

Ensayos

Biotecnología de plantas medicinales: generando fármacos de un futuro tornado presente.

Resumen

Grandes logros se han suscitado en el área de la biotecnología vegetal, sin embargo, poco acertada es la divulgación de los importantes alcances de la vertiente etnobotánica y su aplicación a la salud pública. Este escrito tiene como finalidad, dar algunos ejemplos de cómo las plantas medicinales usadas desde tiempos inmemorables en México y en el mundo entero, hoy en día constituyen una fuente recurrente para la obtención de nuevas moléculas con actividad biológica. ¿Qué tipo de enfermedades devastadoras para el ser humano se han contrarrestado a partir de biofármacos?; y ¿Que novedosas plataformas de tecnología biológica permiten la manipulación controlada de estos compuestos?, son temas abordados igualmente en este documento.

Abstract

Great advances have been achieved in the area of plant bio-technology, however, it has not been enough publication about the important ethno-botanical aspects and its applications in public health. This paper describes some examples of how medicinal plants from Mexico and the whole world represent a valuable source for the discovery of novel bioactive molecules. What type of devastating human diseases have been counteracted by biopharmaceuticals?; and What biotechnological platforms support the controlled manipulation of these compounds?, both questions are discussed in this document.

Résumé

De grandes réussites se sont produites en biotechnologie végétale, cependant la divulgation des progrès importants réalisés en ethnobotanique et ses applications dans le domaine de la santé publique reste peu abordée. Ce document vise à donner quelques exemples illustrant comment les plantes médicinales, utilisées depuis des temps immémoriaux au Mexique et dans le monde entier, constituent actuellement une source inépuisable pour l'obtention de nouvelles molécules bioactives. ¿Quel type de maladies dévastatrices pour l'être humain ont été éradiquées à partir de la biopharmaceutique?; ¿Quelles nouvelles plateformes biotechnologiques permettent la manipulation contrôlée de ces composés?, tels sont également des thèmes abordés dans ce document.

* Nemesio Villa-Ruano, Yesenia Pacheco-Hernández, Erika Beatriz Lara-Zaragoza, José Franco-Monsreal, Ingrid Montserrat Cardeña-Bozziere, Oscar Trinidad Galván-Valencia, Luis Miguel Ruiz-Gómez.

Palabras clave:

Plantas medicinales, investigación, moléculas bioactivas, manipulación genética.

Introducción

Por siglos el ser humano ha usado las plantas como remedio para curar enfermedades. Inevitablemente, resulta común para muchas personas asociar a las plantas medicinales con brujos, chamanes, curanderos de sectas religiosas, santería o con productos naturistas de dudosa certificación clínica. Aunque este fenómeno es en cierta medida un hecho incidente en todo el mundo, es necesario separar las actividades empíricas de la experimentación sistemática y objetiva llevada a cabo en ejemplares etnobotánicos. Con esto, se pretende únicamente diferenciar ambas, pero nunca menospreciar los usos del legado ancestral basados en la experiencia. Más bien, se reconoce en primera instancia que las raíces antiguas del empleo medicinal, son el motivo real que impulsa investigaciones más profundas que permiten validar objetivamente el uso terapéutico de los especímenes en cuestión. La exploración sistemática de las plantas medicinales tiene como objetivo esencial conocer la química

* Universidad de la Sierra del Sur.

intrínseca, con la finalidad de obtener nuevas drogas que después de ser sujetas a pruebas clínicas que demuestren su efectividad, puedan incorporarse al mercado farmacéutico como medicamentos patentados. Desde mediados del siglo XX, la química vegetal o fitoquímica ha sido una herramienta muy importante para la obtención de extractos herbolarios, usados como medicamentos. La extracción de los principios activos por medio de la fitoquímica se basa en conceptos básicos de la polaridad de las moléculas. De acuerdo a los mismos, se han desarrollado técnicas analíticas de separación, que facilitan la obtención de perfiles químicos detallados, lo que a su vez permite la identificación y el aislamiento de moléculas bioactivas con mayor rapidez y precisión. Dentro de éstas, destacan en orden creciente de complejidad las cromatografías de capa delgada (TLC), de alta presión de líquidos (HPLC), de gases (GC), y líquida de ultra-resolución (UPLC); que en acoplamiento con análisis espectrométricos de masas (MS) y resonancia magnética nuclear (NMR), han conducido a surgimiento de la “metabolómica”, una disciplina que procede a la genómica y a la proteómica. Resulta interesante cómo algunas técnicas implícitas en estas tres áreas del conocimiento se han aplicado al estudio de las plantas medicinales, y cómo han aportado conocimiento valioso para contrarrestar enfermedades devastadoras como el cáncer, el SIDA, la malaria (paludismo), la diabetes, que en conjunto representan las tasas de mortalidad más altas de México y del mundo. ¿Cómo ha influido la biotecnología y los organismos genéticamente modificados (OGM) en aspectos relacionados a la salud del hombre? Este escrito tiene como finalidad mostrar algunas bondades de dichas técnicas y recursos.

