altas dosis (Lietz *et al.*, 2010).

Por otro lado, el status de la vitamina A afecta la absorción de β -caroteno y es posiblemente el factor más importante que afecte la actividad de la BCMO1. A nivel intestinal se controla la absorción de β -caroteno y la producción de vitamina A por un mecanismo de retro-alimentación (Allen, 1989; Lietz *et al.*, 2010).

Una adecuada ingestión de proteína de alta calidad es crucial para la expresión de la proteína BCMO1. Se ha demostrado que en ratas deficientes en

proteína, la actividad intestinal de la BCMO1 es baja, en comparación con aquellas alimentadas con suficiente proteína. Además en ratas deficientes en vitamina A, se demostró un aumento en actividad de BCMO1 por 2.8 veces después de recibir una dieta con 20% de proteína comparada con ratas que recibieron solo 5%. Hurones que recibieron dietas con 40% de proteína tuvieron niveles de vitamina A superiores en hígado, intestino y tejido adiposo en comparación con aquellos que fueron alimentados con 10% o 20% de proteína (Lietz *et al.*, 2010). Este es un efecto generalizado de una deficiencia de proteína.

En ensayos *in vitro* usando BCMO1 intestinal de rata, la conversión de provitamina A fue afectada por la adición de otros carotenoides diferentes al β -caroteno. Por ejemplo, la adición de luteína en combinación con β -caroteno en una relación de 3:1 (luteína/ β -caroteno) ha mostrado disminución en la conversión de β -caroteno en retinal, sin embargo esto no fue observado en otros estudios al adicionar luteína desde 1:1 hasta 4:1 (luteína/ β -caroteno) en la incubación. Contrariamente, la adición de zeaxantina (un isómero de luteína), inhibe la actividad de BCMO1 en una relación de 1:1 (zeaxantina/ β -caroteno). Adición de α -caroteno también reduce la producción de retinal hasta por 32%, ya que la división de α -caroteno, resulta en una sola molécula de todo-trans-retinal en vez de dos como cuando el sustrato es β -caroteno. Los posibles mecanismos de interacción entre los carotenoides que no son provitamina A y la actividad de la BCMO1 son: 1) competencia del β -caroteno, cantaxantina, zeaxantina y luteína para solubilización en la micelas mixtas y la absorción en el intestino; 2) la cantaxantina inhibe la BCMO1; 3) la cantaxantina inhibe una de las enzimas involucradas en la conversión de retinal a esteres de retinil, o 4) el catabolismo de la vitamina A (Lietz *et al.*, 2010).

Se ha visto que el apo-8'-carotenal disminuye la actividad de la BCMO1. Más importante, apo-8-carotenal fue capaz de hacer almacenar retinol sérico en ratas con agotamiento de vitamina A, mientras que cuando se administró apo-12'-carotenal se alcanzó sólo el 50% de la concentración normal de retinol sérico, indicando que aquel es mejor sustrato para la BCMO1 (Lietz *et al.*, 2010).

Debido a que los vertebrados no pueden sintetizar la vitamina A de novo, ésta sólo se obtiene de la ruptura oxidativa de los carotenoides provitamina A dietéticos por acción de la BCMO1. Ya que la vitamina A es necesaria para diversas funciones celulares, como se ha descrito anteriormente, la BCMO1 se convierte en un elemento celular indispensable para la producción animal.

Se precisan más estudios sobre la regulación de la actividad de la BCMO1 a nivel molecular en las diferentes especies productoras de leche, carne, huevo etc., para lograr la futura manipulación de la actividad de la enzima de tal forma que se promuevan diferentes fases de la producción animal.

Implicaciones en producción animal

Los carotenoides dietéticos son importantes para los animales en producción ya que además de impartir color a la piel, la yema de huevo y la grasa corporal fortalecen la respuesta inmune, mejoran la calidad del semen y de los embriones e incluso se han propuesto como predictores del sistema de alimentación de donde provienen los animales. En el caso de los bovinos la deposición de β -caroteno, proveniente de los forrajes, resulta detrimental para la comercialización de las canales (Simpson, 1983; Mora y Shimada, 2001; OIE, 2003; Barrón-Gutiérrez *et al.*, 2004; Minguez *et al.*, 2005).

