

Drogas verdes y Terapia fotodinámica: Una alianza prometedora en la lucha contra el cáncer.

Emiliano Foresto¹, Marina Placci Arditi², Ingrid Sol Cogno³ y Luis Exequiel Ibarra⁴

Resumen

La terapia fotodinámica (TFD) es un enfoque terapéutico prometedor en la lucha contra el cáncer. Esta terapia utiliza drogas fotosensibilizadoras, luz y oxígeno para generar especies reactivas del oxígeno (ROS), las cuales son extremadamente tóxicas para las células tumorales. El uso de plantas representa una alternativa alentadora para poder obtener nuevos compuestos terapéuticos denominados *fármacos verdes* que en la TFD son llamados fotosensibilizadores ya que es necesario que se activen en presencia de luz para generar las ROS y producir la muerte de las células tumorales, y por lo tanto esta representa una de las principales ventajas debido a la menor toxicidad en comparación con compuestos sintéticos que son de uso habitual. La búsqueda de nuevos y prometedores fotosensibilizadores obtenidos de plantas para su aplicación en la TFD animan a los investigadores a trabajar junto con botánicos quienes podrán identificar de mejor manera las plantas y sus familias que puedan contener estos compuestos fotoactivos. Además, las nuevas técnicas de reproducción basadas en biotecnología, como los métodos específicos de edición del genoma, brindarán oportunidades importantes para producir productos naturales en plantas, principalmente cuando se asocian con los recientes avances en la capacidad de ampliación y el diseño de biorreactores.

Introducción

El cáncer es una de las enfermedades más mortales reportada tanto en países desarrollados como en aquellos en desarrollo. Los tratamientos más convencionales consisten en la aplicación de cirugía, quimioterapia y/o radioterapia. La terapia fotodinámica (TFD) es un enfoque diferente a los métodos convencionales que ha recibido aprobación para el tratamiento de varios tipos de tumores y el cual parece ser una luz de esperanza para erradicar diferentes tipos de cánceres. La TFD requiere la administración de fotosensibilizadores (FS) y su posterior fotoactivación utilizando una fuente de luz con longitud de onda específica que puede ser administrada por fibra óptica y por lo último la presencia de oxígeno es fundamental para la generación de ROS. Estos ROS ejercen un

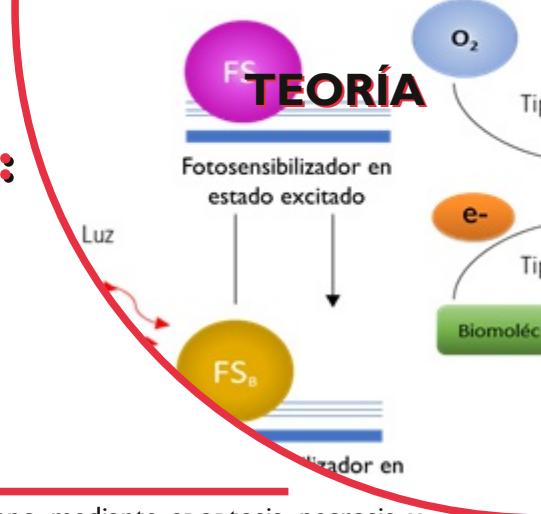
efecto anticancerígeno mediante apoptosis, necrosis y autofagia de las células cancerosas (Muniyandi et al., 2020).

Recientemente, se han identificado varios compuestos naturales que exhiben potenciales fotosensibilizantes. Se ha reportado que las sustancias fotoactivas derivadas de plantas medicinales son seguras en comparación con los compuestos sintéticos. El concepto se remonta a miles de años atrás, cuando la medicina herbal combinada con la luz solar se usaba en todas las tierras de Egipto, India y China. Sin embargo, no se prestó mucha atención a la TFD hasta principios del siglo XX. A inicios de la década de 1900, la TFD se descubrió inesperadamente cuando Oscar Raab desencadenó con éxito la muerte de algunas especies de protozoos ciliados (*Paramecium*) al exponerlo a un FS en presencia de luz visible. Luego, recién en 1972, Diamond et al. publicó el primer estudio médico sobre la TFD para el cáncer e introdujo la hematoporfirina como un potente agente para la destrucción selectiva de células de glioma y tumores mediada por luz (Rkein y Ozog, 2014).

