

Metabolismo de cardenólidos y transformación genética de *Digitalis*. Potencialidades y retos

Yovanny Izquierdo*, Naivy Pérez-Alonso, Elio Jiménez.* Autor para correspondencia

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Carr. a Camajuaní km 5.5. Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54 830 e-mail: yovanny@ibp.co.cu

RESUMEN

Los cardenólidos son metabolitos secundarios, producidos por las plantas del género *Digitalis*, que se utilizan ampliamente en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. El fracaso de los intentos por potenciar su producción a partir de técnicas de cultivo *in vitro*, ha señalado a la transformación genética como una estrategia promisoriosa para la obtención de plantas altamente productoras. Para alcanzar este objetivo se han desarrollado sistemas de transformación en *Digitalis minor* y *Digitalis lanata*, y existen trabajos científicos relacionados en otras especies del género. La selección de genes candidatos para la transformación de *Digitalis* requiere del conocimiento de la ruta de biosíntesis de cardenólidos, la cual está solo parcialmente establecida. Sin embargo, el descubrimiento reciente de dos genes que codifican esta actividad enzimática en *Digitalis purpurea* con patrones de expresión diferentes pone en duda esta aseveración. La flexibilidad de la ruta y sus posibles conexiones con otros procesos de síntesis de hormonas entrañan un reto adicional. Por lo tanto, se hacen necesarios estudios funcionales de estos genes y sus vías de señalización para el diseño de estrategias de transformación que maximicen la producción de cardenólidos con un mínimo de posibles efectos colaterales que pudieran dar al traste con la viabilidad de las plantas transformadas. Esta reseña bibliográfica pretende hacer una revisión acerca del metabolismo de los cardenólidos y los esfuerzos por transformar genéticamente plantas del género *Digitalis*. Sobre esta base se evalúan críticamente las potencialidades de transgenes candidatos para la obtención de plantas de *Digitalis* con una producción más elevada y estable de glicósidos cardíacos.

Palabras clave: glicósidos cardíacos, progesterona 5- α reductasa, ingeniería metabólica

ABSTRACT

Cardenolides are secondary metabolites produced by plants of the genus *Digitalis*. These are widely used in treatments of congestive heart failure. Failed attempts to obtain suitable cardenolide levels from *in vitro* culture of *Digitalis* plants have pointed genetic transformation as a promising strategy to obtain highly productive plants. Transformation systems have been already developed for *Digitalis minor* and *Digitalis lanata* to achieve this aim, whereas related investigations have been done in other species of the same genus. Selection of candidate genes for transformation depends on the analysis of the cardenolide biosynthesis pathway. The latter is partially established, from phytosterol oxidative degradation to progesterone reduction. Many authors point this reaction as the first specific key step of the pathway. However, the recent discovery of two genes encoding this enzyme activity in *Digitalis purpurea*, with different expression patterns, calls this statement into question. Pathway flexibility and possible connections with other hormone-related processes imply an additional challenge in this regard. Therefore, functional studies of these genes and their signaling pathways are required to improve design *Digitalis* transformation strategies, maximizing cardenolide productivity as well as minimizing hazardous side effects on transformed plants viability.

Key words: cardiogenic glycosides, progesterone 5- α reductase, metabolic engineering.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN

DIGITALIS

Origen y clasificación

Importancia farmacológica

CARDENÓLIDOS

Estructura y propiedades farmacológicas. Mecanismo de acción

Metabolismo

Flexibilidad de la ruta de biosíntesis

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE *DIGITALIS*

Antecedentes

Selección de nuevos genes candidatos para transformación de *Digitalis*

CONCLUSIONES

INTRODUCCIÓN

Los glicósidos cardiotónicos o cardenólidos constituyen los medicamentos más extensamente empleados a nivel mundial en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca (Gavidia *et al.*, 2007). Hasta la fecha, las plantas de los géneros *Digitalis* e *Isoplexis* son las únicas fuentes viables desde el punto de vista económico para la producción de estos metabolitos secundarios a escala industrial, de ahí que haya existido siempre un gran interés en el desarrollo de estrategias para fomentar su producción (Hagimori *et al.*, 1980; Sales *et al.*, 2007).

El cultivo *in vitro* de *Digitalis* ha sido extensamente explorado en este sentido, tratando sin éxito de lograr la producción de cardenólidos en suspensiones celulares con el empleo de biorreactores (Hagimori *et al.*, 1980). Más tarde se descubrió que la biosíntesis de estos glicósidos se produce sólo en tejidos verdes diferenciados (Stuhlemmer y Kreis, 1996), por lo que solo mediante la propagación de plantas en sistemas de inmersión temporal se obtienen niveles apreciables, aunque todavía mucho menores que los alcanzados en condiciones de campo (Pérez-Alonso *et al.*, 2009).

La ingeniería metabólica permite la manipulación de rutas biosintéticas de interés para modificar los niveles de determinados metabolitos, ya sea por adición de precursores, modificación de condiciones de cultivo o transformación genética (Venepoorte *et al.*, 1999). Respecto a la biosíntesis de cardenólidos, la adición de precursores como la progesterona al medio de cultivo produce un aumento significativo de la biosíntesis (Hagimori *et al.*, 1982), pero su alto costo hace esta estrategia inviable en la práctica. Como consecuencia, la transformación genética con un gen involucrado en la biosíntesis de este precursor o su canalización hacia la ruta de biosíntesis de los cardenólidos aparece como una alternativa promisoriosa para obtener plantas con una productividad elevada. Como ventaja adicional, este enfoque permitiría, en combinación con las técnicas de cultivo *in vitro*, propagar masivamente plantas transformadas con una productividad más uniforme que la registrada en condiciones naturales (Neczypor, 1969). Esta estrategia ha sido empleada con

éxito en la manipulación de otras rutas metabólicas secundarias en plantas, como los flavonoides (De Clercq *et al.*, 2002) y alcaloides (Charest *et al.*, 2004).