Metabolismo de plantas

De manera práctica, las plantas y algunos microorganismos poseen dos tipos básicos de metabolismo:

primario y secundario. Dentro del primario se hace énfasis en la síntesis de moléculas esenciales como carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. En el caso del secundario, se envuelven todas las reacciones químicas que producen compuestos con actividades alelopáticas, de defensa contra patógenos, entre otras funciones ecológicas. Gran parte de los metabolitos “secundarios”, también conocidos como productos naturales, entre los que se incluyen terpenoides, alcaloides, fenilpropanoides y policétidos (Figura 1), son sintetizados en respuesta a la adaptación de las plantas al medio ambiente (Croteau et al., 2000). Por mera coincidencia, algunos de estos componentes tienen una actividad terapéutica en el ser humano, es un error pensar que las plantas producen metabolitos exclusivamente para curarnos. Cabe señalar que muchos científicos se inclinan por el estudio de la función que desempeñan los productos naturales dentro de la misma planta. Sin embargo, la mayoría de las investigaciones y financiamientos son destinados a sus propiedades curativas. Es importante mencionar que ambas actividades son relevantes y complementarias.

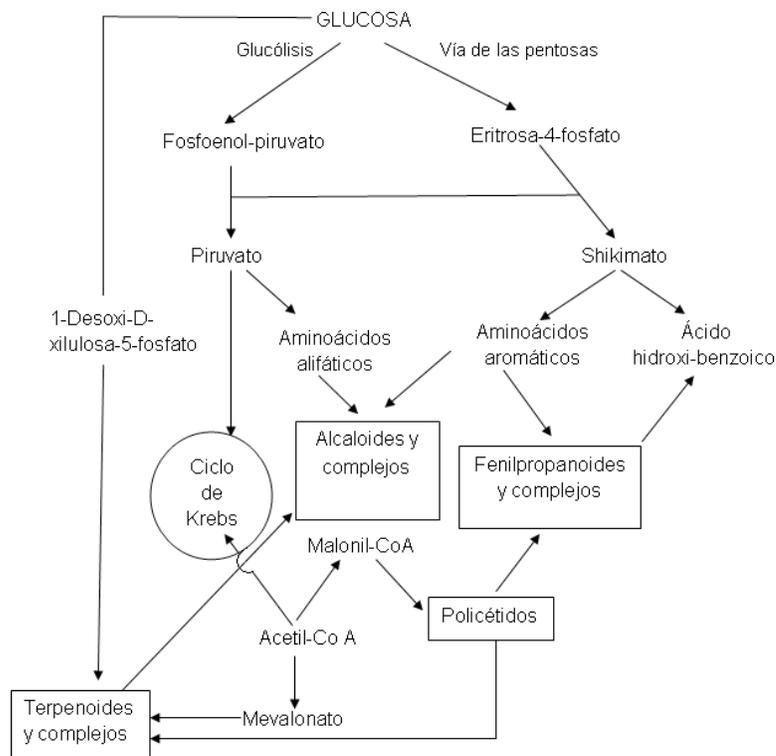


FIGURA 1. REDES METABÓLICAS SECUNDARIAS DE PLANTAS, EN DONDE SE MUESTRAN LOS PRINCIPALES BLOQUES DE PRODUCTOS NATURALES Y SU INTERACCIÓN.

Ingeniería metabólica de plantas y microorganismos

Como se describió anteriormente, las disciplinas biotecnológicas son perfectamente aplicables a los vegetales. Si se trata del descubrimiento de nuevas drogas, los estudios metabolómicos son indispensables. Éstos dependen de un análisis instrumental de punta como es la cromatografía líquida de ultra resolución acoplada a masas (UPLC-MS), como un ejemplo. Quizá para muchos investigadores representa una gran desventaja el elevado costo de adquisición y mantenimiento de esta clase de equipos, desafortunadamente, son necesarios para responder a las exigencias de calidad científica y tecnológica modernas, establecidas para el descubrimiento de fitofármacos. La principal ventaja de los métodos analíticos es que arrojan datos que

facilitan la caracterización completa de una molécula determinada. Una vez obtenida la información sobre su estructura, ésta puede ser obtenida artificialmente por métodos químicos. Limitantemente, existe una relación proporcional entre la complejidad de la molécula con la inversión de tiempo y recursos económicos empleados en su manufactura por dichos medios. Es en este punto, donde la ingeniería metabólica se postula como una alternativa viable y de bajo costo para la obtención controlada de principios bioactivos. La ingeniería metabólica toma ventaja del conocimiento de las secuencias de DNA involucradas en la síntesis y regulación de las enzimas provenientes de rutas metabólicas, que en conjunto generan una serie de productos farmacológicos y/o nutracéuticos en una especie biológica particular. Las secuencias son extraídas de un organismo de interés e