El auge en el uso de productos naturales como drogas verdes se vinculó a la existencia y evolución de metodologías químicas para extraer compuestos activos de plantas, lo que ha permitido el descubrimiento de nuevos metabolitos para ser utilizados como potenciales fármacos y quimioterapias. Además, los principios activos obtenidos de la naturaleza también han servido de base para muchos medicamentos semisintéticos aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos de los EE.UU (FDA) y otras agencias reguladoras nacionales. Se estima que el 25% de los fármacos de uso común contienen compuestos aislados de plantas, cifra que aumenta si se incluyen fármacos modificados a partir de prototipos naturales. Además, se estima que existen entre 300.000 y 500.000 especies de plantas en todo el mundo y solo el 15% de estas han sido estudiadas por el campo de la fitoquímica y el 6% por la farmacología y, por tanto, es plausible creer que muchos fármacos derivados de plantas todavía faltan por descubrirse, incluidos los destinados al tratamiento de enfermedades tumorales.

En un enfoque ecológico y que viene de la mano del creciente desarrollo de la biotecnología tiene que ver con la posibilidad de producir en el laboratorio los

¹ Emiliano Foresto: Ingeniero Agrónomo. Profesor Auxiliar en el área de Botánica FAV-UNRC. Becario Doctoral en INBIAS-CONICET. eforesto@ayv.unrc.edu.ar. ² Marina Placci Arditi: Microbióloga. Becaria en el Laboratorio de Biología Tumoral y Terapia Fotoasistida. ³ Ingrid Sol Cogno: Microbióloga y Dra. en Ciencia Biológicas. Profesor Auxiliar en el área de Química Biológica en la FCEFQyN-UNRC. Investigadora Asistente en INBIAS-CONICET. scogno@exa.unrc.edu.ar. ⁴ Luis Exequiel Ibarra: Médico Veterinario y Dr. en Ciencia, Tecnología e Innovación Agropecuaria. Profesor Auxiliar en el área de Fisiología Animal en la FCEFQyN-UNRC. Investigador Asistente en INBIAS-CONICET. libarra@exa.unrc.edu.ar.



metabolitos de plantas a gran escala como una alternativa a la recolección de plantas de forma masiva para obtener sus metabolitos secundarios fotoactivables. Este hecho ha despertado gran interés en los investigadores como una alianza prometedora en la lucha contra el cáncer (Foresto et al., 2021).

Fitomedicina y el uso de plantas medicinales

La mayoría de los seres humanos comprenden y entienden que las plantas son una parte integral de nuestras vidas y lo han sido desde tiempos inmemoriales, debido a su omnipresencia. Estas han sido el pilar no solo para la supervivencia de la humanidad, sino para toda la vida en este planeta. Su papel no puede ser subestimado ya que han servido a la humanidad desde su nacimiento, proporcionando alimento, refugio, un ambiente saludable, hermoso y agradable, y agregando colores a nuestras vidas. Las plantas también han sido la principal fuente de socorro para las enfermedades humanas que afligen al hombre de una u otra forma desde el comienzo de su existencia. El número de especies de plantas que existen en la tierra solo se puede estimar. Una estimación sitúa el número en 400.000 especies de plantas, aunque la lista mundial de plantas contiene más de un millón de nombres en 642 familias de plantas, muchas de las cuales se consideran sinónimos (Akbar, 2020).

La fitomedicina es una práctica que aporta los conocimientos ancestrales de la fitoterapia, los usos de las plantas medicinales y el conocimiento científico que justifica estos usos. Con el tiempo, la curación y mitigación de enfermedades en personas con el uso de plantas medicinales ha sido su principal aliado terapéutico. Las plantas medicinales son un importante patrimonio de la humanidad y, además, son renovables, no contaminantes y de producción económica o asequible. Una fracción sustancial de la población mundial sigue utilizando productos naturales, especialmente extractos de plantas medicinales, para ayudar a controlar enfermedades. Sin embargo, en muchos casos, el conocimiento sobre la preparación y el uso adecuados de estos materiales está

desapareciendo y los mismos recursos se están agotando. Además, muchas de las plantas exóticas ya no están disponibles; y por ello es imperativo caracterizar los principios activos y el conocimiento de cómo utilizarlos. Cuando los ingredientes activos se han identificado químicamente, se pueden aislar o sintetizar de forma económica y convertirlos en preparaciones farmacéuticas; y también, pueden modificarse químicamente para producir análogos más potentes. En estos enfoques creados por el hombre, las herramientas biotecnológicas pueden ayudar a producir los compuestos aislados en un proceso un poco más respetuoso con el medio ambiente (Foresto et al., 2021).