El desarrollo de una estrategia para la obtención de plantas genéticamente modificadas que produzcan cantidades mayores de algún compuesto de interés, requiere de la existencia de un sistema de regeneración de plantas, un protocolo de transformación y un gen (o varios genes) que potencie(n) la biosíntesis del metabolito en cuestión. Esta reseña bibliográfica pretende hacer una revisión acerca del metabolismo de los cardenólidos y los esfuerzos por transformar genéticamente plantas del género *Digitalis*. Sobre esta base se evalúan críticamente las potencialidades de transgenes candidatos para la obtención de plantas de *Digitalis* con una producción más elevada y estable de glicósidos cardíacos.

DIGITALIS

Origen y clasificación

Digitalis es un género que comprende alrededor de 20 especies herbáceas bienales, perennes y arbustos perteneciente a la familia *Scrophulariaceae* (sin incluir las especies de *Isoplexis*, que según Herl *et al.* (2008) también deberían ser clasificadas dentro del mismo género). Estas plantas son nativas de Europa, noroeste de África y Asia central y occidental, aunque se han naturalizado en otras regiones subtropicales y templadas del planeta (Hultén, 1968). Su uso se ha extendido debido a sus propiedades medicinales y ornamentales, principalmente en las especies *D. purpurea* y *D. lanata*. Algunas especies del género se han intentado introducir en Cuba donde su crecimiento en condiciones de campo se produce de manera rápida en otoño e invierno pero la llegada del verano, por lo general, ocasiona la muerte de la planta por la ocurrencia de altas temperaturas y abundantes lluvias (Roig, 1974).

Importancia farmacológica

Las plantas de *Digitalis* han sido empleadas desde la antigüedad en el tratamiento de enfermedades cardíacas de manera empírica. Sin embargo, no fue hasta 1785 que William Withering describió las propiedades

medicinales de *D. purpurea* en el tratamiento de hidropesía, enfermedad caracterizada por la acumulación excesiva de líquido en los tejidos y que en la medicina moderna se reconoce como una consecuencia de la insuficiencia cardíaca (Withering, 1785). En este mismo trabajo también se describían por primera vez los efectos tóxicos derivados de dosis elevadas de preparaciones de la planta. En 1799 la acción farmacológica de *D. purpurea* fue relacionada con su efecto sobre el corazón (Ferriar, 1799). Estudios posteriores demostraron que la digital (como comúnmente se le conoce) contiene una serie de sustancias cardiotónicas muy activas de naturaleza esteroideo-glicosídica conocidas como glicósidos cardiotónicos, o más formalmente cardenólidos. Además, la planta produce otros compuestos no glicosídicos como la digitoflavina, el ciclohexanol, taninos, ácidos málico y succínico, los cuales complementan la acción de aquellos (Melero *et al.*, 2000). En la actualidad varios cardenólidos, principalmente la digoxina y sus derivados, son utilizados en la terapia cardíaca. Su importancia es tal que no han podido ser sustituidos hasta la fecha, al menos en el tratamiento a gran escala (Gavidia *et al.*, 2007).

CARDENÓLIDOS

Estructura y propiedades farmacológicas. Mecanismo de acción

Los cardenólidos son moléculas caracterizadas por un núcleo esteroideo (genina o aglicona) que cuenta con un grupo hidroxilo en la posición C14 y un anillo lactónico insaturado de cinco miembros en la posición C17. Varias de las demás posiciones de la fracción genina pueden tener también sustituyentes como grupos hidroxilo, formilo o acetilo (Kreis *et al.*, 1998; Herl *et al.*, 2005).

A la posición C3 se une una cadena de oligosacáridos típicamente de hasta cinco unidades dentro de las cuales es usual encontrar azúcares poco comunes (Melero *et al.*, 2000) (Figura 1). En cuanto a sus patrones de glicosilación, los cardenólidos se clasifican en primarios, si el azúcar terminal es la glucosa, o secundarios en caso contrario. El núcleo esteroideo tiene, además, la característica peculiar de tener sus cuatro anillos fusionados en la secuencia *cis-trans-cis* desde el A hasta el D (Figura 2), lo cual le confiere la actividad farmacológica a estos compuestos (Melero *et al.*, 2000).

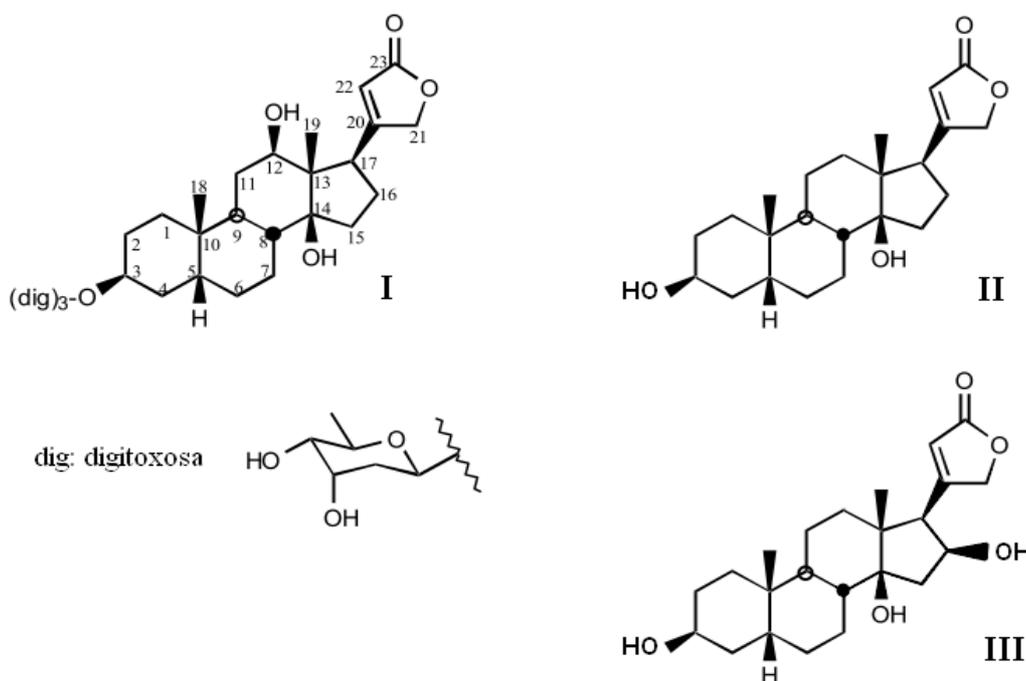


Figura 1. Estructura química de los cardenólidos. Como ejemplo, la digoxina (I) está formada por un núcleo esteroideo (aglicona) y tres unidades de digitoxosa. Las variaciones en el patrón de glicosilación de la aglicona dan lugar a los núcleos esteroideos de la digitoxina (II) y la gitoxina (III).