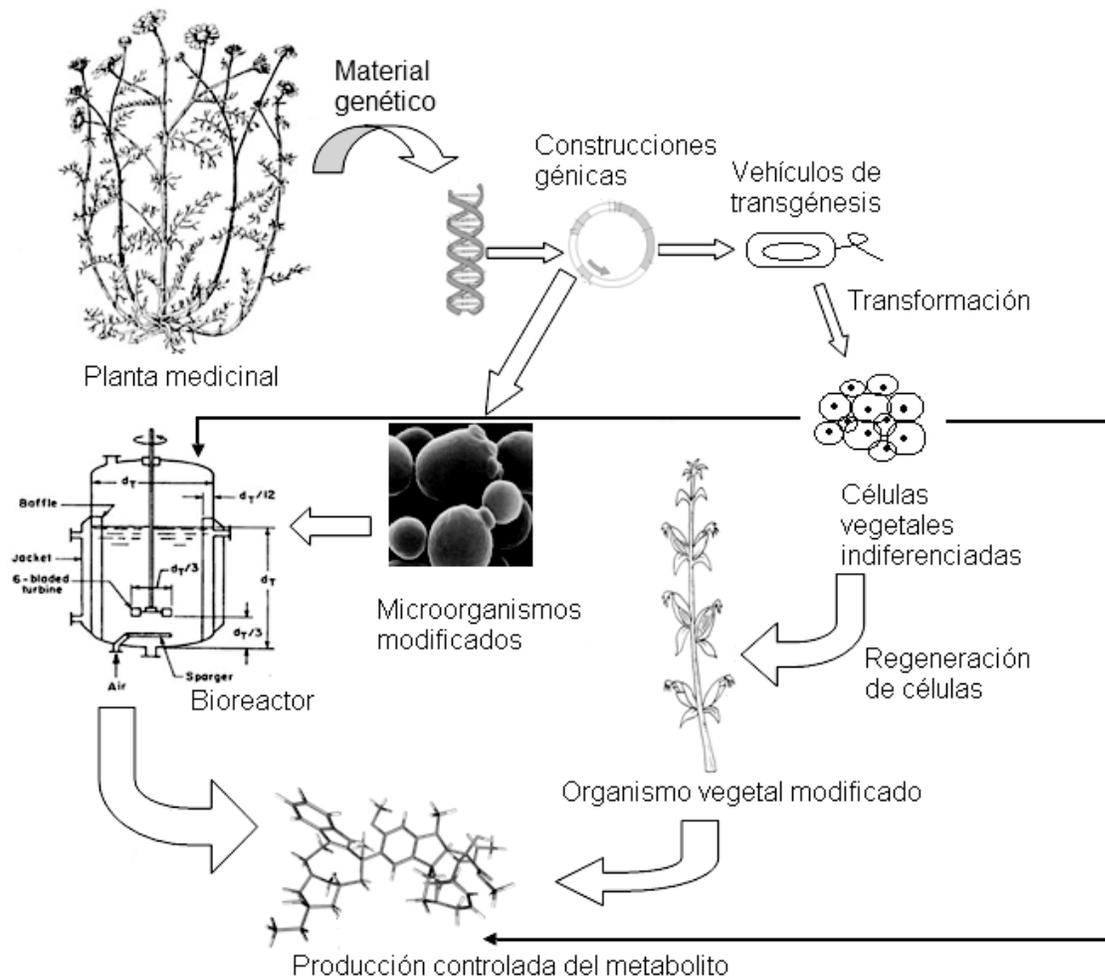


FIGURA 2. ESQUEMA REPRESENTATIVO DEL PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA OBTENCIÓN DE FITOFÁRMACOS POR MEDIO DE INGENIERÍA GENÉTICA-METABÓLICA.