Existen dos vías oxidativas principales para la conversión de β -caroteno en apocarotenoides: a) la ruptura central (BCMO1) que genera retinoides (vitamina A), y b) la ruptura excéntrica (BCMO2), que forma β -apo-10'-carotenales y β -ionona. Las enzimas BCMO1 y BCMO2 han sido detectadas en diferentes tejidos.

Se sabe que existen diferencias en los aminoácidos que constituyen el sitio activo en la BCMO1 entre humano, ratón, rata, pollo y bovino. Las mutaciones genéticas que producen el reemplazo de aminoácidos en el sitio activo de la BCMO1 disminuyen la actividad de la enzima hasta un 90%. Posiblemente las diferencias de la actividad de la BCMO1 entre las especies animales podrían ser atribuidas a la posición y naturaleza de los aminoácidos en el sitio activo, ya sea por mutaciones o por modificaciones postranscripcionales de la enzima BCMO1, lo que implicaría diferencias en la producción de vitamina A y en la acumulación de β -caroteno en diferentes tejidos, de diferentes especies animales.

En el caso de la BCMO2 de bovinos y ovinos se han detectado mutaciones relacionadas con el color de la grasa subcutánea y la concentración de β -caroteno en plasma sanguíneo y leche; aun cuando faltan investigaciones al respecto, éstas se podrían utilizar

como predictor del amarillamiento de la canal en estas especies.

Respecto a la importancia de la BCMO1 en el metabolismo, el promotor del gen de dicha enzima tiene un elemento de respuesta para PPARs, por lo que la expresión de BCMO1 está en parte regulada por dichos factores de transcripción. Los PPARs controlan la expresión de genes del metabolismo de lípidos y la glucosa. PPAR γ β/δ regulan la oxidación de los ácidos grasos en músculo e hígado y PPAR γ es fundamental para la diferenciación de los adipocitos y la lipogénesis en adipocitos maduros, por lo que juega un papel en la diferenciación y metabolismo del tejido adiposo.

Por otro lado la BCMO1 es muy importante en el metabolismo de la vitamina A y de su receptor (RAR), con implicaciones para la diferenciación celular, el desarrollo embrionario, la diferenciación de los adipocitos y la deposición de la grasa; el desacoplamiento mitocondrial, el metabolismo oxidativo y la expresión de adipocinas como la leptina, y la resistina, lo que ejemplifica la importancia de esta enzima en procesos metabólicos esenciales para la producción de huevo, leche y carne (Lobo *et al.*, 2010).

Como ya se mencionó, el aumento en la concentración de vitamina A (5mM en forma de retinol) en cultivo celular inhibe la diferenciación de los adipocitos y la acumulación de grasa. De forma contraria la adiposidad del ganado bovino se incrementó con dietas de finalización sin suplementación de vitamina A, mejorando el marmoleo y aumentando el contenido de lípidos extraídos con éter (Pickworth *et al.*, 2011).

Por todo lo anterior, sería conveniente por un lado, continuar investigando sobre el impacto de esta enzima en cada una de las especies productivas, así como en cada etapa de producción, no sólo para entenderlo desde el punto de vista bioquímico y molecular sino también para incrementar o disminuir su expresión o para seleccionar a aquellos animales que presenten mayor actividad de BCMO1. Por otro lado están por estudiar mejores y más eficientes formas de administración de vitamina A en las especies productivas, para aumentar rendimiento y mejorar la calidad de los productos animales.

Literatura Citada

- Allen, O. J. 1964. The biosynthesis and metabolism of carotenoids and retinol (vitamin A). *J. Lipid Res.* 5:281.
- Allen, O. J. and O. Hayaishi. 1965. The enzymatic cleavage of β -carotene into vitamin A by soluble enzymes of rat liver and intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 54:1364. Washington, DC.
- Allen, O. J. 1989. Provitamin A function of carotenoids: The conversion of β -carotene into vitamin A. *J. Nutr.* 119:105.

