

Añil (*Indigofera suffruticosa* Mill.), una planta mexicana con mucho potencial

Elías Jaime Matadamas Ortiz

Programa Universitario de Investigación en Agricultura Sustentable. Línea de investigación: Valorización Industrial de los Agrorecursos y Sistemas Agroindustriales Sustentables. Universidad Autónoma Chapingo. Cúbiculo 111. Ed. "Fidel Márquez Sánchez" Área de Agronomía. emata993@hotmail.com.

Introducción

El añil (*Indigofera suffruticosa* Mill.) es una planta leguminosa nativa de regiones tropicales de México y Centroamérica. Esta especie se puede encontrar en forma silvestre en el sur y sureste de nuestro país y en forma cultivada en Oaxaca, Michoacán en México, y en Guatemala y El Salvador en Centroamérica. Otras especies del género *Indigofera* están distribuidas en Sudamérica, África y en Asia.

Es una planta que se le da diversos usos, dentro de los que sobresalen: como forraje para el ganado; como mejorador de las características del suelo; como planta medicinal en zonas rurales y sobre todo para la extracción del colorante natural azul conocido como índigo. En el mundo, al menos 20 especies de *Indigofera* se han utilizado para la extracción del índigo, dentro de las sobresalen *I. tinctoria* (Añil asiático), *I. arrecta* (Añil de África) e *I. suffruticosa* (Añil americano) (Cannon, *et al.*, 1994). En la actualidad, en los Estados de Oaxaca y Michoacán se practica el cultivo del añil con el propósito de la extracción del índigo. Este colorante natural es utilizado casi exclusivamente para el teñido de tejidos para la manufactura de prendas de vestir (Ku, 1997). Su extracción es laboriosa y compleja en la que las hojas del añil son sometidas a maceración en condiciones controladas y al final se obtiene un extracto sólido azul, conocido en el mundo como índigo natural (*indigo naturalis*) (Matadamas, 2005).

En el presente trabajo se describirá la vía química de la extracción del índigo de las hojas del añil, las propiedades químicas de los extractos y el principio anticancerígeno y sus mecanismos de acción en el tratamiento del cáncer y otras enfermedades degenerativas.

La química de la extracción del índigo de las hojas del añil

Las hojas del añil son verdes y no hay ningún indicio de que en su interior exista alguna sustancia de color azul. Sin embargo, después de hacer una extracción se obtendrá una pasta de color azul oscuro rica en índigo (Moziño, 1994). Lo anterior se explica bajo un modelo químico que ha sido producto de investigaciones básicas sobre la evolución del índigo en plantas indigóticas. En principio, es necesario mencionar que el índigo es un producto de la manipulación química de sustancias precursoras durante la extracción de las hojas de añil (Matadamas, 2006). En otras palabras, la materia colorante no se encuentra naturalmente en cualquier momento en las hojas, sino más bien, ésta se produce a partir de sustancias incoloras que al hacerlas reaccionar producen al índigo y sus derivados (Beyerinck, 1899). En la Figura 1 se describe el modelo químico de la evolución del índigo. Las materias colorantes de las plantas indigóticas tienen su origen en heterósidos incoloros presentes en las células del mesófilo de las hojas. Se trata de compuestos integrados por una molécula de glucosa unida a la parte aglicona de naturaleza indólica. Un núcleo indólico unido a un azúcar resulta en un glucósido precursor del que se parte para la evolución del índigo y sus derivados (Maier *et al.*, 1990). Existen en la naturaleza diversos precursores del índigo (Epstein *et al.*, 1967; Zhi-Qiang y Meinhart, 1992; Maugard *et al.*, 2001). Para el caso del añil, se considera que este precursor es el indoxilo- β -D-glucósido o indicán [1]. Este glucósido posee una piranosa unida al indol por un enlace éter. Para su hidrólisis y la separación de las dos moléculas se requiere de la intervención de una enzima *indicán- β -glucosidasa* (Minami *et al.*, 1996). Esta enzima se encuentra compartamentalizada

con relación a su sustrato el indicán, es decir, se localizan en diferentes partes de la célula. Mientras que la glucosidasa se localiza en los cloroplastos, el indicán se encuentra de manera natural en la vacuola de las células (Minami *et al.*, 1997). Cuando se une la enzima y su sustrato se da una hidrólisis de la que se libera el indoxilo [2], que es un compuesto altamente reactivo que al oxidarse produce a la isatina [3]. De manera espontánea, una molécula de isatina y una de indoxilo reaccionan para producir a la indirubina [4] y al condensarse dos moléculas de indoxilo resulta en una molécula de índigo o indigotina [5].