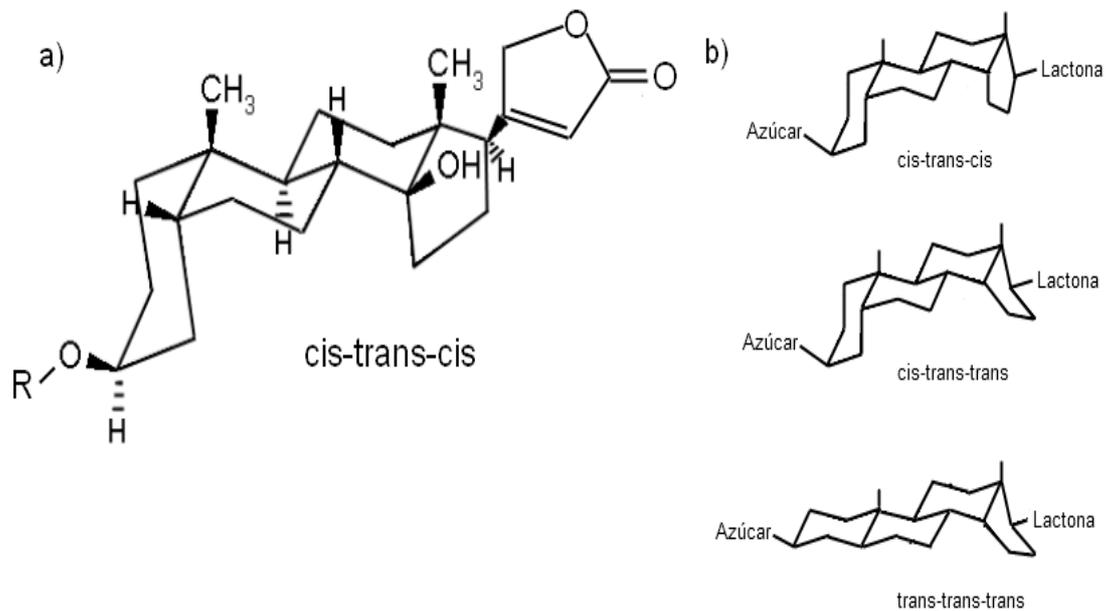


Figura 2. Estereoquímica *cis-trans-cis* de los cardenólidos (a) comparada con otras conformaciones del núcleo esteroideo (b).

Los glicósidos cardiotónicos pueden ser definidos como inhibidores alostéricos de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$, que se unen de manera no covalente a esta (Repke *et al.*, 1989). La ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ (E.C. 3.6.1.37) es una enzima transportadora presente en casi todos los tipos de células del reino animal. Su función es movilizar iones sodio hacia el exterior celular a la vez que transporta iones potasio a la célula, a costa de la hidrólisis de ATP. El gradiente iónico generado es utilizado como fuente de energía para el transporte de otros iones y moléculas necesarias para el funcionamiento celular (Skou, 1965).

De acuerdo con el mecanismo de acción de los glicósidos cardiotónicos, estos inhiben la mencionada ATPasa (alrededor del 30% con dosis terapéuticas) causando un incremento intracelular de Ca^{2+} en el músculo cardíaco y por consiguiente un aumento en la fuerza de la contracción (Thomas *et al.*, 1990). Dosis elevadas de estos glicósidos provocan la paralización en cadena de numerosos procesos de transporte secundario de iones y nutrientes que dependen de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$, lo cual conduce a la muerte celular y es la base de la toxicidad de estos compuestos. Debido a esto se ha propuesto que la función natural de los cardenólidos sea como repelentes de herbívoros que traten de

alimentarse de las hojas de plantas del género *Digitalis* (Malcolm y Zalucki, 1996; Pérez-Bermúdez *et al.*, 2010).

Metabolismo

Debido al potencial farmacológico de los cardenólidos, se han hecho consistentes esfuerzos por dilucidar sus rutas de biosíntesis y posterior degradación. Sin embargo, las limitaciones técnicas derivadas de la escasez de datos genómicos de esta especie combinadas con la complejidad de la red metabólica en la que se encuentran inmersos, ha provocado que el conocimiento de dichas vías metabólicas sea aún incompleto.

La biosíntesis de los cardenólidos puede decirse que comienza a partir de la degradación oxidativa de la cadena lateral de los fitosteroles (colesterol, campesterol, sitosterol, estigmasterol) por la enzima colesterol monooxigenasa (EC 1.14.15.6) o enzima degradadora de cadenas laterales (SCCE, del inglés: *side chain cleaving enzyme*) (Figura 3). El producto de esta reacción es la pregnenolona, la cual es oxidada reversiblemente a pregn-5-eno-3,20-diona por la enzima $\Delta^5\text{-}3\beta\text{-hidroxiesteroide}$ deshidrogenasa (EC 1.1.1.145) ($3\beta\text{HSD}$, siglas en inglés). Este último compuesto se

transforma rápidamente en su isómero pregn-4-eno-3,20-diona (progesterona). No queda claro si la actividad Δ^5 - Δ^4 cetosteroides isomerasa reside en la propia 3β HSD, en otra enzima asociada o si la reacción ocurre espontáneamente por vía no enzimática debido a la mayor estabilidad del producto Δ^4 (Lindemann y Luckner, 1997; Finsterbusch *et al.*, 1999).

