

LA BIOLOGÍA SINTÉTICA COMO UN ENFOQUE ALTERNATIVO PARA LA BIOSÍNTESIS DE CANNABINOIDES EN *Pichia pastoris*

SYNTHETIC BIOLOGY AS AN ALTERNATIVE APPROACH TO THE BIOSYNTHESIS OF CANNABINOIDS IN *Pichia pastoris*

Guadalupe Saraí Aguilar-Méndez, Araceli García-Sánchez, Adriana Jaramillo-Palacios y Valeria López Delfín

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

aguilamendegs@gmail.com, arceligarciasanchez25@gmail.com, adryjapa7@gmail.com, neval5386@gmail.com

Resumen

La biosíntesis de cannabinoides ha adquirido importancia en los últimos años, ya que dichos compuestos tienen características farmacológicas relevantes. La expresión de compuestos en sistemas heterólogos suele brindar grandes ventajas como mayor rendimiento, facilidad de purificación y velocidad de obtención de los compuestos. De esta manera, en esta revisión se plantea el mecanismo de expresión de los cannabinoides en la levadura *Pichia pastoris*, que es un modelo sumamente estudiado por su capacidad para actuar como buen sistema heterólogo para sintetizar cannabinoides a partir de la expresión de genes provenientes de *Cannabis* spp.

Palabras clave: *Pichia pastoris*, Cannabinoides, Biosíntesis, Sistema heterólogo

Abstract

Cannabinoid biosynthesis has become an important process in recent years, since these compounds have relevant pharmacological characteristics. The expression of compounds in heterologous systems usually has many advantages, such as more efficient performance, improved purification and enhanced speed to obtain the compounds. Therefore, this review discusses the mechanism of cannabinoid expression in the yeast *Pichia pastoris*, which is a model highly studied for its ability to work as a

useful heterologous system to synthesize cannabinoids from the expression of genes obtained from *Cannabis* spp.

Keywords: *Pichia pastoris*, Cannabinoids, Biosynthesis, Heterologous system

1. Introducción

Desde la antigüedad, diferentes civilizaciones han consumido sustancias provenientes de plantas con fines diversos, principalmente medicinales y recreativos. Tal es el caso de los cannabinoides, cuyos efectos se dieron a conocer en Europa a través de diversos autores, entre los que destaca Moreau, quien describió numerosos fenómenos psicológicos como sentimiento de felicidad, excitación y disociación de ideas, errores de tiempo y espacio, fluctuación de las emociones, mejora de la audición, impulsos irresistibles, delirios y alucinaciones. A principios de 1990, la comunidad científica mostró gran interés por los cannabinoides como sustancias de uso terapéutico, dejando de ser vistos netamente como compuestos de uso recreativo (NASEM, 2017).

Los cannabinoides son producidos principalmente por la planta *Cannabis* spp. Los dos compuestos más estudiados son el CBD (cannabidiol) y el THC (tetrahidrocannabinol); este último estimula diferentes regiones del cerebro, causando euforia, relajación y algunas experiencias sensoriales, por lo que es solicitado por consumidores sociales. Asimismo, estos compuestos poseen gran potencial farmacéutico para el tratamiento de muchos padecimientos. Existen estudios médicos que sustentan la utilidad de estos compuestos para controlar las náuseas y el vómito, estimular el apetito y disminuir el dolor, que son características de interés para pacientes con cáncer o que padecen alguna enfermedad que les provoque algún tipo de dolor crónico. Por estas razones, los cannabinoides han adquirido mayor popularidad, siendo la síntesis y la extracción de estos compuestos temas de gran interés y controversia en la sociedad actual.

Los cannabinoides generalmente se obtienen por dos métodos: la extracción en plantas y la síntesis orgánica en laboratorio. Sin embargo, estos procedimientos suelen ser poco rentables. Las limitantes que presenta la extracción en plantas ocurren debido a los

tiempos prolongados de crecimiento, las estrictas condiciones fisiológicas y las bajas cantidades de cannabinoides producidas.