Terapia fotodinámica: un arma láser contra el cáncer.

La TFD es una modalidad terapéutica relativamente nueva utilizada para el tratamiento de varios tipos de enfermedades neoplásicas y no neoplásicas, que consiste en la combinación de una fuente de luz que estimula un agente fotosensibilizante (o fotosensibilizador) en un ambiente rico en oxígeno. Un FS es un agente capaz de absorber la energía lumínica e inducir reacciones en otras moléculas no absorbentes por medio de la transferencia de energía. Cuando un FS es irradiado con luz visible de una longitud de onda adecuada, este absorbe la energía y pasa a un estado excitado permitiéndole posteriormente transferir energía o electrones a diferentes moléculas para volver a su estado basal. Si se produce una transferencia energética, ocurre lo que se llama una Reacción Redox de Tipo II, en donde si el aceptor es una molécula de oxígeno se formará oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$). En cambio, si ocurren reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno o de electrones hacia el oxígeno o con diferentes sustratos presentes en los tejidos y células (tales como proteínas, lípidos e hidratos de carbono) se producirán radicales libres y otras ROS tales como los iones superóxido (O_2^-). Estas corresponden a Reacciones Redox de Tipo I (Figura 1). Estos mecanismos ocurren de manera simultánea; su proporción dependerá del tipo de FS y de la concentración del sustrato y oxígeno. Las ROS,

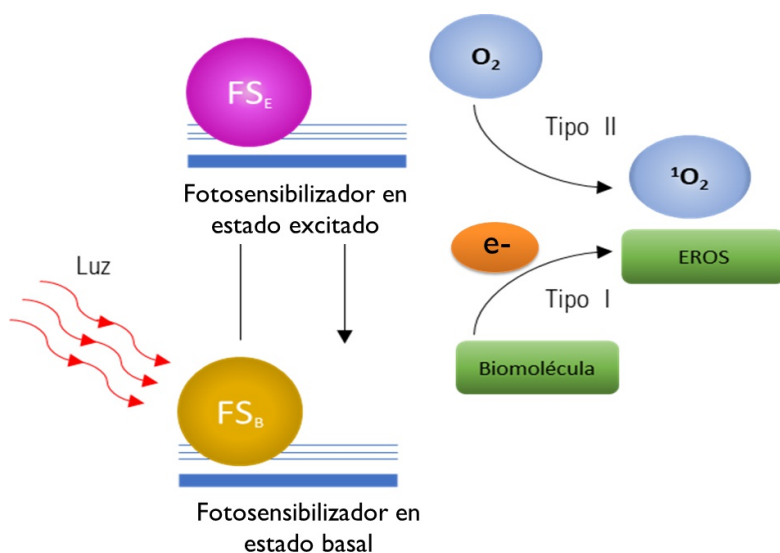


Figura 1: Reacciones Redox de Tipo I y de Tipo II en la TFD. Diagrama de Jablonski adaptado mostrando el mecanismo de acción de la TFD. Luego de la absorción de luz, el FS pasa de su estado basal (FS_B) a un estado excitado (FS_E), el cual puede reaccionar de dos maneras: mediante transferencia de energía a moléculas de oxígeno formando oxígeno singlete (Reacciones Redox Tipo II); o mediante la interacción con biomoléculas transfiriendo electrones a formando radicales que interaccionan con el oxígeno para formar ROS (Reacciones Redox de Tipo I).