La próxima reacción de la ruta es la reducción del doble enlace de la progesterona para dar 5α -pregnano-3,20-diona, primer compuesto en el que aparece la conformación 5α característica de los cardenólidos y que por consiguiente se considera el primer paso comprometido absolutamente con la producción de estos compuestos (Gavidia *et al.*, 2007). La reacción es catalizada por la progesterona- 5α -reductasa, actividad codificada por al menos dos genes en *D. purpurea* (Pérez-Bermúdez *et al.*, 2010). A continuación, la 5α -pregnano-3,20-diona es reducida en su posición C3 a 5α -pregnano- 3β -ol-20-ona por la propia 3β HSD (Finsterbusch *et al.*, 1999). La ruta continúa por derivados de pregnano a partir de las hidroxilaciones en C14 y C20 hasta la condensación en esta última posición con Acetil-CoA y la formación del anillo lactónico (Kreis *et al.*, 1998). La sucesión de enzimas en esta porción de la ruta, sin embargo, no se encuentra descrita.

En general, se asume que la adición de azúcares a la posición C3 se produce luego de la formación de la aglicona, aunque no existen evidencias definitivas acerca de la secuencia relativa de los eventos de glicosilación e hidroxilación. La glicosilación de los glicósidos secundarios a primarios es catalizada por la enzima citosólica y soluble UDP-glucosa: digitoxina 16'-O-glucosiltransferasa (DGT, EC 2.4.1.-) en *D. lanata* (Kreis *et al.*, 1986). Estos glicósidos primarios son considerados la forma fundamental de almacenamiento en la vacuola central (Hoelz *et al.*, 1992). Otra enzima relacionada con la biosíntesis tardía de los cardenólidos es la también soluble y citosólica Acetil-CoA:digitoxina 15'-O-acetiltransferasa (DAT, EC 2.3.1.-) que cataliza la formación de los lanatósidos a partir de sus precursores no acetilados (Sutor *et al.*, 1990). Este grupo de cardenólidos se denomina de esta forma por ser los más abundantes en *D. lanata*.

El metabolismo de degradación y movilización de los cardenólidos también ha sido estudiado. Al respecto, se han descrito las cardenólido glucohidrolasas (CGH) I y II. CGH-I es una enzima de membrana, mientras que CGH II es soluble en el citosol (May y Kreis, 1997; Hornberger *et al.*, 2000). Ambas hidrolizan rápidamente los glicósidos primarios vacuolares una vez que la compartimentación celular es eliminada, aunque sus especificidades de sustrato difieren. En particular, CGH II sólo acepta glicósidos no acetilados, de manera que no puede hidrolizar lanatósidos, que sí son procesados por CGH I. De manera general, ambas enzimas se relacionan con la movilización de cardenólidos desde la vacuola presumiblemente ante ataques de herbívoros (Hornberger *et al.*, 2000). Además, se ha descrito una lanatósido 15'-O-acetilasa, supuestamente vinculada a los mismos procesos de CGH-I y CGH-II (Sutor *et al.*, 1990).

Flexibilidad de la ruta de biosíntesis

Los esteroides son sustancias estructuralmente relacionadas con muchas y muy diversas funciones en la fisiología de las plantas. Estas pueden ser estructurales, hormonales, de defensa, etc. Como consecuencia de esto las rutas metabólicas que se involucran son a menudo complejas. En el caso de la biosíntesis de cardenólidos, la primera parte de la ruta hasta la formación de progesterona se ramifica hacia otras vías metabólicas en plantas (Mueller *et al.*, 2003). De hecho, el suministro de colesterol o pregnenolona al medio de cultivo de *D. purpurea* no se traduce en un aumento de la producción de cardenólidos según resultados publicados por Hagimori *et al.* (1983) y atribuidos al hecho de que estos esteroides son precursores de otras rutas metabólicas. Sin embargo, Sales *et al.* (2007) han logrado obtener líneas transgénicas de *Digitalis minor* que sobreexpresan el dominio catalítico de la enzima hidroximetil glutaril CoA reductasa (HMGC CoA reductasa) de *Arabidopsis thaliana* y presentan mayor contenido de cardenólidos que las plantas no transformadas. HMGC CoA reductasa es una enzima clave en la ruta de síntesis de esteroides que desemboca en la síntesis del colesterol, por lo que en principio su sobreexpresión debe afectar a todos los esteroides derivados de este, incluidos los cardenólidos.