En el caso de los procedimientos de síntesis química, Zhou *et al.* (2014) mencionan que las limitaciones radican en la complejidad y la hidrofobicidad de estos compuestos, haciéndolos económicamente inviables. Como respuesta a esta problemática, se han propuesto alternativas de producción que optimicen el rendimiento y el costo. Una de las propuestas más novedosas es el uso de microorganismos como fábricas productoras de compuestos de interés a través de la ingeniería genética.

Diversos estudios han propuesto la modificación de *Pichia pastoris*, una levadura sumamente estudiada y caracterizada como modelo biológico para la producción de cannabinoides, a través de la introducción de genes procedentes del género *Cannabis*, confiriéndole a esta levadura la capacidad de realizar funciones propias de las plantas. *Pichia pastoris* ofrece ventajas en cuanto al tiempo de síntesis, la facilidad de cultivo y la reducción de costos tanto del proceso como del producto de estos compuestos.

El objetivo del presente artículo es exponer las investigaciones y los trabajos realizados por diversos científicos para lograr la producción de cannabinoides a través de *Pichia pastoris*, una levadura de gran interés industrial.

2. Desarrollo

2.1. ¿Qué son los cannabinoides y de dónde provienen?

Cannabis sativa indica., también conocida como cáñamo indiano, es una importante especie herbácea originaria de Asia Central, utilizada desde hace más de 8,000 años debido a sus propiedades analgésicas, anestésicas y recreativas, y que ha adquirido importancia en los últimos años en los sectores farmacéutico y de construcción, ya que sus metabolitos muestran potentes bioactividades en la salud humana y sus tejidos del tallo externo e interno se pueden usar para fabricar bioplásticos y material similar al concreto, respectivamente. Su interés comercial e industrial reside principalmente en su capacidad para producir cannabinoides presentes especialmente en las sumidades floridas y la resina de sus tallos (Andre *et al.*, 2016).

Los cannabinoides son compuestos terpeno-fenólicos, producidos a partir de ácidos grasos y precursores de isoprenoides como parte del metabolismo secundario de la *Cannabis*. Los principales cannabinoides producidos por *Cannabis* spp. son Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD) y cannabinol (CBN), seguidos de cannabigerol (CBG), cannabicromeno (CBC) y otros constituyentes menores (Flores-Sánchez y Verpoorte, 2008).

2.2. Nuevo organismo productor de cannabinoides

Un hospedero capaz de producir cannabinoides tiene que cumplir con varias características: la primera y aunque suena ambigua, no debe contar con la función que se le va a dar, es decir, en este caso, la producción de cannabinoides, la cual es una característica que permite la selección y la identificación de aquellos organismos que se han transformado exitosamente; la segunda característica es que debe tener la maquinaria genética y metabólica para poder expresar y producir el compuesto de interés; la tercera es la materia prima que se va a biotransformar; y la cuarta se trata de las condiciones fisicoquímicas en las que estará sometido el hospedero durante la biosíntesis del compuesto de interés.

De manera ideal, se deben buscar organismos de la misma especie, ya que son los más cercanos filogenéticamente y, por ende, más parecidos metabólicamente. No obstante, la extracción de cannabinoides directamente de las plantas productoras es una tarea compleja; por ejemplo, el ácido Δ^9 -THC se obtiene del material vegetal y se extrae en un disolvente acuoso en condiciones de control de pH. El ácido se convierte en una sal y la sal se extrae en un disolvente polar para producir un ácido de alta pureza. Después, el ácido Δ^9 -THC se convierte en Δ^9 -THC, que se purifica más y se combina con un vehículo para uso farmacéutico, con lo cual es evidente la gran cantidad de solventes orgánicos que se requieren y que pueden causar gran impacto ambiental si no se manipulan como es debido. Por otra parte, la cantidad de cannabinoides que se obtienen de una planta completa es muy baja, lo que implica que se necesitan grandes áreas destinadas al cultivo de *Cannabis* para cubrir la demanda, sin mencionar el tiempo que las plantas tardan en desarrollarse, lo cual es poco rentable a largo plazo y eleva aún más el costo de los fármacos producidos con cannabinoides.