- Álvarez, A. C. J. 2009. Diferencias en la expresión de β -caroteno15, 15' oxigenasa en tres especies de rumiantes. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Bansal, D., A. Bhalla, D. K. Bhasin, P. Pandhi, N. Sharma, S. Rana, and S. Malhotra. 2011. Safety and efficacy of vitamin-based antioxidant therapy in patients with severe acute pancreatitis: a randomized controlled trial. *Saudi J. Gastroenterol.* 17(3):174.
- Barrón-Gutiérrez, S., C. García-Bojalil, O. Mora-Izaguirre y A. Shimada-Miyasaka. 2004. Impacto económico de la pigmentación del tejido adiposo en bovinos en pastoreo en el trópico. *Agrociencia.* 38(2):173.
- Bertrand, M. 2010. Carotenoid biosynthesis in diatoms. *Photosynth Res.* 106:89.
- Bhosale, P. and P. S. Bernstein. 2007. Vertebrate and invertebrate carotenoid-binding proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 458:21.
- Boulanger, A., P. McLemore, N. G. Copeland, C. D. Gilbert, N. A. Jenkins, S. S. Yu, S. Gentleman, and T. M. Redmond. 2003. Identification of β -carotene 15, 15'-monooxygenase as a peroxisome proliferators activated receptor target gene. *FASEB J.* 17:1304.
- Brandebourg, T. D. and C. Y. Hu. 2005. Regulation of differentiation of pig preadipocytes by retinoic acid. *J. Anim. Sci.* 83:98.
- Bugg, T. D. H. 2003. Dioxygenase enzymes: catalytic mechanisms and chemical models. *Tetrahedron.* 59:7075.
- Choi, S. K., Y. Nishida, S. Matsuda, K. Adachi, H. Kasai, X. Peng, S. Komemusho, W. Miki, and N. Misawa. 2005. Characterization of β -carotene ketolases, CrtW, from marine bacteria by complementation analysis in *Escherichia coli*. *Mar Biotechnol (NY).* 7:515.
- Chucair, A. J., N. P. Rotstein, J. P. San Giovanni, A. During, E. Y. Chew, and L. E. Politi. 2007. Lutein and zeaxanthin protect photoreceptors from apoptosis induced by oxidative stress: relation with docosahexaenoic acid. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48(11):5168.
- Clydesdale, F. M. 2000. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains—characteristics, biosynthesis, processing and stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 40(3):231.
- Delgado, V. F., A. R. Jiménez, and L. O. Paredes. 2000. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains. Characteristics, biosíntesis, processing and stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 40(3):173.
- Deming, D. M. and J. W. Erdman. 1999. Mammalian carotenoid absorption and metabolism. *Pure Appl. Chem.* 71(12):2213.
- During, A., A. Nagao, C. Hoshino, and J. Terao. 1996. Assay of β -carotene 15, 15'-dioxygenase activity by reverse-phase high-pressure liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 241(2):199.