formadas ante las diferentes reacciones fotoquímicas, serán posteriormente las responsables del daño celular que llevará a la muerte de las células tratadas con TFD. Esto es, en condiciones oxigenadas, producido principalmente por el $^1\text{O}_2$ ya que es extremadamente tóxico y presenta un mayor tiempo de vida media en comparación a las demás ROS; en cambio, en condiciones hipóxicas ocurrirán mayormente las reacciones de Tipo I. El tratamiento del cáncer mediante TFD consiste en la administración del FS por vía intravenosa o tópica (según la ubicación del tumor) y transcurrido un determinado tiempo se procede a la irradiación de la zona a tratar. Si bien los FS son absorbidos tanto por las células tumorales como por las células normales del tejido adyacente, estos se concentran principalmente en las células tumorales porque poseen una mayor capacidad de absorción y una menor velocidad de eliminación. Además, luego de la irradiación localizada, se produce la muerte de las células tumorales de manera selectiva, sin afectar al tejido adyacente. Esto es una característica muy importante de la terapia, ya que le otorga grandes ventajas a la TFD sobre las demás terapias: presentar selectividad y una baja toxicidad sistémica. Otras ventajas de la acción terapéutica de la TFD sobre los tratamientos convencionales incluyen: ser una técnica mínimamente invasiva, relativamente libre de dolor y de bajo riesgo; presentar la capacidad de preservar la integridad anatómica y funcional de muchas células debido a la ausencia de efectos mutagénicos; presentar la posibilidad de ser aplicada sola o en combinación con otros tratamientos anticancerígenos incluidos la quimioterapia, radioterapia, cirugía e inmunoterapia; y presentar mínimos efectos secundarios en el paciente.

El proceso de implementación de la TFD ante un caso de cáncer es posible gracias al desarrollo de tecnologías láser, LED, y fibras ópticas que posibilitan la irradiación de la zona afectada a través de dispositivos lumínicos desarrollados a partir de estas tecnologías. Dicho proceso conlleva una serie de pasos tal y como se muestran en la Figura 2: primero el FS es inyectado al paciente con cáncer; en este caso un carcinoma colorectal (CCR). Generalmente se utiliza la aplicación por vía endovenosa lo que le permite al FS diseminarse por todo el cuerpo hasta llegar al tumor; pero también

recientes estudios sugieren la aplicación directa del FS sobre las regiones afectadas mediante colonoscopia. Transcurrido un determinado tiempo, cuando el FS se encuentra particularmente acumulado en el tejido neoplásico, se procede a la irradiación de la zona afectada con la longitud de onda adecuada mediante una fibra óptica posicionada a través de un colonoscopio. De esta manera el FS activado genera las ROS que causan daño tisular llevando a la muerte de las células tumorales.

¿Qué estrategias biotecnológicas podemos usar para producir FS naturales para su uso en TFD?

La demanda biotecnológica de productos naturales ha crecido constantemente debido a su importante valor y nuevas aplicaciones, principalmente como productos farmacéuticos. Las células vegetales y los cultivos de órganos representan una fuente para la producción fácil y accesible de metabolitos secundarios de interés, especialmente cuando las plantas son silvestres, requieren largos períodos de cultivo, tienen bajos rendimientos de metabolitos secundarios o no se someten a procesos de síntesis química (Rischer et al., 2013).

En la actualidad, existen varios sistemas de cultivo de plantas *in vitro* (Figura 3), que incluyen cultivos de callos, cultivos en suspensión celular y cultivos de raíces. Con estas técnicas de cultivo, es posible obtener plantas en un medio nutritivo libre de microbios y en condiciones ambientales controladas (Frugis, 2019).

Los cultivos de callos son el cultivo de células vegetales morfológicamente indiferenciadas, casi cualquier parte de la planta se puede utilizar para generarlos. Los explantos tomados de tejidos vegetales se cultivan en un medio de gel sólido suplementado con hormonas de crecimiento (es decir, auxina, citoquinina) y crecen lentamente *in vitro* en una masa celular amorfa. Al pasar las células con regularidad, los cultivos de callos se pueden mantener indefinidamente *in vitro*. Después de la formación exitosa de un callo, se pueden realizar cultivos en suspensión celular; básicamente agregando estas células a un medio líquido.