Por estas razones, diversos investigadores han propuesto el uso de microorganismos para la producción de compuestos de interés debido a que éstos se reproducen más rápido, requieren un menor espacio de almacenamiento, las condiciones de crecimiento se pueden controlar de manera más efectiva y, sobretodo, son organismos que han permitido el estudio y el desarrollo de técnicas de manipulación genética ya que se pueden transformar más fácilmente en comparación con plantas y animales.

De la planta de *Cannabis* se parte para la búsqueda y la obtención de los genes implicados en la síntesis de los cannabinoides. Puesto que se busca la síntesis rápida y más barata de estos compuestos, la selección de un organismo que se reproduzca rápidamente y con el que se pueda trabajar en biorreactores es una condición fundamental para realizar la manipulación genética que permita insertar los genes de interés en su genoma.

2.3. *Pichia pastoris* como modelo para la expresión de genes

Pichia pastoris es una levadura ascomiceta, de reproducción sexual y metilotrófica, recientemente reclasificada por un estudio filogenético a *Komagataella pastoris*, modelo por excelencia en la biotecnología para la producción de proteínas heterólogas (Kurtzman, 2009), es decir, proteínas producidas por un organismo a partir de la expresión de genes foráneos.

Hasta ahora, los modelos biotecnológicos preferidos para emplear como sistemas heterólogos son *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Saccharomyces cerevisiae* ya que son los únicos microorganismos para los cuales la ingeniería metabólica de sistemas está firmemente establecida (Kelwick *et al.*, 2014); sin embargo, se ha logrado obtener una gran cantidad de conocimiento acerca de *K. pastoris* utilizada como huésped para la producción de proteínas recombinantes. Las características de productividad se han analizado y optimizado exhaustivamente mediante ingeniería genética, logrando establecer a *P. pastoris* como productora de una variedad de compuestos desde terpenoides hasta policétidos, que a menudo exceden la productividad de otros sistemas microbianos (Schwarzshans *et al.*, 2017).

Al ser un organismo eucariota, *K. pastoris*, al igual que las plantas, puede realizar las modificaciones estructurales necesarias para las proteínas después de ensamblarlas para que éstas sean biológicamente activas y funcionen correctamente. Schwarzahns *et al.* (2017) explican que *K. pastoris* tiene la capacidad de expresar proteínas heterólogas, no sólo de origen bacteriano, sino también fúngico, algáceo, vegetal, animal y humano, lo cual la convierte en un modelo ideal para transferir y ajustar vías metabólicas, ya que la incorporación de genes foráneos es muy eficiente y estable, exhibiendo varias ventajas sobre *S. cerevisiae*. Finalmente, otro beneficio es que la levadura cuenta con secuencias nativas de ADN que promueven considerablemente la expresión de genes foráneos, permitiendo la producción de grandes cantidades de proteínas con relativa facilidad en comparación con otros sistemas eucariontes (Daly *et al.*, 2005).

2.4. Tipos de cannabinoides

Radosavljevic *et al.* (2014) mencionan que en la marihuana, nombre común que recibe la planta de *Cannabis*, hay una mezcla compleja de sustancias psicoactivas, de entre las cuales las más importantes y abundantes son Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC), cannabinol (CBN) y cannabidiol (CBD), así que la producción a gran escala se centra en estos compuestos. Sin embargo, se han descrito más de 100 tipos de cannabinoides hasta ahora (Mehmedic *et al.*, 2010). Esta gran diversidad se logra mediante modificaciones enzimáticas como la descarboxilación, la isomerización y la oxidación (Degenhardt *et al.*, 2017). Las concentraciones más altas de cannabinoides se encuentran en las brácteas, flores y hojas de la planta de *Cannabis* (Djurdjenovic-Brenesel *et al.*, 2010). A partir del ácido cannabigerólico (CBGA), compuesto necesario para la protección de la necrosis foliar, surgen las tres rutas metabólicas de los cannabinoides (THCA, CBDA y CBCA) (Havelka, 2019).