incertadas en otros genéticamente manipulables, que bien pueden ser microorganismos o plantas modelo. De tal forma que el metabolismo del OGM resultante estará dirigido principalmente hacia la síntesis de un compuesto en especial que bajo condiciones naturales no producen, o lo hacen de manera mínima. En la figura 2 se esquematizan el proceso para la generación de organismos modificados por ingeniería genética-metabólica. Para la generación de plantas transformadas, dos tipos de metodologías son comúnmente usadas: cepas acarreadoras de *Agrobacterium spp* y *biobalística* (método físico-mecánico). Complementariamente, el cultivo de tejidos vegetales es un medio que apoya a la transgénesis, ya que ésta se produce más efectivamente en células con cierto grado de diferenciación, que en tejidos que ya lo están completamente. Es meritorio recalcar que el cultivo de tejidos in vitro puede conducir bajo ciertas condiciones, a la producción del compuesto de interés, únicamente variando la composición y concentración de los reguladores y/o fuentes de carbono del medio de crecimiento, sin necesidad de transgénesis. Aunque no es estrictamente ingeniería metabólica, se usa para el mismo fin. Para el caso de los microorganismos modelo, (*Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, como ejemplo), el proceso de transgénesis se realiza por métodos convencionales químico-térmicos, que son más sencillos y rápidos que los utilizados en plantas. El ciclo de vida de los microorganismos modificados facilita su empleo como materia prima para la elaboración de bioreactores que suministren la obtención de un compuesto bioactivo a disposición (Figura 2). En seguida se presentan algunos ejemplos de fitofármacos producidos mediante estas dos técnicas.

Fitofármacos contra el cáncer

El cáncer es una enfermedad mundial que implica en cualquiera de sus variantes, cambios moleculares en la división celular y apoptosis. En México y de acuerdo con el Instituto Nacional de Cancerología (Mohar et al., 1997), los tumores malignos representan la segunda causa de muerte. A partir de productos naturales como el Taxol (Paclitaxel®) comercializado desde hace más de una década, y aislado del “Tejo” (*Taxus spp*), se comenzó con la búsqueda de antineoplásicos naturales con igual o mayor actividad. El taxol es un compuesto que deriva de la

ruta general de los terpenoides, es efectivo contra el cáncer de ovario, pulmón y pecho (Wani, et al., 1971). Debido a su compleja estructura (Figura 3), la síntesis química resulta inviable, por ello, sobresalientes esfuerzos usando células en suspensión (cultivo de tejidos) de *Taxus spp* han conducido a la formación de proto-biorreactores naturales que sintetizan el terpeno de manera activa (Navia-Osorio et al., 2002). Concentraciones que superan los 21 mg L⁻¹ del compuesto, se obtienen tan solo en periodos que van de los 20-25 días en condiciones controladas de temperatura y luz. El taxadieno, precursor del taxol, ha sido obtenido por ingeniería metabólica en levaduras a concentraciones que van de los 8.5 a los 8.7 mg L⁻¹ (Engels et al., 2008). Dado que las levaduras son mucho más fáciles de mantener en rendimientos y costos que los cultivos verdes, la expresión de precursores en estos microorganismos resulta alentadora. Un ejemplo más de planta anti-cáncer, es la “Vinca de Madagascar” (*Catharanthus roseus*), también conocida en Tabasco y Oaxaca como “Teresita”, que produce los complejos terpeno-indol-alcaloides vinblastina y vincristina (Figura 3), comercializados bajo el nombre de Velban® y Oncovin® respectivamente. Estas moléculas son potentes inhibidores mitóticos utilizados en la quimioterapia de la leucemia (Simmingsköld et al., 1981). Siendo estructuras complicadas de sintetizar químicamente al igual que el taxol, las aproximaciones biotecnológicas representan la mejor vía para su obtención. Experimentos de ingeniería metabólica empleando cepas de *Agrobacterium rhizogenes* han resultado en la generación de raíces peludas (hairy roots) de *C. roseus*, cuyo metabolismo ha sido canalizado a la biosíntesis de precursores como la vindolina y otros alcaloides relacionados como la serpentina y ajmalicina que individualmente poseen actividad anti-hipertensiva (Bhadra et al., 1993; Liu et al., 2007). Más recientemente la producción de vblastina y vincristina ha sido estimulada como nunca antes en cultivos de tejidos mediante nuevas combinaciones de auxinas y citocininas. Las concentración logradas fueron del 0.0004% del peso seco que equivale a 2.5 µg de alcaloide neto por callo además de una alta eficiencia de callos (>1000) (Ataei-Azimi et al., 2008). Cantidades suficientes para ser usadas en terapia contra el cáncer.