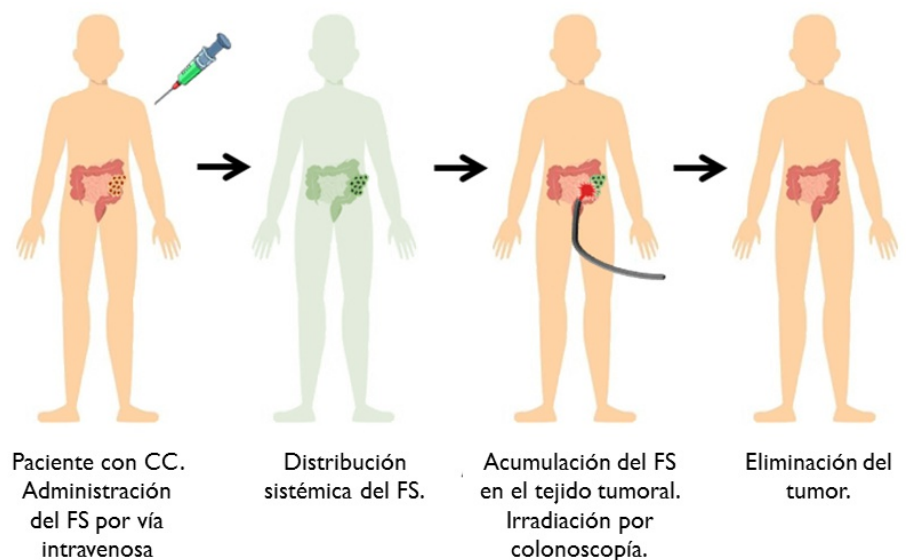


Figura 2: Tratamiento del CCR con TFD. Representación esquemática del modelo de tratamiento con TFD a un paciente con CCR. El FS es suministrado a un paciente con CCR por vía intravenosa llevando a su distribución sistémica. Luego el FS se acumula selectivamente en el tejido tumoral. Transcurrido cierto tiempo se procede a la irradiación del tumor mediante colonoscopia. Finalmente se consigue la eliminación del tumor.

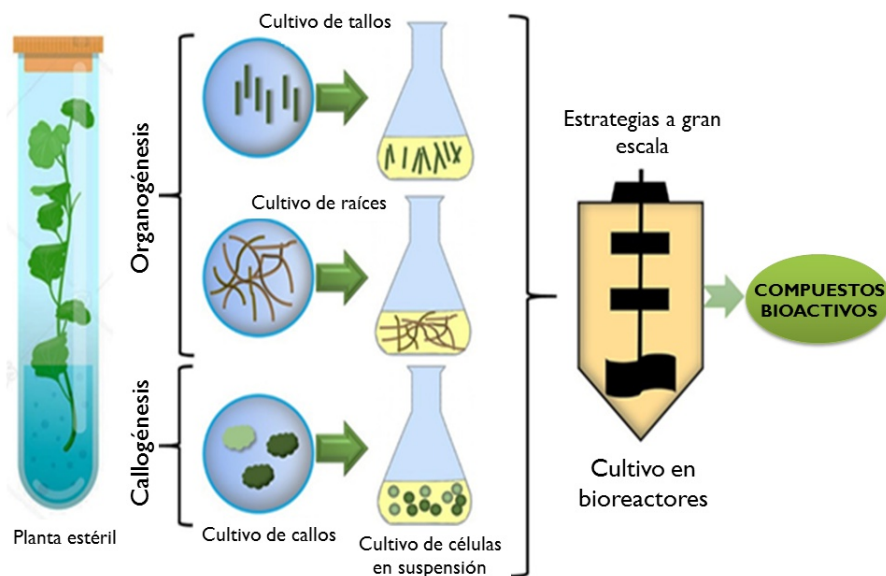


Figura. 3. Métodos utilizados para la producción a gran escala de compuestos bioactivos utilizando cultivos de tejidos in vitro de plantas. Fuente: modificado a partir de Foresto et al. (2021).

Los cultivos resultantes suelen tener una capacidad de multiplicación significativa para su crecimiento dentro de biorreactores de importancia industrial, diseñados para maximizar los niveles de metabolitos secundarios de interés (Bhatia, 2015).