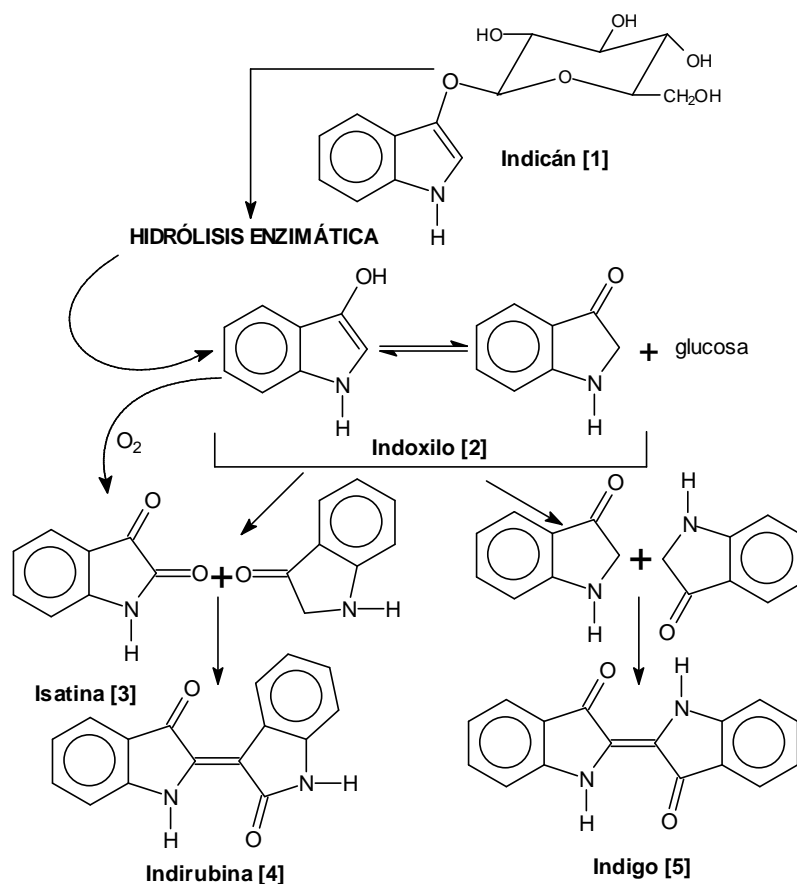


Figura 1. La evolución química de la indirubina y del índigo a partir del precursor indicán (Stoker *et al.*, 1998a; Stoker *et al.*, 1998b; Kokubun *et al* 1998; García-Macías y John, 2004).

Este modelo químico de la evolución de los derivados del índigo, se corroboró al hacer la caracterización química de extractos sólidos azules de las hojas del añil. Por medio de técnicas de espectrofotometría UV-Visible, Infrarrojo y Resonancia Magnética Nuclear protónica (RMN 1H) y del análisis de sus respectivos espectros se identificaron dos materias colorantes, la indigotina (índigo) y la indirubina (Matadamas, 2007). Mientras que el índigo es de color azul, la indirubina presenta una coloración rojo magenta. Estos dos compuestos tienen el mismo peso molecular (262.27 g/mol) y por lo tanto la misma fórmula condensada, $C_{16}H_{10}N_2O_2$. En estos casos se dice que son isómeros estructurales y tienen propiedades químicas y físicas diferentes (Matadamas, 2005). El contenido de índigo es mayor que el de indirubina, siendo éste último compuesto minoritario en los extractos de añil. Análisis cuantitativos por espectrofotometría UV-Visible de los extractos sólidos azules nos revelaron que los contenidos varían de acuerdo a la región productora (Oaxaca y Michoacán), y posiblemente al tipo de añil extraído, la edad de la planta, las condiciones climáticas y de suelo y a