El ácido Δ^9 -tetrahidrocannabinólico (THCA) es el precursor del tetrahidrocannabinol (THC), cambio dado cuando la planta se seca debido a un proceso de descarboxilación (Rahn, 2015). El Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) tiene efectos terapéuticos, como la reducción de la espasticidad asociada con la esclerosis múltiple, y funciona como un excelente analgésico. Por otro lado, el ácido cannabidiólico (CBDA) es precursor del cannabidiol (CBD), el segundo componente más abundante después del THCA, no es

toxico, está relacionado con la disminución de la ansiedad y el dolor, y está asociado con la relajación (Jicomes, 2016).

Otros cannabinoides menos conocidos son el ácido Δ 9-tetrahidrocannabivarínico (THCVA), compuesto que, según estudios realizados, se cree actúa de manera antagónica contra los cannabinoides en dosis bajas, pero como agonista en dosis altas con un efecto parecido al del THCA (Seshiata, 2017), y el ácido cannabidivarínico (CBDVA), cuyos estudios médicos indican que no es una sustancia con efectos psicoactivos y que además tiene efectos antiinflamatorios (Edurne, 2016).

2.5. ¿Cuál es la ruta metabólica?

Los precursores de los cannabinoides se originan a partir de dos vías biosintéticas distintas: la vía policétida, que da lugar al ácido olivolólico (OLA), y la vía plastídica 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP), que conduce a la síntesis de geranilo difosfato (GPP) (Sirikantaramas *et al.*, 2007). La vía biosintética de los cannabinoides en *Cannabis sativa* consiste en que los precursores geranil difosfato (GPP) y el ácido olivólico (OA) se convierten en el intermediario central de la vía cannabinoide que es el ácido cannabigerólico (CBGA). Posteriormente, el CBGA se convierte adicionalmente por dos oxidorreductasas diferentes en ácido tetrahidrocannabinólico sintasa (THCAS) y ácido cannabidiólico sintasa (CBDAS) en las formas ácidas de THC y CBD que se acumulan en los tricomas glandulares (Zirpel *et al.*, 2017).

2.6. Enzimas importantes

La expresión de cualquier gen extraño en *P. pastoris* requiere tres pasos básicos: **(1)** la inserción del gen en un vector de expresión, **(2)** la introducción del vector de expresión en el genoma de *P. pastoris* y **(3)** la selección de posibles cepas que sean capaces de expresar el producto génico extraño.

El sistema de expresión de *P. pastoris* ha sido ampliamente revisado a lo largo de los años (Cereghino y Cregg, 2000; Daly, Milton y Hearn, 2005; Gasser *et al.*, 2013; Jin *et al.*, 2006; Macauley-Patrick *et al.*, 2005). Los autores concuerdan en que es necesario elegir las estrategias de clonación y la expresión de proteínas heterólogas, la elección

de combinaciones de promotor-terminador, los marcadores de selección adecuados y la aplicación de sistemas de vectores para la expresión intracelular o secretada, incluyendo la selección de señales de secreción adecuadas.

Futoshi *et al.* (2007) explican que para lograr la biosíntesis del ácido tetrahidrocannabinólico (THCA) en *Picchia pastoris* se requiere de la enzima THCA sintasa, que cataliza la ciclación oxidativa estereoespecífica del ácido cannabigerólico (CBGA) en el THCA. Sabemos que las proteínas se sintetizan a partir de la expresión de algunos genes, pero clonar o introducir el gen que codifica dicha enzima no es suficiente ya que durante el proceso de transcripción y traducción el ARNm sufre modificaciones antes de llegar al ribosoma donde se ensamblan los aminoácidos de las proteínas. Estas modificaciones son necesarias para que la proteína se sintetice completamente y sea funcional. Como se mencionó anteriormente, estas modificaciones ocurren incluso cuando la proteína ya está armada con el fin de activarla, proceso que se conoce como modificaciones postraduccionales. Como estrategia, Futoshi *et al.* (2007) plantean copiar el ADNc que codifica la enzima antes mencionada. El ADNc o ADN complementario es la copia del ARNm, que se sintetiza en laboratorio con una enzima transcriptasa inversa. El ARNm es la molécula leída por el ribosoma para que éste arme la proteína a partir del ensamblaje de aminoácidos.