Los cultivos de órganos vegetales son el cultivo de células diferenciadas en tejidos organizados como raíces o brotes (Figura 3). Los cultivos de raíces se obtienen después de la infección del material vegetal con la bacteria del suelo, gramnegativa *Agrobacterium rhizogenes*. Durante este proceso, *A. rhizogenes* transfiere una sección de ADN de su plásmido, el T-ADN, al genoma de las células de la planta huésped. El T-DNA lleva un conjunto de genes que codifican las enzimas responsables de modular la acumulación de auxinas y citoquininas. El nuevo equilibrio hormonal, en el lugar de la infección, activa mitóticamente las células circundantes fomentando la formación de raíces en proliferación (Otten et al., 2008). Los cultivos de raíces son relativamente fáciles de mantener y genéticamente estables. Además, este tipo de cultivo se utiliza para la producción a escala industrial de productos farmacéuticos, sin embargo, es necesario desarrollar plataformas de producción de biorreactores adecuadas.

Además de los cultivos de raíces, es posible cultivar otras partes de la planta (tallos) para la producción de metabolitos secundarios (Figura 3). Los cultivos de tallos pueden ser transgénicos, si se obtienen después de la infección de la planta con *Agrobacterium tumefaciens*, son llamados teratomas de tallos, o no transgénicos mediante el simple uso de un equilibrio hormonal correcto. Los tallos exhiben algunas propiedades similares a las raíces, específicamente estabilidad genética y buenas capacidades para la producción de metabolitos secundarios. Sin embargo, existen algunas variaciones en el patrón metabólico, ya que algunas síntesis se localizan con precisión en raíces o en los tallos. Otras diferencias se encuentran en su tasa de crecimiento que es algo más lenta, ya que el tiempo de duplicación más rápido que se ha informado es de aproximadamente 3 días, y también el requisito de exponer los cultivos de tallos a la luz, lo que puede

ser un problema con los grandes reactores de tanque hechos de acero (Foresto et al., 2021).

Se han explorado varios sistemas de cultivo *in vitro* en plantas productoras de FS. Específicamente, en *Hypericum perforatum* para la producción de Hyp. En general, se observó que los cultivos celulares desorganizados (callos y cultivos en suspensión celular) presentaron menor acumulación de Hys en comparación con estructuras organizadas como tallos y raíces. Se han establecido cultivos de raíces en biorreactores de manera exitosa para la producción de Hyp a gran escala (Cui et al., 2010). En los últimos años, parámetros como la luz y la temperatura, que controlan la biomasa y la producción de Hyp, han sido estudiados principalmente en cultivos de raíces adventicias. La luz y la temperatura son inductores abióticos que pueden desencadenar la producción de metabolitos secundarios de las plantas (Naik y Al-Khayri, 2016). Sobhani Najafabadi y colaboradores (2019) observaron que la producción de biomasa fue significativamente mayor en los cultivos cultivados bajo luz oscura y roja, pero en términos de producción de Hyp, la luz roja fue la mejor. Recientemente, Tavakoli y colaboradores indicaron el hecho de que la biosíntesis de Hyp se ve notablemente afectada por el tiempo de exposición a UVB y la baja temperatura en el cultivo de raíces adventicias de *H. perforatum*. El contenido más alto de Hyp se observó después de 60 min de UVB seguido de la recuperación y una temperatura de 4 ° C durante 72 horas. En otro estudio, Karakaş et al. 2015 determinaron el contenido de Hyp en callos y cultivos en suspensión celular en otra especie de *Hypericum*, *Hypericum triquetrifolium*. Los autores observaron que los niveles de contenido de Hyp encontrados en los callos eran más altos que en los cultivos en suspensión celular, lo que sugiere que la acumulación de este compuesto en la suspensión celular necesita modificaciones adicionales.

Resultados similares se obtuvieron en nuestro laboratorio con dos antraquinonas aisladas de *Heterophyllaea pustulata*. La fracción obtenida de los

cultivos de callos nos permitió obtener un contenido satisfactorio de estos compuestos en comparación con los encontrados en la planta original. Hay muchos informes sobre el aislamiento e identificación de antraquinonas a partir de células cultivadas de plantas, aunque no así su actividad relacionada con PDT (Saraya Krishnan y Siril, 2018).

Los bajos niveles de expresión de los metabolitos activos de las plantas crean la necesidad de herramientas que permitan el cambio de material genético vegetal. La biotecnología ofrece la oportunidad de explotar células, tejidos, órganos u organismos completos cultivados *in vitro* y manipulándolos genéticamente para obtener los compuestos deseados. Actualmente, existen varias técnicas para manipular al genoma capaz de manejar la biología sintética vegetal (Yamazaki et al., 2018).