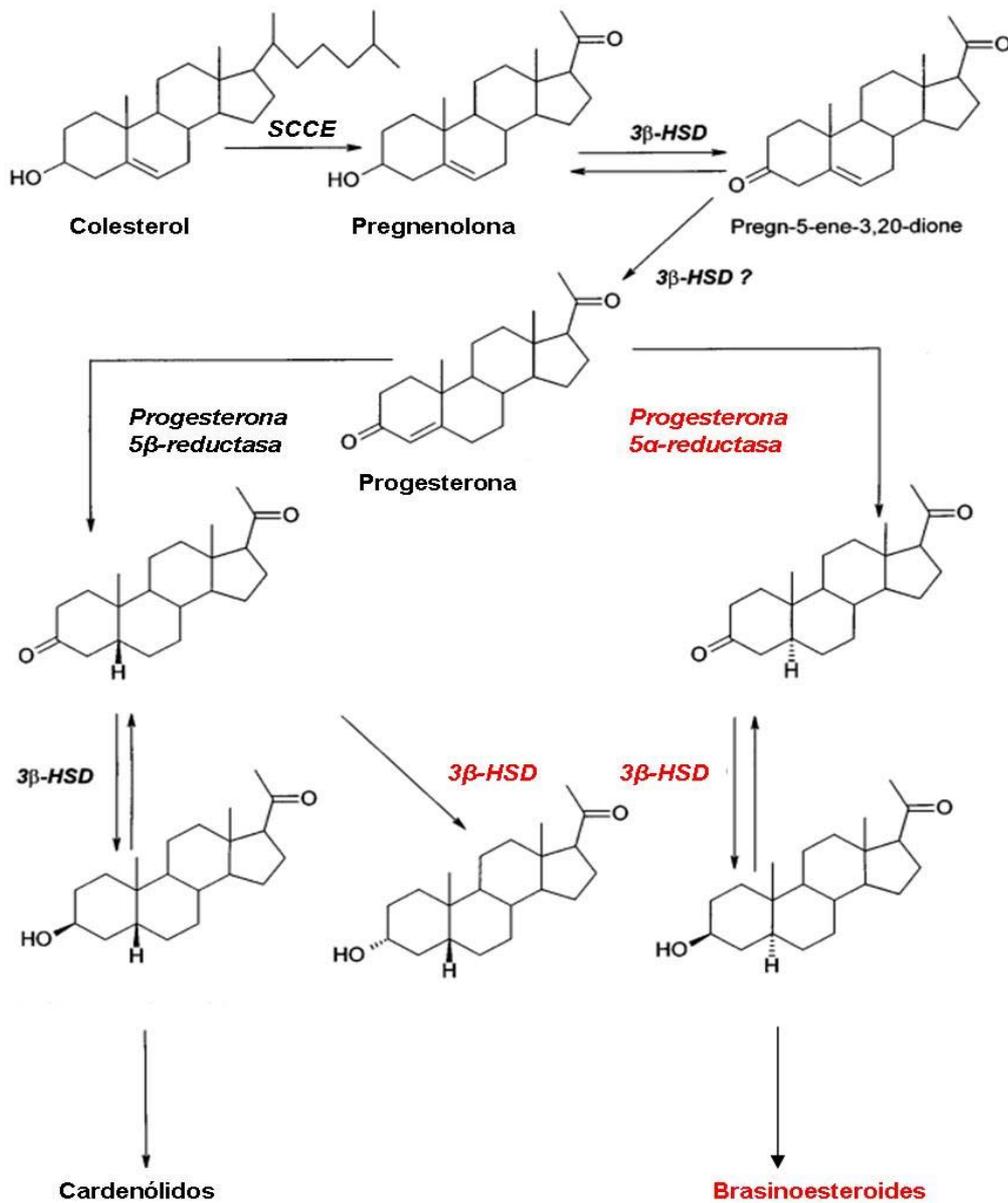


Figura 3. Biosíntesis de cardenólidos (color negro) y su relación con otras rutas metabólicas (color rojo). Los nombres de las enzimas se destacan en letra cursiva. Tomado de Fisterbusch *et al.* (1999), con modificaciones.

Existe por tanto una aparente contradicción con los experimentos de suministro de colesterol de Hagimori *et al.* (1983), que puede explicarse al considerar, por una parte, la diferente naturaleza de inducción metabólica que existe entre suministrar un metabolito y sobreexpresar un gen; y por otra, la aleatoriedad de los eventos de transformación genética que pueden provocar activación o represión de otros genes de manera que el efecto observado pueda no sólo deberse al transgén en sí, sino además, al lugar donde se inserte. Apunta a esto último

el hecho de que no todas las líneas transgénicas obtenidas en el mencionado trabajo mostraron un incremento en el contenido de cardenólidos.

Más adelante en la ruta, la enzima 3β-HSD es un buen ejemplo de plasticidad por cuanto cataliza varias reacciones tanto dentro de la biosíntesis de los cardenólidos como la de los pregnanos 5α-derivados (Finsterbusch *et al.*, 1999).

Sólo a nivel de la progesterona es que se observa una respuesta de síntesis de

glicósidos ante la administración del sustrato, lo cual soporta la hipótesis de que su reducción en 5 α es la primera reacción específica de la ruta (Gärtner y Seitz, 1993). No obstante, la progesterona se encuentra relacionada con otros procesos fisiológicos vegetales, aunque el conocimiento al respecto es limitado. Ylstra *et al.* (1995) demostraron que varias hormonas animales, incluida la progesterona, estimulaban la germinación y el crecimiento del tubo del polen en tabaco (*Nicotiana tabacum*). Además, se ha demostrado que puede inducir floración o desarrollo generativo en cebada (*Hordeum vulgare*) (Janeczko y Filek, 2002) y *A. thaliana* (Janeczko *et al.*, 2003).

La α -reducción de la progesterona a 5 α -pregnano-3,20-diona es el camino alternativo a la síntesis de los cardenólidos que puede seguir esta sustancia, para dar lugar a una ruta que desemboca en la síntesis de los brasinoesteroides (Clouse y Sasse, 2003; lino *et al.*, 2007). Estos son fitohormonas a las que se les atribuyen una variedad de funciones como la elongación celular, división celular, diferenciación vascular y modulación de respuestas a estrés (Clouse y Sasse, 2003).

Por último, el hallazgo de que la actividad progesterona 5 α -reductasa está codificada por al menos dos genes (*p5 α r* y *p5 α r2*) en *D. purpurea*, reafirma la complejidad del contexto de la ruta de los cardenólidos (Pérez-Bermúdez *et al.*, 2010). De estos dos genes, *p5 α r2* parece estar relacionado directamente con la biosíntesis en respuesta a condiciones de estrés, mientras que *p5 α r* mantiene una expresión basal que pudiera estar relacionado con otras funciones desconocidas (Pérez-Bermúdez *et al.*, 2010). Esto concuerda con el hecho de que su ortólogo en *A. thaliana* (*vep1*, del inglés: *Vein Patterning 1*) fue inicialmente involucrado en la diferenciación vascular (Jun *et al.*, 2002), y sólo después se demostró su actividad enzimática (Herl *et al.*, 2009) lo cual pone en tela de juicio el argumento de que la reducción 5 α de la progesterona es una reacción absolutamente comprometida con la síntesis de glicósidos cardiotónicos.

Todos estos elementos demuestran la relación de la biosíntesis de cardenólidos con otros procesos fisiológicos. Tal interconexión implica una fina regulación por parte de la planta, pero además entraña un reto en las proyecciones

de ingeniería metabólica para incrementar la producción de estos fármacos en el género *Digitalis*.