las condiciones de extracción. Los valores del contenido de índigo o indigotina van del orden del 31 al 49% y los de indirubina son de 0.14 a 0.36% (% p/p) (Matadamas, 2008). En estudios realizados con la planta indigótica de Europa *Isatis tinctoria* L., se observó que los rendimientos de índigo e indirubina varían por efecto de diversos factores de la extracción como son, pH, temperatura y tiempo de maceración; siendo las temperaturas de alrededor de 80°C, valores de pH de entre 8 - 11 y tiempos de maceración mayores de 2 horas, los que producen una mayor proporción de indirubina (Matadamas, 2002). De manera comercial es deseable que los extractos naturales de índigo contengan menores proporciones de indirubina, ya que el uso que se le da a esos extractos es el teñido, y la indirubina representa una impureza que demerita la calidad de la tinción (Quian *et al.*, 2005). Pero en la actualidad, debido a la valorización farmacológica de la indirubina, los esfuerzos se enfocan a la producción de mayor rendimiento de esta molécula. Estudios en proceso nos indican que manejando las condiciones de extracción es posible la obtención de extractos con un contenido mayoritario de indirubina en relación a la indigotina.

Los extractos de índigo natural y la medicina tradicional

Una de las recetas de la medicina tradicional china llamada *Danggui Longhui Wan*, fue estudiada meticulosamente y se identificaron 11 ingredientes extraídos de igual número de especies vegetales (Damien *et al.*, 2001). Esta receta probó ser efectiva en el tratamiento de la Leucemia Mielógena Crónica (LMC), que es un tipo de cáncer muy invasivo. Las plantas constituyentes de este remedio resultaron ser: *Angelica sinensis*, *Aloe vera*, *Elephantopus scaber*, *Saussurea lappé*, *Scutellaria baicalensis*, *Phyllodendron chinensis*, *Coptis chinensis*, *Gardenia jasminoides*, *Rheun palmaris*, *Indigofera tinctoria* y *Moschus moschiferus* (Meijert *et al.*, 2006). En el año de 1966, el Instituto de Hematología de la Academia China de Ciencias Médicas identificó el principio activo de esta compleja mezcla. La actividad antileucémica fue atribuida a un solo ingrediente, el *Qing Dai*, nombre en chino que se le da al *indigo naturalis* o extracto sólido azul de índigo. Años más tarde se descubrió que la molécula con actividad anticancerígena del extracto de índigo natural era nada menos que la indirubina (Hoessel *et al.*, 1999).

Tuvieron que pasar muchos años para que se pudieran precisar los mecanismos de acción de la indirubina como agente anticancerígeno. En octubre de 2001, los doctores Tim Hunt, Paul Nurse y Leyland Hartwell recibieron el Premio Nobel de Fisiología y Medicina por sus importantes contribuciones en el establecimiento de las bases bioquímicas y moleculares de la regulación del ciclo celular. Lo anterior permitió establecer una nueva línea terapéutica en el tratamiento de diversas enfermedades, dentro de las cuales se encuentra el cáncer, a partir de moléculas que actúan como inhibidores de reguladores específicos o "blancos", y que al aplicarlas a células cancerosas pueden inhibir su proliferación o inducir a apoptosis (Meijer, 2005). En la actualidad la indirubina es uno de los compuestos prometedores en esta alternativa terapéutica.

La regulación del ciclo celular

El ciclo celular es un conjunto ordenado de eventos que conducen al crecimiento de la célula y la división en dos células hijas. Las células que no están en división son llamadas quiescentes o que se encuentran en estado de "quiescencia" (fase G₀). Las células que están en división se les conoce con el nombre de "proliferantes" y pasan por diversas fases: G₁, S, G₂ y M. La fase G₁ se caracteriza por un crecimiento de la célula con síntesis de proteínas y de ARN. Es el periodo que comprende entre el fin de una mitosis y el inicio de la síntesis de ADN. La fase S es en la que se produce la replicación de ADN y como resultado de esto cada cromosoma se duplica y que constituido por dos cromátidas idénticas. La fase G₂ es la tercera fase del ciclo celular en la que continua la síntesis de proteínas y ARN. Al final de este periodo se observan cambios en la estructura celular que indican el principio de la división, como es el principio de condensación de la cromatina. La fase M o mitosis, se subdivide

en seis periodos: profase, prometafase, metafase, anafase, telofase y citocinesis. En su conjunto la mitosis se caracteriza porque se produce la división celular por la que una célula da origen a dos células hijas.