Fitofármacos contra el SIDA

Poco divulgado es el empleo de vegetales como medio para la fabricación de vacunas. Hoy en día algunos vegetales genéticamente modificados que expresan proteínas recombinantes con actividad antigénica, han sido aprobados por la “Administración de alimentos y drogas”, FDA por sus siglas en inglés (Whitman, 2000). La producción de antígenos anti-VIH en plantas es segura, de bajo costo y eficiente. La proteína p24, que constituye parte de la cubierta de la cápside viral, se considera un componente crucial en la generación de anticuerpos contra el VIH. Esta poliproteína de 50 kD ha sido generada en plantas de tabaco con un rendimiento de 3.5 mg g⁻¹ de peso seco de planta (Zhang et al., 2002), y también producida en *Escherichia coli* con resultados similares. La administración intraperitoneal de la proteína medicinal fusionada con otros componentes

ha sido promisoría en la respuesta inmune contra el VIH, de acuerdo a experimentos preliminares con ratas (Donaire et al., 2009). El desarrollo de vacunas orales a partir de vegetales transgénicos es una novedosa forma de inmunización. Zanahorias, tomates lechugas papayas, entre otros, han sido empleados como vehículos de inoimmunogénicos contra el VIH y el virus de la hepatitis B (BH) (Mei et al., 2006). Una destacable cantidad de productos naturales de plantas parecen inhibir activamente a la enzima que se encarga de retrotranscribir el material genético del VIH (*transcriptasa reversa*), un paso crítico en el proceso infeccioso del virus. Dentro de los más destacables se encuentran los fenilpropanoides calanólido A (Figura 3), B y C, y la 3-hidroxi metil-4-metil DCK, protegido intelectualmente por Pancos Pharmaceutical Corp. La eficacia de estas drogas las mantiene como candidatos clínicos fase II para

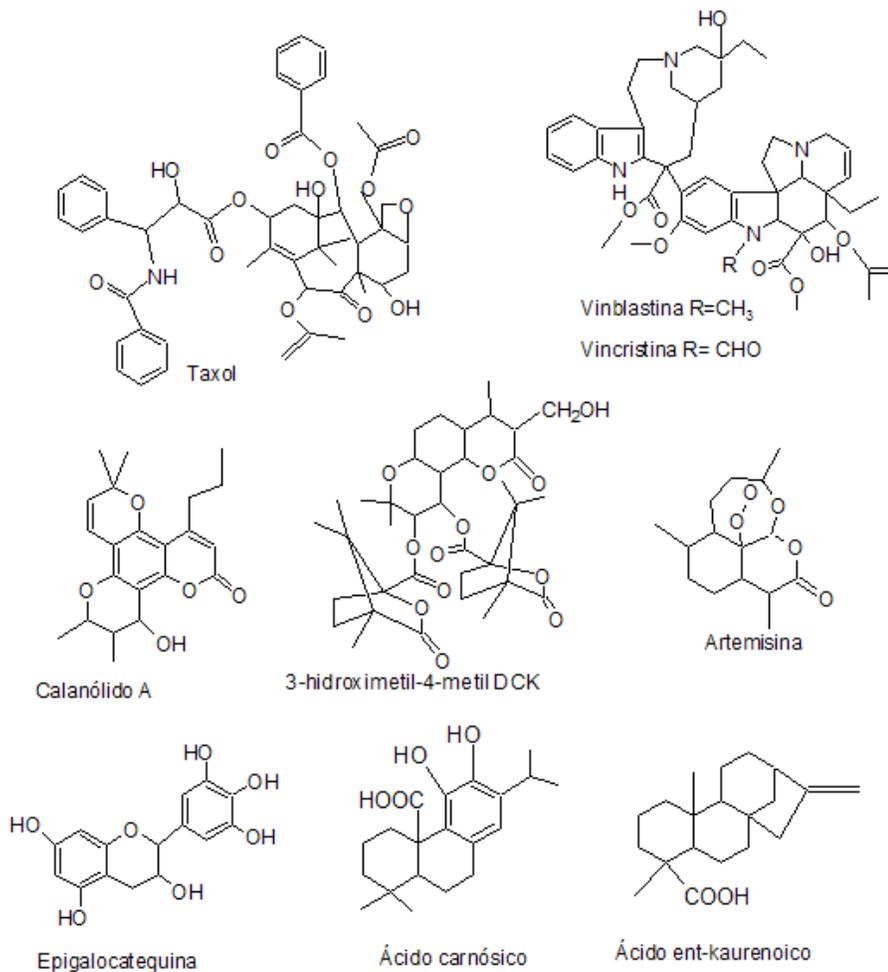


FIGURA 3. ALGUNOS PRODUCTOS NATURALES AISLADOS DE PLANTAS MEDICINALES USADOS COMO FITOFÁRMACOS EN EL MUNDO. NOTESE LA DIFERENCIA ESTRUCTURAL. BASADO EN LAS ESTRUCTURAS DEPOSITADAS EN EL BANCO DE DATOS “PUBCHEM COMPUND”.