- During, A., A. Nagao, and J. Terao. 1998. β -carotene 15, 15' dioxygenase activity and cellular retinol-binding protein type II level are enhanced by dietary unsaturated triacylglycerols in rat intestines. *J. Nutr.* 128:1614.
- During, A., M. Fields, C. G. Lewis, and J. C. Smith. 1999. β -carotene 15, 15'-dioxygenase activity is responsive to copper and iron concentrations in rat small intestine. *J. Am. Coll. Nutr.* 18(4):309.
- During, A., M. K. Smith, J. B. Piper and J. C. Smith. 2001. β -Carotene 15, 15'-dioxygenase activity in human tissues and cells: evidence of an iron dependency. *J. Nutr. Biochem.* 12:640.
- During, A., H. Earl, and E. H. Harrison. 2004. Intestinal absorption and metabolism of carotenoids: insights from cell culture. *Arch. Biochem. Biophys.* 430:77.
- Ershov, I. V., A. A. Dmitrovskii, and V. Bykhovskii. 1993. Properties of beta-carotene-15, 15'-dioxygenase, stabilized during purification with lutein and dithiothreitol. *Biokhimiia.* 58:416.
- García-Rojas, P., A. Antaramian, L. González-Dávalos, F. Villarroya, A. Shimada, A. Varela-Echavarría, and O. Mora. 2010. Induction of peroxisomal proliferator-activated receptor γ and peroxisomal proliferator-activated receptor α coactivator 1 by unsaturated fatty acids, retinoic acid, and carotenoids in preadipocytes obtained from bovine white adipose tissue. *J. Anim. Sci.* 88:1801.
- Gong, X., S. W. Tsai, B. Yan, and L. P. Rubin. 2006. Cooperation between MEF2 and PPAR γ in human intestinal β , β -carotene 15,15'-monooxygenase gene expression. *BMC Mol. Biol.* 7:7.
- Goodman, D., H. Huang, M. Kanai and T. Shiratori. 1967. The enzymatic conversion of all-trans beta-carotene into retinal. *J. Biol. Chem.* 242:3543.
- Goodwin, T. W. 1954 The comparative biochemistry of the carotenoids. Chemical Publishing Co., Inc. New York.
- Goodwin, T. W. 1992. Biosynthesis of carotenoids: an overview. *Methods Enzymol.* 214:330.
- Gudas, L. J and J. A. Wagner. 2010. Retinoids regulate stem cell differentiation. *J. Cell. Physiol.* 226:322.
- Grolier, P., C. Duszka, P. Borel, M. C. Alexandre-Gouabau, and V. Azais-Braesco. 1997. *In vitro* and *in vivo* inhibition of β -carotene dioxygenase activity by canthaxanthin in rat intestine. *Arch. Biochem. Biophys.* 348(2):233.
- Hammershøj, M., U. Kidmose, and S. Steenfeldt. 2010. Deposition of carotenoids in egg yolk by short-term supplement of coloured carrot (*Daucus carota*) varieties as forage material for egg-laying hens. *J. Sci. Food Agric.* 90:1163.
- International Union of Pure and Applied Chemistry and the International Union of Biochemistry. 1974.