Estas cuatro fases se encadenan de forma coordinada, cada fase no puede comenzar sin que la precedente no se haya desarrollado correctamente. Existen numerosos mecanismos de control que garantizan el curso exacto del ciclo y cuando una anomalía es detectada, son los encargados de detenerlo. El funcionamiento de estos mecanismos está relacionado con los "puntos de control" o transiciones y esta basado en la intervención de un gran diversidad de proteínas enzimáticas.

Se ha establecido que la mayor parte de los cánceres son producidos por anomalías en los mecanismos de regulación tanto en el ciclo celular como en la producción de la apoptosis. Para que se desarrolle un tumor deben producirse una multitud de pasos, entre los que una alteración mutagénica que impida la reparación del ADN podría ser el primer paso. Las alteraciones resultantes hacen que las células inicien un proceso de proliferación descontrolada e invadan tejidos sanos (Meijer, 2005).

Las Kinasas Ciclinas Dependientes (KCD, o en inglés CDK)

Uno de los más importantes descubrimientos en el tópico del ciclo celular ha sido la identificación de las proteínas kinasas ciclinas dependientes (kinasas dependientes de las ciclinas). Estas proteínas juegan un papel esencial en el desencadenamiento, control y sucesión armoniosa de las diferentes fases del ciclo celular. Las Kcd son activas únicamente bajo la forma de un complejo formado por una subunidad catalítica (Kcd) y una subunidad reguladora (ciclina). Tanto las kinasas como las ciclinas son proteínas catalíticas. Las Kcd son fosforiladas y desfosforiladas a fin de hacerlas activas o inactivas, según sean los requerimientos de control (Fisher y Gianella-Barradori, 2005).

Receptores moleculares de la indirubina

En los últimos años se han identificado diversos receptores que son reguladores de procesos celulares, entre los que se encuentran: las kinasas ciclinas dependientes (kcd), la kinasa-3-glicógena sintasa, el receptor anillo hidrocarbónico, la fosforilasa glicógena, la kinasa tirosina Src y el factor de transcripción Stat3. A continuación revisaremos brevemente estos diferentes receptores y la consecuencia de su inhibición sobre el ciclo de la célula del tumor y la muerte celular.

Las kinasas ciclina dependientes (Kcd)

Las alteraciones en la fosforilación de proteínas y sus repercusiones en las reacciones en las intervienen frecuentemente están asociadas a la aparición de enfermedades humanas. Esta es la razón del crecimiento exponencial de los estudios y las inversiones en investigación para la identificación y evaluación terapéutica de inhibidores farmacológicos de las proteínas kinasas. Las anomalías en la actividad de las KCD y su regulación en cánceres, infecciones virales y desordenes degenerativos tales como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson y Nieman-Pick, isquemia o daño traumático del hígado, han sido motivo de una investigación intensiva por potentes y selectivos inhibidores farmacológicos de estas kinasas. La indirubina es un probado inhibidor de Cdk1, Cdk2 y Cdk5 al actuar por competencia directa con el ATP con el sitio catalítico de las kinasas (Hoessel *et al.*, 1999; Leclerc *et al.*, 2001; Marko *et al.*, 2001; Duensing *et al.*, 2004; Polychronopoulos *et al.*, 2004). Heredia *et al.*, (2005) logró bajar considerablemente la replicación de HIV-1 con el tratamiento con indirubina-3'-monoxima al bloquear la expresión del gen viral por el factor celular P-TEFb.

Kinasa-3- glicógena sintasa

La indirubina resultó ser un potente inhibidor de las GSK-3, la cual es una enzima involucrada en la regulación del ciclo celular y el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el mal de Alzheimer y desorden bipolar, así como de la diabetes tipo II, enfermedades inflamatorias y apoptosis (Meijer *et al.*, 2004; Polychronopoulos *et al.*, 2004). Se ha reportado que la indirubina es un efectivo inhibidor de la kinasa-3- β - glicógena sintasa (GSK-3 β), la cual es responsable de la anormal fosforilación Tau de la proteína de ligamiento de microtúbulos observada en la enfermedad de Alzheimer (Leclerc, S. *et al.*, 2001).