2.7. ¿Cómo se insertan los genes en la levadura?

Para lograr una buena producción de cannabinoides a nivel industrial, se debe trabajar con aquellas levaduras que sean buenas productoras a través de una selección previa de aquéllas que han sido transformadas exitosamente, es decir, aquéllas que lograron integrar el gen o genes de interés a su genoma.

El método más popular de transformación genética en levaduras es el uso de vectores de transformación, vehículo que es una secuencia de ADN en la cual se inserta la secuencia del gen de interés junto con secuencias promotoras para garantizar su expresión y adicionalmente se inserta un marcador de selección, que permite identificar aquellas levaduras transformadas de manera visible. Existen muchos marcadores de selección, pero los más usados para levaduras son aquellos genes que codifican las síntesis de un compuesto necesario para la supervivencia del organismo, por ejemplo,

algún aminoácido esencial. La levadura originalmente no cuenta con el gen que le permite sintetizar dicho compuesto, por lo tanto, este organismo se debe cultivar en un medio que le proporcione el compuesto esencial en cantidades adecuadas. Cuando el vector a introducir cuenta con ese gen, la levadura será capaz de producir ese aminoácido, es decir, que se le está confiriendo la capacidad de producirlo; por lo tanto, ya no necesitará que el aminoácido o compuesto esencial se le proporcione en el medio de cultivo. La selección de aquellas levaduras transformadas se hace sembrando las levaduras en un medio de cultivo sin el aminoácido esencial y, aquéllas que logren crecer en dicho medio, serán las levaduras que se hayan transformado exitosamente.

2.8. Métodos de producción industrial de levaduras

El proceso tecnológico más utilizado en los últimos años para la obtención de microorganismos o compuestos producidos por microorganismos es el cultivo en fermentadores. Este tipo de tecnología es más eficiente y óptima económicamente para obtener mejores rendimientos de productos deseados. El cultivo consta de un recipiente denominado “fermentador”, donde se lleva a cabo un proceso químico que involucra organismos o sustancias bioquímicamente activas provenientes de dichos organismos. Este proceso puede ser dependiente de oxígeno o no dependiente de oxígeno.

Para llevar a cabo una producción en un fermentador, es necesario proporcionar dentro de éste al microorganismo de las condiciones necesarias para subsistir, reproducirse y producir el compuesto de interés. Naturalmente, cada microorganismo requerirá de condiciones diferentes. En el caso de las levaduras, Suárez-Machin menciona que se deben tomar en cuenta condiciones como la presión osmótica, la temperatura, el tipo y la potencia de agitación de las aspás que están dentro de los fermentadores, el nivel de aireación, la cantidad y la calidad de nutrientes agregados al medio, la consistencia y la viscosidad del medio, y el pH.

Alireza Rahimi, en un artículo donde utilizó *P. pastoris*, reportó que en operación continua la fermentación de ésta ocurrió a 29 °C, con un pH de 4.8° en metanol como sustrato limitante, usando una tasa de dilución de 0.015 1/h y una cascada de oxígeno disuelto de 20 a 30%. Aunque estas condiciones pueden variar ligeramente según el compuesto que se desee obtener, se sabe que en las levaduras las temperaturas altas ocasionan

una disminución de la biomasa como resultado de una disminución en el contenido de proteínas, ARN; ADN y aminoácidos libres; por otro lado, las temperaturas muy bajas provocan un estado de latencia en la célula, deteniendo su desarrollo.