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE DIGITALIS

Antecedentes

Por su importancia en la industria farmacéutica, las plantas del género *Digitalis* han sido objeto de numerosas estrategias para aumentar su productividad. Desde hace décadas se han venido explorando las bondades del cultivo *in vitro* en este sentido. Sin embargo, los rendimientos obtenidos ya sea a partir de cultivos celulares o de brotes son significativamente menores que en condiciones de campo (Hirotsu y Furuya, 1977; Hagimori *et al.*, 1980; Pérez-Alonso *et al.*, 2009). Es por ello que la ampliación del conocimiento de las rutas de biosíntesis de cardenólidos ha incrementado el interés por incluir la transformación genética dentro de las alternativas de mejoramiento genético en este género. Sin embargo, hasta el momento existen solo unos pocos antecedentes de transformación genética en *Digitalis*.

Los trabajos más sostenidos de transformación en este género han sido realizados en la especie *D. minor*. En un primer intento, Sales *et al.* (2002) describieron la regeneración eficiente de la planta a partir de explantes foliares infectados con la cepa 82.139 de *Agrobacterium tumefaciens*. Durante el proceso de infección, el transgén reportero codificante para la subunidad A de la glucuronidasa (*gusA*) fue detectado en los tumores inducidos por la bacteria. Sin embargo, ni los brotes y raíces regenerados, ni las plantas obtenidas resultaron transformadas. Posteriormente, este mismo grupo de investigadores publicó un sistema de transformación mediado por *A. tumefaciens* en esta misma especie, pero esta vez utilizando las cepas EHA105 y AGL1 que contenían el transgén reportero *gusA* y genes marcadores de selección. En esta ocasión, una vez más los explantes de partida utilizados fueron discos de hojas de plantas cultivadas *in vitro* y se empleó acetosiringona como estimulante de la virulencia de *Agrobacterium* en las fase de cocultivo (Sales *et al.*, 2003). Dicho sistema

de transformación fue utilizado para obtener plantas de *D. minor* que sobreexpresaban el dominio catalítico de HMGC_oA reductasa de *A. thaliana* (Sales *et al.*, 2007). Algunas de las líneas obtenidas presentaron un mayor contenido de cardenólidos (hasta un 40%) tanto *in vitro* como en condiciones de invernadero. Sin embargo, los efectos pleiotrópicos de esta enzima sobre el metabolismo esteroideo ponen en duda su aplicabilidad en la transformación de otras especies del género.

En *D. lanata*, Lehmann *et al.* (1995) desarrollaron un protocolo de transformación de discos de hojas por infección con *Agrobacterium tumefaciens*, mientras que dos años más tarde este mismo grupo logró la transformación de esta planta a partir del mismo tipo de explante pero a través de la infección con *Agrobacterium rhizogenes* (Pradel *et al.*, 1997). Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito la transformación de *D. lanata* con ningún gen de interés en la biosíntesis de cardenólidos.

En cuanto a *D. purpurea*, ya en 1990 Saito y colaboradores lograron la transferencia de un vector T al genoma de esta especie a través de la transformación de discos de hojas de la planta con la bacteria *A. rhizogenes*. Esta bacteria es capaz de inducir la rizogénesis por lo que estos investigadores lograron la generación y el cultivo de raíces transgénicas, sin embargo, no lograron la regeneración de plantas transformadas a partir de estas (Saito *et al.*, 1990).

Selección de nuevos genes candidatos para transformación de *Digitalis*

La selección de genes candidatos para la transformación genética no es una tarea fácil. El análisis de la siempre creciente cantidad de datos biológicos generados en la actualidad ha revelado una relación compleja entre los diferentes *loci* y los caracteres fenotípicos, de manera que varios *loci* pueden tener diferentes grados de influencia en cada carácter (Mcmullen *et al.*, 1998). Esta realidad ha impulsado el desarrollo de enfoques que abarcan diferentes fuentes de datos para resolver el problema, como la búsqueda de genes candidatos para la caracterización de *loci* con influencia fenotípica cuantitativa (QTL, del inglés: *quantitative trait loci*) (Pflieger *et al.*,

2001). Este tipo de enfoques, sin embargo, requieren de un volumen de datos genómicos y/o fenotípicos con los que no se cuenta por el momento para las especies de *Digitalis* en relación con su producción de cardenólidos. La selección del candidato óptimo para obtener plantas transformadas altamente productivas debe basarse, por lo tanto, en la información existente sobre los pocos genes conocidos que influyen en las rutas de biosíntesis y degradación de estos metabolitos.

Ya ha sido referido que la mayoría de los autores coinciden en señalar a la actividad Progesterona 5- α -reductasa como el paso clave de la ruta de biosíntesis, por lo que en principio un gen codificante para esta enzima sería el candidato más promisorio a sobreexpresar en alguna de estas especies para aumentar su productividad. Sin embargo, la existencia de al menos dos isoformas de este gen con funciones presuntamente diferentes genera dudas sobre los efectos que su sobreexpresión podría traer.

La función del ortólogo de esta pareja de genes en *A. thaliana* fue descrita hace años como 'influencia en el patrón de venación' debido al fenotipo anormal mostrado por una línea mutante de este gen (*locus* At4g24220), denominado entonces *vep1* (del inglés *Vein patterning 1*) (Jun *et al.*, 2002). Posteriormente, Herl *et al.* (2009) demostraron que *vep1* en efecto codifica una proteína con actividad progesterona 5- α reductasa. Es posible, por lo tanto, que alguno de los dos ortólogos de *Digitalis* (*p5 α r* y *p5 α r2*) tenga también influencia en la morfogénesis u otro proceso fisiológico, y su sobreexpresión pueda traer consigo alguna alteración fisiológica no deseable. Esta hipótesis es, además, soportada por el hecho de que estos dos genes tienen patrones de expresión diferentes: *p5 α r* aparece como constitutivo ante diversas condiciones de estrés mientras que *p5 α r2* presenta una expresión basal mínima y es altamente inducido por etileno y H₂O₂ (Pérez-Bermúdez *et al.*, 2010). Además, la expresión de *p5 α r2* está directamente correlacionada con los niveles de cardenólidos, a diferencia de *p5 α r*. En consecuencia, estos autores proponen que *p5 α r* pudiera tener otras funciones fisiológicas mientras que *p5 α r2* sería el responsable de la producción de glicósidos.