Receptor del anillo hidrocarbano

El receptor del anillo hidrocarbano (AhR) es un factor ligado a la transcripción que regula a los genes involucrados en el metabolismo xenobiótico y la proliferación y diferenciación de las células. El complejo AhR y algunas moléculas ligantes es un activador de la expresión de genes en el desarrollo celular. Se ha observado que los derivados de la indirubina son efectivos ligantes con AhR. Entre los blancos de los complejos AhR/indirubinas está el gen de p27^{K1P1}, la cual es una proteína inhibidora de la CDK2/ciclina E-A. Una regulación de p27^{K1P1} resulta en una dramática interrupción del ciclo celular en la fase G₁. Muy interesante resulta la interacción de la indirubina con AhR, la cual permite la expresión del citocromo P450 1A1 y 1B1, los cuales a su vez son responsables de la degradación metabólica de la indirubina. De este modo proporciona un flujo de retroalimentación negativa y permite que la indirubina se acumule solo transitoriamente en las células. Este es un severo contraste con la dioxina que es extremadamente estable y, por consecuencia, es muy tóxica. Lo anterior puede explicar el porque la indirubina presenta una limitada toxicidad (Adachi *et al.*, 2001).

Fosforilasa glicógena

La fosforilasa glicógena (GP) es una enzima alósterica que existe en dos formas interconvertibles. La primera, GPb, tiene baja actividad, mientras que GPa tiene una alta actividad y juegan un importante papel en la regulación de la degradación del glicógeno y de proliferación celular. Se ha encontrado que la indirubina puede inhibir ambas formas de GP al ligarse al sitio inhibitorio, un sitio específico donde glucosa, purinas, nucleósidos y nucleótidos también se ligan. Al inhibir a la fosforilasa glicógena a través de su sitio catalítico, puede ser de interés en el tratamiento de la diabetes tipo II. La indirubina podría tener acciones adicionales en las células tumorosas por la disrupción en el ciclo celular, conduciendo a las células a apoptosis, así como por el bloqueo de la alimentación de glucosa por las células enfermas (Kosmopoulou *et al.*, 2004).

Las proteínas Stat3 y c-Src

Las proteínas Stat3 y c-Src son importantes en la anormal división celular en los tumores. Se ha observado que la indirubina es capaz de fosforilar a Stat3 y por lo tanto la inhibición de c-Src, la cual permite la desregulación de factores esenciales como Mcl-1 y survivina que son proteínas que alcanzan niveles máximos en células cancerosas. La indirubina al comprometer la supervivencia de estas células desencadena la apoptosis. La muerte celular de los tumores malignos es un mecanismo de control del cáncer por lo que cualquier molécula que induzca a apoptosis es deseable (Nam *et al.*, 2005). Aunque algunos derivados de la indirubina provocan apoptosis clásica, recientemente se ha reportado que una indirubina, ejemplificada por 7-bromo-indirubina-3'-oxima (7BIO), induce a una muerte celular no opoptósica. Esta muerte celular inducida por 7BIO no incluye o requiere la activación de la caspasa, liberación de citocromo C, activación de p53 o de AhR. 7BIO no inhibe a los clásicos blancos de las demás indirubinas Cdk1/2 y GSK-3, sugiriendo una acción aún no identificada (Meijer *et al.*, 2006).

Se ha sugerido que la potente actividad antitumoral de la indirubina descansa en una combinación de mecanismos diferentes e independientes los cuales convergen en la inhibición de la proliferación de células cancerosas y con su muerte. Esta multiplicidad de efectos proporciona protección contra la rápida aparición de resistencia que inevitablemente ocurre con las drogas altamente específicas. Finalmente, el hecho de las indirubinas inducen su propia degradación a través de la vía citocromo AhR/citocromo P450, también contribuye a su mínima toxicidad (Meijer *et al.*, 2006).