En el caso del pH, el grado óptimo regularmente está entre 4 y 5. Las levaduras tienen la ventaja de soportar medios más ácidos que otros microorganismos, lo que es aprovechado en los procesos industriales para mantener el medio controlado de bacterias que puedan competir por el sustrato.

2.9. Discusión de ventajas y desventajas

Como se mencionó con anterioridad, la síntesis de cannabinoides suele ser costosa, tardada y agresiva con el medio ambiente, así que la producción de estos compuestos a través de sistemas heterólogos, como en el caso de *P. pastoris*, es una opción mucho más viable en muchos sentidos, incluso en el ámbito económico, además de que se pueden producir más compuestos con ayuda de bioprocesos en comparación con la planta que los produce de manera natural.

Por otro lado, el costo de los medicamentos producidos con cannabinoides obtenidos a partir de *P. pastoris* disminuiría mucho ya que su proceso de producción no implicaría demasiados gastos, lo que ayudaría a una gran cantidad de pacientes a aliviar sus padecimientos y que tal vez no contarían con las posibilidades económicas para solventar tratamientos que contengan estos compuestos.

Una de las principales ventajas de utilizar *P. pastoris* como huésped de producción de proteínas es su capacidad para secretar proteínas recombinantes activas, plegadas, procesadas y traducidas adecuadamente en los medios de cultivo (Cregg and Russell, 1998).

Desafortunadamente, la ingesta de compuestos como los cannabinoides, incluso con fines terapéuticos, no es una práctica totalmente aceptada por la sociedad en general, así que la producción en masa de estos medicamentos podría ser afectada debido a las ideas erróneas y a la falta de información disponible entre la sociedad.

La modificación genética en sistemas heterólogos para la síntesis de cualquier compuesto no siempre es exitosa al primer intento, aunque los parámetros sean correctos y las pruebas se hayan hecho con anterioridad, sin mencionar que si el procedimiento no se hace adecuadamente, los posibles resultados negativos no se notan sino hasta el final de los experimentos y protocolos, lo que podría causar pérdidas de material y de tiempo. Sin embargo, con práctica y metodologías adecuadas, la posibilidad de obtener resultados exitosos aumenta considerablemente.

3. Conclusión

El descubrimiento y la caracterización de todas las enzimas esenciales involucradas en la biosíntesis de los principales cannabinoides $\Delta 9$ -THC y CBD permiten la producción de estos compuestos por medio de organismos hospedadores heterólogos. El uso de la biología sintética para la biosíntesis microbiana de los cannabinoides puede revolucionar la producción de medicamentos con estos compuestos. Esto puede generar un enorme impacto en la disponibilidad de los medicamentos cannabinoides que pueden ser probados en ensayos clínicos para evaluar su eficacia terapéutica. Además, la producción microbiana podría apoyar en el diseño de nuevos cannabinoides con propiedades mejoradas mediante la incorporación de enzimas de adaptación. En conjunto, estas estrategias podrían aumentar el valor potencial de los cannabinoides como medicamentos farmacéuticos.

Conflicto de interés

Los autores declaran que la investigación se realizó en ausencia de relaciones comerciales que pudieran ocasionar algún tipo de conflicto de interés.

Referencias

Andre, C. M.; Hausman, J. F. y Guerriero, G. (2016). *Cannabis sativa*: The Plant of the Thousand and One Molecules. *Frontiers in Plant Science*, 7, 19. DOI: 10.3389/fpls.2016.00019.

Cereghino, J. L. y Cregg, M. J. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 1, 45-66. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x>.

Daly, R.; Milton T. y Hearn, W. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J. Mol. Recognit.*, 18: 119-138. DOI: 10.1002/jmr.687.

Degenhardt, F.; Stehle, F. y Kayser O. (2017). The Biosynthesis of Cannabinoids. Cannabis and Related Pathologies. pp 13-23. United Kingdom. VR Preedy. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-18721-1>.