lanzarse como drogas comerciales en el tratamiento del VIH (Singh et al., 2005). El cultivo de tejidos ha permitido la síntesis dirigida de calanólidos por medio de callos indiferenciados de *Calophyllum brasiliense* (árbol nativo de Brasil), que generan activamente 309.25 mg kg⁻¹ de calanólido “B” y 117.70 mg kg⁻¹ de calanólido “C”. Se estiman más de un centenar de productos naturales de plantas con actividad anti VIH (Singh et al., 2005). Lamentablemente, los estudios clínicos se ven limitados por la falta de suficiente compuesto activo. Es aquí donde la ingeniería metabólica y el cultivo de tejidos se ven en la necesidad de mejorar sus plataformas para escalar producciones en estas plantas.

Fitofármacos contra la Malaria

Uno de los fitomedicamentos más empleados para contrarrestar la infección por *Plasmodium falciparum* es la *artemisina* (Figura 3), *lactona sesquiterpénica* aislada de *Artemisia spp* y comercializada en baja escala como Koralle® (DaXingAnLing Koralle Bioengineering Co., Ltd). Especies como *Artemisa abisinthium* y *A. ludoviciana* crecen en el territorio de Oaxaca, principalmente en la región de Ocotlán y la Sierra Sur (Servín y Gutiérrez, 1990). Debido a los bajos niveles endógenos de *artemisina* en la planta, novedosas formas de manipulación del compuesto se han llevado a cabo. Dentro de éstas se encuentran la aplicación de elicitores bióticos y abióticos, e inhibidores químicos de enzimas que compiten por los precursores sesquiterpénicos, cuyo resultado ha sido reflejado en incrementos ligeros del compuesto anti-malárico (Abdin et al., 2003). Dado que las vacunas contra la malaria aún requieren de pruebas clínicas, en la actualidad la *artemisina* representa el mejor fitofármaco para combatir la enfermedad. El conocimiento sobre la biosíntesis de terpenoides y de enzimas tipo citocromo P450 oxidasas involucradas en la biosíntesis del sesquiterpeno, han conducido exitosamente a la generación de líneas transgénicas de *Saccharomyces cerevisiae*. Ésta última es la especie de levadura mayormente empleada por su peculiar docilidad en la recepción de DNA recombinante y expresión de proteínas del mismo tipo (Ro et al., 2006). Concentraciones que superan

los 100 mg L⁻¹ del precursor ácido artemisínico son biosintetizadas por estos microorganismos modificados, conduciendo a la generación de materia prima para semi-síntesis química de la artemisina, un paso considerablemente menos costoso que la síntesis total. De 1993 a la fecha, más de 260 productos naturales con actividad anti-malárica han sido preliminarmente caracterizados, algunos con igual o mayor inhibición de *P. falciparum* que la *artemisina* (Batista et al., 2009). A pesar de esta cifra, el problema del escalamiento sigue presente.

Fitofármacos contra la obesidad y la diabetes

Sin duda, el mayor problema de salud pública incidente en todo el mundo lo constituye el control del peso corporal. En México, es un problema alarmante ya que se estima que el 34.5 % de mujeres y el 24. 2% de hombres, ambos mayores de 20 años, padecen obesidad. Para el caso del sobrepeso se estima un 37.4% y un 42.5% en orden respectivo (Córdova-Villalobos, 2009). Independientemente de las medidas preventivas, el problema persiste debido a malos hábitos alimenticios y falta de actividad física, con menor frecuencia a desórdenes hormonales. Para el último punto es imprescindible el tratamiento farmacológico. La sibutramina una droga sintética aprobada por la FDA, y comercializada como Meridia® es comúnmente administrada a personas con un índice de masa corporal mayor a 30 o cuando se conjunta la diabetes y/o dislipidemia (Payer et al., 2004). Efectiva en acción, pero con efectos secundarios como hipertensión arterial, constipación e insomnio, la sibutramina ha sido descontinuada en Europa, en donde controversialmente se han reportado muertes por su administración (<http://www.drsharma.ca/obesity-sibutramine-suspended-in-europe.html>). El Orlistat cuya marca comercial es Xenical®, Redustat®, o Slimella®, es un potente inhibidor de la lipasa pancreática involucrada en el metabolismo de los lípidos. Hasta un 30% de las grasas de la ingesta son evadidas con este medicamento, sin embargo puede presentarse un aumento en el número de defecaciones o urgencia fecal. También puede interferir con la absorción de vitaminas liposolubles, por lo que promueve la desnutrición en cierto grado