La manipulación de las señales de expresión de este último gen con miras a amplificar su perfil de expresión inducible parece ser, por tanto, una estrategia interesante para ser utilizada en la transformación de *Digitalis*. La producción de cardenólidos en las plantas resultantes podría ser incrementada, especialmente *in vitro*, mediante la regulación precisa de las condiciones de cultivo. Esto podría ser posible mediante el desarrollo de estrategias de producción en dos etapas, que comprendan primero la producción de biomasa vegetal y luego la inducción de la biosíntesis de cardenólidos.

CONCLUSIONES

Las plantas del género *Digitalis* ofrecen grandes potencialidades para la aplicación de técnicas biotecnológicas con el fin de incrementar la producción de cardenólidos y su uso en la industria farmacéutica. La existencia de protocolos de transformación genética en especies del género y los avances en este sentido en otras apuntan al uso de esta estrategia de mejoramiento. Sin embargo, la información concerniente a los genes candidatos es aún incompleta. En este sentido, parece promisorio la transformación con uno de los genes codificantes para la progesterona 5- α reductasa, aunque se requieren estudios funcionales de estos genes para determinar bajo qué señales regulatorias debe ubicarse el transgén y qué efectos sobre la viabilidad de la planta podría traer su sobreexpresión. A pesar de esto la manipulación de la expresión de *p5 α r2*, especialmente mediante la composición del medio de cultivo *in vitro*, parece una estrategia interesante para maximizar la biosíntesis de cardenólidos previa producción de biomasa vegetal.

REFERENCIAS

- Charest PJ, Caléro N, Lachance D, Datta RSS, Duchêsne LC, Tsang EWT (2004) Microprojectile-DNA delivery in conifer species: factors affecting assessment of transient gene expression using the β -glucuronidase reporter gene Plant Cell Reports 12(4): 189-193
- Clouse SD, Sasse JM (2003) Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. Annual review of plant physiology and plant molecular biology 49(1): 427-451
- De Clercq J, Zambre M, Montagu MV, Dillen W, Angenon G (2002) An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation procedure for *Phaseolus acutifolius* A. Gray. Plant Cell Reports 21: 333-340
- Ferriar J (1799) An Essay on the Medical Properties of *Digitalis purpurea*, or foxglove. Manchester
- Finsterbusch A, Lindemann P, Grimm R, Eckerskorn C, Luckner M (1999) Δ^5 - 3β -Hydroxysteroid dehydrogenase from *Digitalis lanata* Ehrh. – a multifunctional enzyme in steroid metabolism? Planta 209(4): 478-486
- Gärtner DE, Seitz HU (1993) Enzyme activities in cardenolide-accumulating, mixotrophic shoot cultures of *Digitalis purpurea* L. Journal of Plant Physiology 141: 269-275
- Gavidia I, Tarrío R, Rodríguez-Trelles F, Pérez-Bermúdez P, Ulrich Seitz H (2007) Plant progesterone 5[β]-reductase is not homologous to the animal enzyme. Molecular evolutionary characterization of P5[β]R from *Digitalis purpurea*. Phytochemistry 68(6): 853-864
- Hagimori M, Matsumoto T, Kasaki T (1980) Studies on the production of *Digitalis* cardenolides by plant tissue culture I. Determination of digitoxin and digoxin contents in first and second passage calli and organ redifferentiating calli of several *Digitalis* species by radioimmunoassay. Plant and cell physiology 21(8): 1391-1404
- Hagimori M, Matsumoto T, Obi Y (1982) Studies on the Production of *Digitalis* Cardenolides by Plant Tissue Culture: II. Effect of light and plant growth substances on digitoxin formation by undifferentiated cells and shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. grown in liquid media. Plant Physiol. 69(3): 653-656
- Hagimori M, Matsumoto T, Obi Y (1983) Effects of mineral salts, initial pH and precursors on Digitoxin formation by shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. Grown in liquid media. Agricultural and Biological Chemistry 47(3): 565-571
- Herl V, Albach D, Müller-Uri F, Bräuchler C, Heubl G, Kreis W (2008) Using progesterone 5 α -reductase, a gene encoding a key enzyme in the cardenolide biosynthesis, to infer the phylogeny of the genus *Digitalis*. Plant Systematics and Evolution 271(1): 65-78
- Herl V, Fischer G, Müller-Uri F, Kreis W (2005) Molecular cloning and heterologous expression of progesterone 5 α -reductase from *Digitalis lanata* Ehrh. Phytochemistry 67(3): 225-231
- Herl V, Fischer G, Reva VA, Stiebritz M, Müller YA, Müller-Uri F, Kreis W (2009) The *vep1* gene