¿En qué estamos trabajando actualmente con nuestro grupo de trabajo?

En nuestro laboratorio actualmente llevamos a cabo una investigación destinada a evaluar la capacidad fotodinámica de distintos compuestos de origen vegetal en células de cáncer (Cogno et al., 2020). Estos compuestos, llamados Antraquinonas (AQs), fueron aislados de una planta denominada *Heterophyllaea pustulata* (Rubiáceas) que crece al noroeste de la Argentina (Comini et al., 2011), esta especie habita en las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy, donde es

Glosario

Autofagia: es un proceso catabólico altamente conservado en eucariotas, en el cual el citoplasma, incluyendo el exceso de orgánulos o aquellos deteriorados o aberrantes, son secuestrados en vesículas de doble membrana y liberados dentro del lisosoma/vacuola para su descomposición y eventual reciclado de las macromoléculas resultantes.

Apoptosis: es una vía de destrucción o muerte celular programada o provocada por el mismo organismo, con el fin de controlar su desarrollo y crecimiento, que puede ser de naturaleza fisiológica y está desencadenada por señales celulares controladas genéticamente.

Biorreactor: recipiente en el que se lleva a cabo un proceso químico que involucra organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de dichos organismos.

Biotecnología: aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos.

Explanto: tejido vivo separado de su órgano propio y transferido a un medio artificial crecimiento.

Hematoporfirina: es una porfirina preparada a partir de hemina. Es un derivado de la protoporfirina IX, donde los dos grupos vinilo se han hidratado (convertido en alcoholes). Se utiliza como fotosensibilizador en terapia fotodinámica.

Metabolitos Secundarios: compuestos químicos sintetizados por las plantas que cumplen funciones no esenciales en ellas, de forma que su ausencia no es letal

conocida por los efectos nocivos que genera en los animales que se alimentan de ella. La sintomatología se evidencia luego que estos se exponen a la luz solar, lo que les genera algunas irritaciones en la piel que luego avanzan con la aparición de importantes heridas (dermatitis), llegando incluso a provocar ceguera por formación de queratoconjuntivitis, motivo por el cual es reconocida como una especie fototóxica, es por esto que los lugareños del lugar la conocen como "cegadera".

Los resultados obtenidos hasta el momento nos alientan a seguir evaluando su efectividad como drogas anticancerígenas en modelos experimentales más complejos. Para poder realizar estas pruebas son necesarias mayores cantidades de droga y lo que se extrae de la planta no es suficiente para poder realizarlos. En la búsqueda de alternativas para producir compuestos medicinales deseables a partir de plantas, las prácticas biotecnológicas como hemos mencionado, cultivos de células y tejidos vegetales, tienen potencial como un complemento a la agricultura en la producción industrial de metabolitos bioactivos de plantas. Por lo tanto, teniendo en cuenta la necesidad de aumentar la producción de AQs, en este momento estamos abocados a obtener biotecnológicamente estos compuestos y optimizar su producción, para estudiar el efecto fotodinámico de diferentes AQs extraídas de *Heterophyllaea pustulata*, respecto a su acción en modelos experimentales complejos.

para el organismo, al contrario que los metabolitos primarios.

Necrosis: es una vía de destrucción o muerte celular que ocurre de manera aguda, por una forma no fisiológica, mediante una agresión que causa lesión en una porción importante del tejido, por ejemplo, en el centro de un tejido infartado, en un área de isquemia o en la zona de una lesión por toxinas.

Neoplasias: masa anormal de tejido que aparece cuando las células se multiplican más de lo debido o no se mueren cuando deberían desarrollándose lo que conocemos como tumor.

Oxígeno singlete: forma energéticamente excitada del oxígeno molecular altamente inestable y citotóxica.

Quimioterapia: es una técnica terapéutica que consiste en la administración de sustancias químicas denominadas medicamentos citostáticos o citotóxicos para el tratamiento de distintas afecciones, siendo comúnmente asociada a la terapia contra el cáncer.