Derivados de la indirubina recientemente sintetizados y utilizados en ensayos terapéuticos experimentales

Luego del descubrimiento de la indirubina como ingrediente activo sobre la Leucemia Mielógena Crónica (LMC) y después de la reciente identificación de varios blancos moleculares de las indirubinas; varios grupos de investigadores se dieron a la tarea de sintetizar derivados de la indirubina cuya actividad fuera más específica, con mayor solubilidad y eficacia. Así, actualmente es posible contar con un panel de derivados de la indirubina, los cuales se presentan en la Figura 2 (Polychronopoulos *et al.*, 2004; Cerchiaro y da Costa, 2006; Beauchard *et al.*, 2006; Meijer *et al.*, 2006).

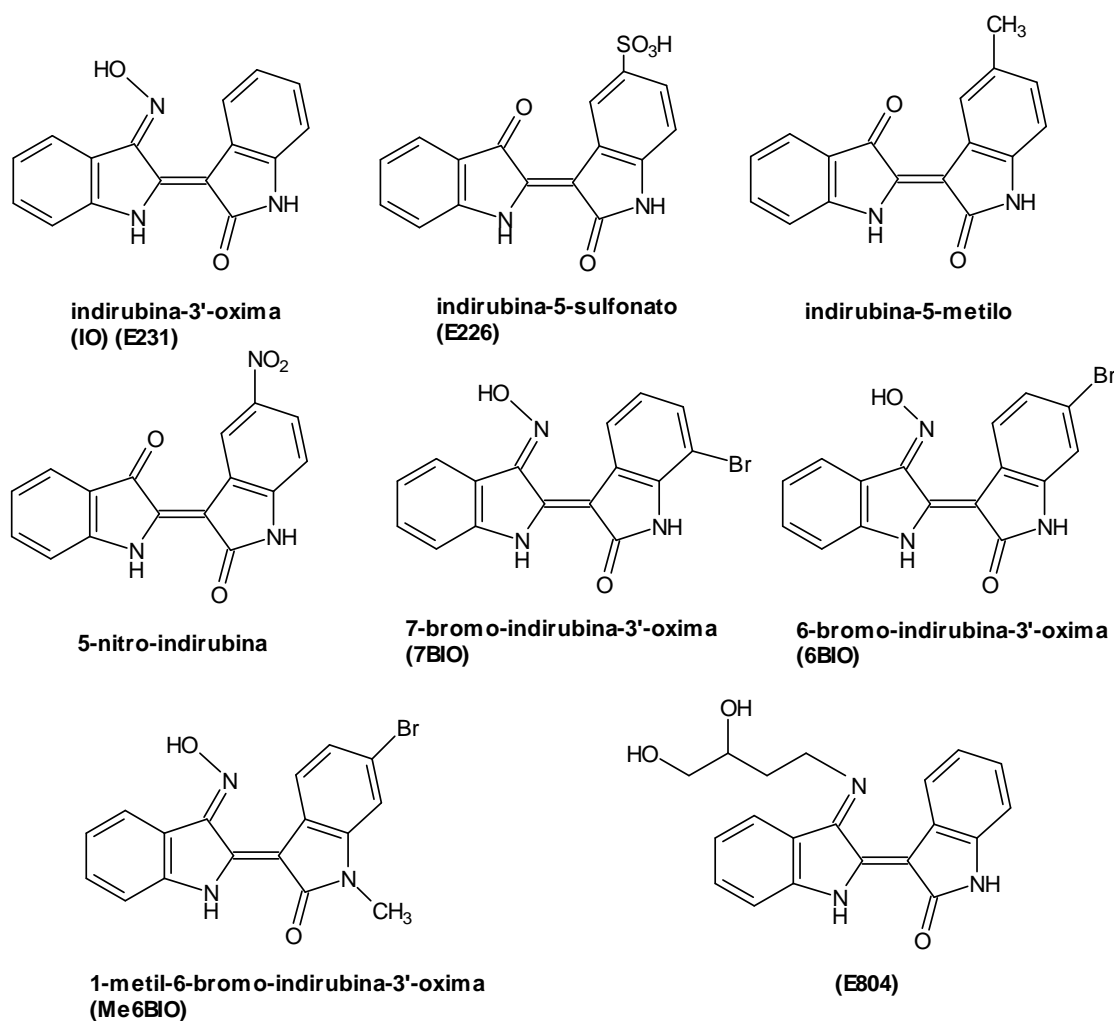


Figura 2. Estructura de los derivados de la indirubina más frecuentemente ensayados.