- Nomenclature of carotenoids. Butterworths, London.
- Karrer, P. and E. Tucker. 1948. Carotenoids. Elsevier Publishing Company, Inc. London.
- Kiefer, C., S. Hessel, J. M. Lampert, K. Vogt, M. O. Lederer, D. E. Breithaupt, and J. Von Lintig. 2001. Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A. *J. Biol. Chem.* 276(17): 14110.
- Kim, Y. S., N. H. Kim, H. J. Kim, J. K. Lee, S. W. Kim, and D. K. Oh. 2007. Effective production of retinal from β -carotene using recombinant mouse β -carotene 15, 15' monooxygenase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76:1339.
- Kim, Y. S. and D. K. Oh. 2009. Substrate specificity of recombinant chicken β -carotene 15, 15'-monooxygenase that converts β -carotene into retinal. *Biotechnol. Lett.* 31:403.
- Kim, Y. S., H. Nam-Kim, S. J. Yeom, S. W. Kim, and D. K. Oh. 2009. *In Vitro* characterization of a recombinant Blh protein from an uncultured marine bacterium as a β -carotene 15,15'-dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 284(23):15781.
- Kim, Y. S. and D. K. Oh. 2010. Biotransformation of carotenoids to retinal by carotenoid 15,15'-oxygenase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88(4):807.
- Kloer, D., S. Rush, S. Al-Babili, P. Beyer, and G. Schulz. 2005. The structure of a retinal forming carotenoid oxygenase. *Science.* 308:267.
- Kloer, D.P. and G.E. Schulz. 2006. Structural and biological aspects of carotenoid cleavage. *Cell Mol. Life Sci.* 63:2291.
- Lakshman, M. R. and C. Okoh. 1993. Enzymatic conversion of all-trans- β -carotene to retinal. *Methods Enzymol.* 214:256.
- Lakshman, M. R. 2004. Alpha and omega of carotenoid cleavage. *J. Nutr.* 134:241.
- Leuenberger, M. G., C. Engeloch-Jarret, and W. D. Woggon. 2001. The reaction mechanism of the enzyme-catalyzed central cleavage of β -carotene to retinal. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40(14):2613.
- Lewis, K. C., M. H. Green, G. J. Balmer, and L. A. Zech. 1990. Retinol metabolism in rats with low vitamin A status: a compartmental model. *J. Lipid Res.* 31:1535.
- Lietz, G., J. Lange, and G. Rimbach. 2010. Molecular and dietary regulation of β -carotene 15,15'-monooxygenase 1(BCMO1). *Arch. Biochem. Biophys.* 502:8.
- Lindqvist, A. and S. Andersson. 2002. Biochemical properties of purified recombinant human β -carotene 15, 15' monooxygenase. *J. Biol. Chem.* 277:23942.
- Lobo G. P., J. Amengual, H. N. M. Li, M. Golczak, M. L. Bonet, K. Palczewski and J. Von Lintig. 2010. β -carotene decreases peroxisome proliferator receptor activity and reduces lipid storage capacity of adipocytes in a β , β -carotene oxygenase 1-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 285(36):27891.
- MacDonald, P. N. and D. E. Ong. 1988. Evidence for a lecithin retinol acyl transfer as activity in the rat small intestine. *J. Biol. Chem.* 263:12478.
- Mangiagalli, M.G., P. A. Martino, T. Smajlovic, C. L. Guidobono, and S. P. Marelli. 2010. Effect of lycopene on semen quality, fertility and native immunity of broiler breeder. *Br. Poult. Sci.* 51(1):152.
- Mayne, S. T., G. J. Handelman, and G. Beecher. 1996. Beta-carotene and lung cancer promotion in heavy smokers-a plausible relationship? *J. Natl. Cancer Inst.* 88(21):1513.
- Minguez, M. M. I., G. A. Pérez and M. D. Hormero. 2005. Pigmentos carotenoides en frutas y vegetales; mucho más que simples "colorantes" naturales. Grupo DE química y bioquímica de pigmentos. Departamento de Biotecnología de Alimentos. Instituto de la Grasa (Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Sevilla, España. <http://www.ig.csic.es>.
- Mora I. O. 1998. Estudio sobre el metabolismo de los carotenos en bovinos para prevenir la pigmentación de la grasa. Tesis doctoral. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Mora, I. O. y A. Shimada. 2001. Causas de color amarillo de la grasa de canales de bovinos finalizados en pastoreo. *Vet. Mex.* 32(1):63.
- Mora, I. O. 2001. Presence of fed β -carotene in digesta, excreta, blood and hepatic and adipose tissues of Holstein steers. *Can. J. Anim. Sci.* 81:133.
- Morales, T. A. 2006. Secuencia de cDNA y expresión de β -caroteno monooxygenasa en bovinos. Tesis doctoral. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF.
- Morales, T. A., A. Rosas, A. González, A. Antaramian, A. Varela-Echavarría, A. Shimada, and O. Mora. 2006. Cloning of the bovine β -carotene-15, 15'-oxygenase and expression in gonadal tissues. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 76(1):9.
- Nagao, A., M. Maeda, B. P. Lim, H. Kobayashi, and J. Terao. 2000. Inhibition of β -carotene-15, 15'-dioxygenase activity by dietary flavonoids. *J. Nutr. Biochem.* 11:348.
- Nagao, A. 2009. Absorption and function of dietary carotenoids. T. Yoshikawa (Ed) Food factors for health promotion. Forum Nutr. Basel. Karger. 61:55.
- Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE). 2003. Informe de la segunda reunión del grupo de trabajo de la OIE sobre seguridad sanitaria de los alimentos derivados de la producción animal. Roma.