- (At4g24220) encodes a short-chain dehydrogenase/reductase with 3-oxo-[Delta]4,5-steroid 5[beta]-reductase activity in *Arabidopsis thaliana* L. *Biochimie* 91(4): 517-525
- Hirotsu M, Furuya T (1977) Restoration of cardenolide-synthesis in redifferentiated shoots from callus cultures of *Digitalis purpurea*. *Phytochemistry* 16(5): 610-611
- Hoelz H, Kreis W, Haug B, Reinhard E (1992) Storage of cardiac glycosides in vacuoles of *Digitalis lanata* mesophyll cells. *Phytochemistry* 31(4): 1167-1171
- Hornberger M, Böttigheimer U, Hillier-Kaiser A, Kreis W (2000) Purification and characterisation of the cardenolide-specific[beta]-glucohydrolase CGH II from *Digitalis lanata* leaves. *Plant physiology and biochemistry* 38(12): 929-936
- Hultén E (1968) Flora of Alaska and Neighbourin territories. Stanford University Press. Stanford, CA.
- Iino M, Nomura T, Tamaki Y, Yamada Y, Yoneyama K, Takeuchi Y, Mori M, Asami T, Nakano T, Yokota T (2007) Progesterone: Its occurrence in plants and involvement in plant growth. *Phytochemistry* 68(12): 1664-1673
- Janeczko A, Filek W (2002) Stimulation of generative development in partly vernalized winter wheat by animal sex hormones. *Acta Physiologiae Plantarum* 24(3): 291-295
- Janeczko A, Filek W, Biesaga-Kococielniak J, Marcińska I, Janeczko Z (2003) The influence of animal sex hormones on the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: comparison with the effect of 24-epibrassinolide. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72(2): 147-151
- Jun JH, Ha CM, Nam HG (2002) Involvement of the *vep1* Gene in vascular strand development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 43(3): 323-330
- Kreis W, Hensel A, Stuhlemmer U (1998) Cardenolide biosynthesis in foxglove. *Planta Medica* 64: 491-499
- Kreis W, May U, Reinhard E (1986) UDP-glucose:digitoxin 162-O-glucosyltransferase from suspension-cultured *Digitalis lanata* cells. *Plant Cell Reports* 5(6): 442-445
- Lehmann U, Moldenhauer D, Thomar S, Dietrich B, Luckner M (1995) Regeneration of plants from *Digitalis lanata* cells transformed with *Agrobacterium tumefaciens* carrying bacterial genes encoding neomycin phosphotransferase II and β -glucuronidase. Elsevier. Munich
- Lindemann P, Luckner M (1997) Biosynthesis of pregnane derivatives in somatic embryos of *Digitalis lanata*. *Phytochemistry* 46(3): 507-513
- Malcolm S, Zalucki M (1996) Milkweed latex and cardenolide induction may resolve the lethal plant defence paradox. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 80(1): 193-196
- May U, Kreis W (1997) Purification and characterization of the cardenolide-specific beta-glucohydrolase CGH I from *Digitalis lanata* leaves. *Plant physiology and biochemistry* 35(7): 523-532
- Mcmullen MD, Byrne PF, Snook ME, Wiseman BR, Lee EA, Widstrom NW, Coe EH (1998) Quantitative trait loci and metabolic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(5): 1996-2000
- Melero CP, Medarde M, San Feliciano A (2000) A short review on cardiotonic steroids and their aminoguanidine analogues. *Molecules* 5: 51-81
- Mueller LA, Zhang P, Rhee SY (2003) AraCyc: A Biochemical Pathway Database for *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 132(2): 453-460
- Neczypor W (1969) Alkaloid content of some native sources of *Vinca minor* L. (evergreen) under field conditions. *Pharmazie* 24(5): 273-274
- Pérez-Alonso N, Wilken D, Gerth A, Jahn A, Nitzsche H-M, Kerns G, Capote-Perez A, Jiménez E (2009) Cardiotonic glycosides from biomass of *Digitalis purpurea* L. cultured in temporary immersion systems. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 99: 151-156
- Pérez-Bermúdez P, García AaM, Tuñón I, Gavidia I (2010) *Digitalis purpurea* P5-beta-R2, encoding steroid 5-beta-reductase, is a novel defense-related gene involved in cardenolide biosynthesis. *New Phytologist* 185(3): 687-700
- Pflieger S, Lefebvre V, Causse M (2001) The candidate gene approach in plant genetics: a review. *Molecular Breeding* 7(4): 275-291
- Pradel H, Dumke-Lehmann U, Dietrich B, Luckner M (1997) Hairy root cultures of *Digitalis lanata*. Secondary metabolism and plant regeneration. Elsevier. Munich
- Repke KRH, Schönfeld W, Weiland J, Megges R, Hache A (1989) Design of Enzyme Inhibitors as Drugs, pp. 435-502. Oxford University Press. Oxford
- Roig JT (1974) Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. Editorial Ciencia y Técnica, Instituto del Libro. La Habana

- Saito K, Shimomura MYK, Yoshimatsu K, Murakoshi I (1990) Genetic transformation of foxglove (*Digitalis purpurea*) by chimeric foreign genes and production of cardioactive glycosides. *Plant Cell Reports* 9: 121-124
- Sales E, Muñoz-Bertomeu J, Arrillaga I, Segura J (2007) Enhancement of cardenolide and phytosterol levels by expression of an N-terminally truncated 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in transgenic *Digitalis minor*. *Planta Medica* 73: 605-610
- Sales E, Nebauer SG, Arrillaga I, Segura J (2002) Plant hormones and *Agrobacterium tumefaciens* strain 82.139 induce efficient plant regeneration in the cardenolide-producing plant *Digitalis minor*. *Journal of Plant Physiology* 159(1): 9-16
- Sales E, Segura J, Arrillaga I (2003) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of the cardenolide-producing plant *Digitalis minor*. *Planta Medica* 69: 143-147
- Skou JC (1965) enzymatic basis for active transport of Na⁺ and K⁺ across cell membrane. *Physiol. Rev.* 45(3): 596-618
- Stuhlemmer U, Kreis W (1996) Cardenolide formation and activity of pregnane-modifying enzymes in cell suspension cultures, shoot cultures and leaves of *Digitalis lanata*. *Plant Physiol Biochem* 34: 85-91
- Sutor, R, Hoelz H, Kreis W (1990) Lanatoside 15'-O-acetylcysteine from *Digitalis lanata* plants and cell cultures. Elsevier. Munich
- Thomas R, Gray P, Andrews J (1990) *Digitalis*: its mode of action, receptor, and structure-activity relationships. *Advances in Drug Research* 19: 311-562
- Venepoorte R, Van Der Heiden R, Tan Hoopen HJG, JM (1999) Metabolic engineering of plant secondary metabolic pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnology letters* 21: 467-479
- Withering W (1785) An account of the introduction of foxglove into medical practice. Londres
- Ylstra B, Touraev A, Brinkmann AO, Heberle-Bors E, Van Tunen AJ (1995) Steroid hormones stimulate germination and tube growth of *in vitro* matured tobacco pollen. *Plant Physiol.* 107: 639-643