Futoshi Taura, Emi Dono, Supaart Sirikantaramas, Kohji Yoshimura, Yukihiro Shoyama y Satoshi, Morimoto. (2007). Production of Δ^1 -tetrahydrocannabinolic acid by the biosynthetic enzyme secreted from transgenic *Pichia pastoris*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 361, (3), pp. 675-680. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.07.079>.

Hall, W. (2018). Uso médico del cannabis y de los cannabinoides. Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías. Luxemburgo. p. 9. Recuperado de: http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/10171/20185584_TD0618186ESN_PDF.pdf.

Havelka, J. (2019). What is CBGA (Cannabigerolic Acid) and what does this cannabinoid do? Leafly. Recuperado de: <https://www.leafly.com/news/science-tech/what-is-cbga-cannabigerolic-acid-marijuana-cannabinoid>.

Jicomes, N. (2016). CBD (cannabidiol): what does it do and how does it affect the brain and body? Leafly. Recuperado de: <https://www.leafly.com/news/science-tech/what-does-cbd-do>.

Joan Lin, James Cereghino y M. Cregg. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 24, No. 1, Enero del 2000, pp. 45-66.

J., Zhou; Du, G. y Chen, J. (2001). Novel fermentation processes for manufacturing plant natural products. *Curr Opin Biotechnol*, 25, pp. 17-23.

Kelwick, R.; T-MacDonald, J.; Webb, A. y Freemont, P. (2014). Developing the tools and methodologies of synthetic biology. *Bioeng. Biotechnol.* <https://doi.org/10.3389/fbioe.2014.00060>.

Kumar, N. V.; Rangarajan, P. N. (2012). The zinc finger proteins Mxr1p and repressor of phosphoenolpyruvate carboxykinase (ROP) have the same DNA binding specificity but regulate methanol metabolism antagonistically in *Pichia pastoris*. *J. Biol. Chem.*, 2012, 287: 34465-34473.

Radosavljevic, N.; Markovic, J.; Snezana, A. y Slavica, R. (2014). Metals and organic compounds in the biosynthesis of cannabinoids: a chemometric approach to the analysis of *Cannabis sativa* samples. *Natural Products Research*, 28, pp. 511-516.

Rahn, B. (2015). What is THCA and what are the benefits of this cannabinoid? Leafly. Recuperado de: <https://www.leafly.com/news/cannabis-101/what-is-thca-and-what-are-the-benefits-of-this-cannabinoid>.

Schwarzans, P.; Lutterman, T.; Geier, M.; Kalinowski, J. y Friehs K. (2017). Towards systems metabolic engineering in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Advances*, Vol. 35 (6), pp. 681-710. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.07.009>.

Seshiata. (2017). Ciencia de los cannabinoides 101: ¿Qué es la THCV? Sensi seeds. Recuperado de: <https://sensiseeds.com/es/blog/ciencia-de-los-cannabinoides-101-que-es-la-thcv/>.

Suero, C. (2015). Efecto neuroprotector de los cannabinoides en las enfermedades neurodegenerativas. *Ars. Pharmaceutica*. Sevilla. p. 78. Recuperado de: <http://scielo.isciii.es/pdf/ars/v56n2/revision2.pdf>.

Viader, J. (2011). Biotecnología de proteínas recombinantes con *Pichia pastoris*. XIV congreso nacional de biotecnología y bioingeniería. México. p. 1. Recuperado de: https://smbb.mx/congresos%20smbb/queretaro11/TRABAJOS/simposios/SimposioV_Viader.pdf.

Yan, Liu; Shu-Xi, Jing; Shi-Hong, Luo y Sheng-Hong, Li. (2018). Non-volatile natural products in plant glandular trichomes: chemistry, biological activities and biosynthesis. *Natural Product Reports*, 36, (4), pp. 626-665. DOI: 10.1039/C8NP00077H.

Zirpel, B.; Degenhardt, F.; Martin, C. y Kayser O. (2017). Engineering yeast as platform organisms for cannabinoid biosynthesis. *Journal of Biotech.*, 259, pp. 204-212. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.07.008>