(Gomis-Barbará, 2004). Aunque contados, existen otros fármacos sintéticos contra la obesidad, todos sin excepción presentan daños colaterales. En busca de la nueva generación de nutraceuticos, suplementos y agentes farmacéuticos que disminuyan eficientemente la absorción de carbohidratos y grasas en el intestino, la exploración de productos naturales ha sido efectuada. Un estudio reciente y extensivo de 106 especies de plantas pertenecientes a las familias *Brassicaceae*, *Ericaceae* y *Fabaceae*, mostró sorprendentemente que sus extractos tienen una inhibición en la actividad de la lipasa pancreática que va del 40 al 70% (Slanc et al., 2009). Las saponinas (triterpenos glicosilados), polifenoles como la epigalocatequina (Figura 3) diterpenos como el ácido carnósico (Figura 3) son algunos ejemplos de compuestos individuales con una potente actividad inhibitoria de enzimas pancreáticas (Slanc et al., 2009). De este grupo pocas o ninguna aproximación biotecnológica ha sido llevada a cabo para mejorar su producción. Como se aprecia, a la fecha existen pocas alternativas en el tratamiento farmacológico de la obesidad, sobre todo naturales, por lo que es necesaria más investigación en este rubro.

Contrariamente, para el caso de los compuestos antidiabéticos, existe una variedad de plantas y agentes aislados de ellas con potencial uso. Alcaloides flavonoides, terpenos, e incluso péptidos han sido empleados para este fin (Jung et al., 2006). Se estima que en México hay cerca de 170 plantas que se usan empíricamente contra la diabetes (Hernández-Galicia et al., 2002). Dentro estas una ínfima parte ha sido sometida a estudios de tipo biotecnológico. El “zoapatle” (*Montanoa tomentosa*) es una de ellas y ha sido muy valuada por los diterpenos que produce (Villa-Ruano et al., 2009). Uno de ellos, el ácido kaurenoico (Figura 3) es un potente compuesto hipoglicémico más potente que la gibenclamida, una droga administrada en pacientes con diabetes tipo II (Bresciani et al., 2004). Contribuciones a la biosíntesis de éste y otros diterpenos de estructura similar han sido llevadas a cabo, obteniéndose así secuencias codificantes de DNA que generan a las enzimas directamente involucradas en la generación del ácido kaurenoico (Villa-Ruano et al., 2009; Villa-Ruano et al., 2010). Estas contribuciones abren brechas para la producción controlada del compuesto hipoglicémico.

Conclusiones

Las plantas son, han sido, y serán un recurso indispensable en el descubrimiento de nuevos fármacos. Desafortunadamente, la caracterización de un compuesto bioactivo es sólo el principio de un largo camino que conduce a su lanzamiento en el mercado farmacéutico. Las técnicas de DNA recombinante, y de cultivo de tejidos, brindan una alternativa económica, segura, y rápida para la obtención de biofármacos en gran escala, que pueden ser usados en el tratamiento contra enfermedades de alta prevalencia. **1**

Bibliografía

- Abdin MZ, Israr M, Rehman RU, Jain SK.
2003 Artemisinin, a novel antimalarial drug: Biochemical and molecular approaches for enhanced production. *Planta Med* 69: 289-299.
- Ataei-Azimi A, Hashemloian BD, Ebrahimzadeh H, Majid A.
2008 High in vitro production of ant-canceric indole alkaloids from periwinkle (*Catharanthus roseus*) tissue cultura. *Afr J Biotechnol* 7: 2834-2839.
- Batista R, Junior AS, Oliveira AB.
2009 Plant-derived antimalarial agents: New leads and efficient phytomedicines. Part II. Non-alkaloidal natural products. *Molecules* 14: 3037-3072.
- Bhadra R, Vani S, Shanks JV.
1993 Production of indole alkaloids by selected hairy root lines of *Catharanthus roseus*. *Biotech Bioeng* 41: 581-592.
- Bresciani L FV, Yunes RA, Bürguer C, De Oliveira LE, Bof KL, Cechinel-Filho.
2004 Seasonal variation of kaurenoic acid, a hypoglycemic diterpene present in *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (*Asteraceae*). *Z Naturforsch* 59c: 229-232.
- Córdova-Villalobos JA.
2009 Editorial overweight and obesity: public health problems in Mexico. *Cir Ciruj* 77:393-394.
- Croteau R, Kutchan TM, Lewis NM.
2000 Natural Products (Secondary Metabolites). En “*Biochemistry and Molecular Biology of Plants*”, Buchanan B, Gruijssem R, Jones R, (Eds). American Society of Plant Physiologists. EU.