Radioterapia: es una forma de tratamiento basada en el empleo de radiaciones ionizantes, para tratar distintos tipos de cáncer. Las radiaciones ionizantes utilizadas son con más frecuencia los rayos X de megavoltaje, pero también se utilizan rayos gamma y haces de partículas como electrones, protones, neutrones e iones pesados como los de carbono. **Oxígeno singlete:** forma energéticamente excitada del oxígeno molecular altamente inestable y citotóxica.

Referencias bibliográficas

- Akbar, S. (2020). *Handbook of 200 Medicinal Plants: A Comprehensive Review of Their Traditional Medical Uses and Scientific Justifications*. London: Springer International Publishing.
- Bhatia, S. (2015). Chapter 2: Plant Tissue Culture. In: Bhatia, S. et al. (editors). *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*. Cambridge: Academic Press.
- Cogno, I. S., Gilardi, P., Comini, L., Núñez-Montoya, S. C., Cabrera, J. L. Rivarola, V. A. (2020). Natural photosensitizers in Photodynamic Therapy: in vitro activity against monolayers and spheroids of human colorectal adenocarcinoma SW480 cells, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 31, 101852.
- Comini, L. R., Fernandez, I. M., Rumie Vittar, N. B., Núñez Montoya, S. C., Cabrera, J. L., & Rivarola, V.A. (2011). Photodynamic activity of anthraquinones isolated from *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae) on MCF-7c3 breast cancer cells. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 18(12), 1093–1095.
- Cui, X., Chakrabarty, D. Lee, E. & Paek, K. (2010). Production of adventitious roots and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor. *Bioresource Technology*, Volume 101, Issue 12.
- Foresto, E., Gilardi, P., Ibarra, L. E., & Cogno, I. S. (2021). Light-activated green-drugs: How we can use them in Photodynamic therapy and mass-produce them with biotechnological tools. *Phytomedicine Plus*, Volume 1, Issue 3, 100044.
- Frugis G. (2019). Plant Development and Organogenesis: From Basic Principles to Applied Research. *Plants (Basel, Switzerland)*, 8(9), 299.
- Karakaş, Ö., Özen, H. Ç., & Onay, A. (2015). Determination of Hypericin Content in Callus and Cell Suspension Cultures of *Hypericum triquetrifolium* Turra, *Adv. Zool. Bot.* , 3, 184–189.
- Muniyandi, K., George, B., Parimelazhagan, T., & Abrahamse, H. (2020). Role of Photoactive Phytocompounds in Photodynamic Therapy of Cancer. *Molecules*, 25(18), 4102.
- Naik, P. N y Alkayri, J. M (2016). Abiotic and Biotic Elicitors–Role in Secondary Metabolites Production through In Vitro Culture of Medicinal Plants. In: Shanker, A. & Shanker, C. (editors). *Abiotic and Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives*. IntechOpen Science.
- Otten L., Burr T. & Szegedi, E. (2008). *Agrobacterium*: A disease-causing bacterium. In: Tzfira, T. & Citovsky, V. (editors). *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology*. Springer: New York.
- Rischer, H., Häkkinen, S. T., Ritala, A., Seppänen-Laakso, T., Miralpeix, B., Capell, T., Christou, P., & Oksman-Caldentey, K. M. (2013). Plant cells as pharmaceutical factories. *Current pharmaceutical design*, 19(31), 5640–5660.
- Rkein, A. M., & Ozog, D. M. (2014). Photodynamic therapy. *Dermatologic clinics*, 32(3), 415–425.
- Saranya Krishnan, D. R. & Siril, E. A. (2018). Elicitor mediated adventitious root culture for the large-scale production of anthraquinones from *Oldenlandia umbellata* L. *Industrial Crops and Products*, 114, 173-179
- Sobhani Najafabadi, A., Khanahmadi, M., Ebrahimi, M., Moradi, K., Behroozi, P., & Noormohammadi, N. (2019). Effect of different quality of light on growth and production of secondary metabolites in adventitious root cultivation of *Hypericum perforatum*. *Plant signaling & behavior*, 14(9), 1640561.
- Yamazaki, M., Rai, A., Yoshimoto, N. et al. (2018). Perspective: functional genomics towards new biotechnology in medicinal plants. *Plant Biotechnol. Rep.* 12, 69–75.