- Pickworth, C. L., S. C. Loerch, and F. L. Fluharty. 2011. Restriction of vitamin A and D in beef cattle finishing diets on feed lot performance and adipose accretion. *J. Anim. Sci.* published online Dec 16, 2011.
- Pino-Lagos, K., Y. Guo, C. Brown, M. P. Alexander, R. Elgueta, K. A. Bennett, V. De Vries, E. Nowak, R. Blomhoff, S. Sockanathan, R. A. Chandraratna, E. Dmitrovsky, and R. J. Noelle. 2011. A retinoic acid-dependent checkpoint in the development of CD4⁺ T cell-mediated immunity. *J. Exp. Med.* 9:1767.
- Poliakov, E., S. Gentleman, F. X. J. Cunningham, N. J. Miller-Ihli, and T. M. Redmond. 2005. Key role of conserved histidines in recombinant mouse β -carotene 15,152 monooxygenase-1 activity. *J. Biol. Chem.* 280:29217.
- Redmond, T., S. Gentleman, T. Duncan, S. Yu, B. Wiggert, and E. Gantt. 2001. Identification, expression, and substrate specificity of a mammalian β -carotene 15, 15' dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 276:6560.
- Rhee, E. J., S. Nallamshetty, and J. Plutsky. 2011. Retinoid metabolism and its effects on the vasculature. *Biochim. Biophys. Acta.* 1821:230.
- Ribot, J., F. Felipe, M. L. Bonet, and A. Palou. 2001. Changes of adiposity in response to vitamin A status correlate with changes of PPAR γ 2 expression. *Obes. Res.* 98(8):500.
- Römer, S. and P. D. Fraser. 2005. Recent advances in carotenoid biosynthesis, regulation and manipulation. *Planta.* 221:305.
- Röhrle, F. T., A. P. Moloney, M. T. Osorio, G. Luciano, A. Priolo, P. Caplan, and F. J. Monahan. 2011. Carotenoid, colour and reflectance measurements in bovine adipose tissue to discriminate between beef from different feeding systems. *Meat Sci.* 88(3):347.
- Sadmann, G. 2006. Production of carotenoids by gene combination in *Escherichiacoli*. K. Shetty, G. Paliyath, A. Pometto, and R. E. Levin (Eds). *Food Biotechnology*. (2nd Ed). Taylor and Francis Group.
- Sales, J. N., L. M. Dias, A. T. Viveiros, M. N. Pereira, and J. C. Souza. 2008. Embryo production and quality of Holstein heifers and cows supplemented with β -carotene and tocopherol. *Anim. Reprod. Sci.* 106(1-2):77.
- Sammar, M., P.J. Babin, M. Durliat, I. Meiri, I. Zchori, A. Elizur, and E. Lubzens. 2001. Retinol binding protein in rainbow trout: Molecular properties and mRNA expression in tissues. *Gen. Comp. Endocrinol.* 123:51.
- Schweigert, F.J., I. Buchholz, A. Schuhmacher, and J. Gropp. 2001. Effect of dietary β -carotene on the accumulation of β -carotene and vitamin A in plasma and tissues of gilts. *Reprod. Nutr. Dev.* 41(1):47.
- Simpson, K. L. 1983. Relative value of carotenoids as precursors of vitamin A. *Proc. Nutr. Soc.* 42:7.
- Singh, H. and H. R. Cama. 1974. Enzymatic cleavage of carotenoids. *Biochim. Biophys. Acta.* 370:49.
- Takitani, K., C.L. Zhu, A. Inoue, and H. Tamai. 2006. Molecular cloning of the rat β -carotene 15,15'-monooxygenase gene and its regulation by retinoic acid. *Eur. J. Nutr.* 45:320.
- Van Vliet, T., F. Van Schaik, W. H. P. Schreurs, and H. Van der Berg. 1996. *In vitro* measurement of β -carotene cleavage activity: methodological considerations and the effect of other carotenoids on β -carotene cleavage. *Int. J. Vit. Res.* 66:77.
- Von Lintig, J. and A. Wyss. 2001. Molecular analysis of vitamin A formation: Cloning and characterization of β -carotene 15, 15'-dioxygenases. *Arch. Biochem. Biophys.* 385(1):47.
- Von Lintig, J. and K. Vogt. 2004. Vitamin A formation in animals: Molecular identification and functional characterization of carotene cleaving enzymes. *J. Nutr.* 134(1):251S.
- Von Lintig, J. 2010. Colors with functions: Elucidating the biochemical and molecular basis of carotenoid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 30:35.
- Wyss, A., G. Wirtz, W. D. Woggon, R. Brugger, M. Wyss, A. Friedlein, H. Bachmann, and W. Hunziker. 2000. Cloning and expression of β , β -carotene 15, 15'-dioxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271:334.
- Wyss, A. 2004. Carotene oxygenases: A new family of double bond cleavage enzymes. *J. Nutr.* 134(1):246S.
- Yamaguchi, N., T. Yamamoto, K. Suruga, and S Takase. 2007. Developmental changes in gene expression of β -carotene cleavage enzyme and retinoic acid synthesizing enzymes in the chick duodenum. *Comp. Biochem. Physiol.* 148(3):690.
- Yeum, K. J. and R. M. Russell. 2002. Carotenoid bioavailability and bioconversion. *Annu. Rev. Nutr.* 22:483.
- Zariphen, S., T. Y. Nara, M. T. Nakamura, and J. W. Erdman, Jr. 2006. Dietary lycopene down regulates carotenoid 15, 15' monooxygenase and PPAR γ in selected rat tissues. *J. Nutr.* 136:932.