- Donayre Torres AJ, Esquivel Soto E, Gutierrez Xicotencatl ML, Esquivel Guadarrama FR and Gomez Lim MA.
- 2009 Production and purification of immunologically active core protein p24 from HIV-1 fused to ricin toxin B subunit in *E. coli*. *Virology Journal* 6:17.
- Engels B, Dahm P, Jennewein S.
- 2008 Metabolic engineering of taxadiene biosynthesis in yeast as a first step towards taxol (Paclitaxel) production. *Metab Eng.* 10: 201-206.
- Gomis-Barbará R.
- 2004 Tratamiento farmacológico de la obesidad. *Rev Med Univ Navarra* 48: 63-65.
- Hernández-Galicia, Aguilar-Contreras A, Aguilar-Santamaria L, Roman-Ramos R, Chaves-Miranda AA, García-Vega LM, Flores-Saenz JL, Alarcón-aguilar FJ.
- 2002 Studies on hypoglycemic activity of mexican medicinal plants. *Proc West Pharmacol Soc* 45: 118-124.
- Jung M, Park M, Lee HC, Kang Y-H, Kang ES, Kim SK.
- 2006 Antidiabetic agents from medicinal plants. *Curr Med Chem* 13:1203-1218
- Liu D-H, Jin H-B, Chen YH, Cui L-J, Ren W-W, Gong G-F, Tang K-X.
- 2007 Terpenoid indole alkaloids biosynthesis and metabolic engineering in *Catharanthus roseus*. *J Integr Plant Biol* 49: 961-974
- Mei H, Tao S, Yuan-Gang Z, Zhi-Gang AN.
- 2006 Research advances on transgenic plant vaccines. *Acta Gen Sin* 33: 285-293.
- Mohar A., Frías-Mendevíl M, Suchil-Bernal L, Mora-Macías T, De la Garza JG.
- 1997 Epidemiología descriptiva del Cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología de México. *Sal Pub Mex* 39: 1-6.
- Navia-Osorio A, Garden H, Cusidío RM, Palazón J, Alfermann AW, Piñol MA.
- 2002 Taxol® and baccatin III production in suspension cultures of *Taxus baccata* and *Taxus wallichiana* in an airlift bioreactor. *Plant Physiol* 159: 97-102.
- Payer J, Hainer V, Ondrejka P, Kajtor Z.
- 2004 Sibutramin in obesity treatment (multicenter, open, prospective 12-month-long study) *Vnitr Lek* 50: 825-829.
- Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, Fisher KJ, Newman KL, Ndungu JM, Chang MCY, Ham TS, Eachus RA, Ho KA, Shiba Y, Sarpong R, Keasling JD. (2006) Production of the anti-malarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* 440: 940-943
- Servín LC, Gutierrez JV.
- 1990 Plantas medicinales del distrito de Ocotlán Oaxaca. *Anales Inst Biol Univ Nac Autón Mex, Ser Bot* 60: 85-103.
- Simmingsköld G, Norberg B, Norberg A, Söderström UB.
- 1981 Antitubulin activity of vinblastine and vincristine. *Eur J Clin Pharm* 19: 413-416.
- Singh IP, Bharathe SB, Bhutani KK.
- 2005 Anti-HIV natural products. *Curr Sci* 89: 269-290.
- Slanc P, Doljak B, Kreft S, Lunder M, Janes D, Strukelj B.
- 2009 Screening of selected food and medicinal plants extracts from pancreatic lipase inhibition. *Phytother Res* 23: 874-877.
- Villa-Ruano N, Betancourt-Jiménez MG, Lozoya-Gloria E.
- 2009 Biosynthesis of uterotonic diterpenes from *Montanoa tomentosa* (zoapatle). *J Plant Physiol* 166: 1961-1967.
- Villa-Ruano N, Betancourt-Jiménez MG, Lozoya-Gloria E.
- 2010 cDNA isolation and gene expression of kaurene oxidase from *Montanoa tomentosa* (zoapatle). *Rev Lat Quim.* 38: 21-28.
- Wani M, Taylor H, Wall M, Coggon P, McPhail A
- 1971 "Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*". *J Am Chem Soc* 93 (9): 2325-2327.
- Whitman DB.
- 2000 Genetically modified foods: harmful or helpful?. *Discovery Guides*. <http://www.csa.com/discoveryguides/discoveryguides-main.php>.
- Zhang GG, Rodrigues L, Rovinski B, White KA.
- 2002 Production of HIV-1, p24 protein in transgenic tobacco plants. *Mol Biotechnol* 20: 131-136.