La síntesis de los derivados de la indirubina

Todos los esfuerzos para la producción de derivados de la indirubina están basados en la síntesis química que involucra la utilización de reactivos relacionados (Leclerc *et al.*, 2001; Polychronopoulos *et al.*, 2004; Beauchard *et al.*, 2006). En la Tabla 1 se mencionan los derivados y los reactivos para su síntesis.

Tabla 1. Los reactivos para la síntesis de indirubina y sus derivados

Compuesto	Reactivos
Indirubina	Isatina, acetato de indoxilo
5-Iodoindirubina	5-iodoisatina, acetato de indoxilo
5-Bromoindirubina	5-bromoisatina, acetato de indoxilo
5-Cloroindirubina	5-cloroisatina, acetato de indoxilo
5-Fluoroindirubina	5-fluoroisatina, acetato de indoxilo
5-Metilindirubina	5-metilisatina, acetato de indoxilo
5-Nitroindirubina	5-nitroisatina, acetato de indoxilo
Ácido indirubina-5- sulfónico	Sal de sodio dihidratada de ácido de isatina-5-sulfónico, acetato de indoxilo
5'-Bromoindirubina	Isatina, acetato de 5-bromoindoxilo
5,5'-Dibromoindirubina	5-bromoisatina, acetato de 5-bromoindoxilo
Ácido 5'-Bromoindirubina-5-sulfónico	Sal de ácido de isatina-5-sulfónico, acetato de 5-bromoindoxilo
Indirubina-3'-monoxima	Indirubina, hidroxilamina clorhídrica, piridina

La indirubina-3'-monoxima (IO) es el compuesto que ya se comercializa principalmente por la firma Sigma-Aldrich y cuyo precio actualizado (2009) es de \$1750.00 por miligramo. En otras palabras, el costo de cada gramo de este potencial fármaco es de 1.75 millones de pesos mexicanos. Aunque la molécula está en una etapa experimental y los precios pueden bajar sustancialmente con su uso extensivo en el futuro, es posible que el tratamiento no se encuentre al alcance de los habitantes de países en desarrollo.

Avances en la obtención de indirubina natural en México

Ante las dificultades para que los tratamientos a base de indirubina y sus derivados puedan estar a la mano de pacientes de nuestro país, se han dado avances para la obtención de indirubina a menor costo y a partir de fuentes naturales. Uno de los primeros pasos fue la caracterización de la indirubina y del índigo de extractos de hojas del añil (*Indigofera suffruticosa* Mill.), lo que nos permitió saber que en los extractos sólidos azules (ESA), se encuentran las dos moléculas indigoides (Matadamas, 2007). Posteriormente, el análisis cuantitativo de esos compuestos nos reveló que por cada kilogramo de extracto sólido de índigo existen en promedio 2.5 gramos de indirubina (Matadamas, 2008). Así que el extracto sólido azul de índigo es una fuente potencial para la obtención de indirubina, tomando en cuenta que los añileros de México producen aproximadamente 800 kg de extracto de añil con lo que teóricamente se obtendrían 2.0 Kg de indirubina en un proceso de purificación de la indigotina. Al separar la indirubina del extracto sólido del añil se obtiene un extracto de mayor eficiencia para el teñido y como ganancia se obtendría otro producto de alto valor agregado (la indirubina) que actualmente no se valoriza. En condiciones experimentales, en los laboratorios de Agronomía y Agrorecursos (LABAGRO) y de Productos Naturales (LAPRONAT) de la Universidad Autónoma

Chapingo se ha logrado la extracción de la indirubina y se tienen avances en la optimización de su extracción a nivel semi- industrial.

Por otra parte, en los dos últimos años se han realizado ensayos de extracción directa de la indirubina de las hojas del añil. Se está poniendo a punto un proceso de extracción de extractos líquidos ricos en indirubina, lo que permitirá en un futuro producir extractos sólidos rojos (ESR) con un contenido hasta del 50% de indirubina, lo que en términos prácticos se producirían cantidades ilimitadas de este compuesto cada año a partir del añil que es un agrotrecurso renovable.

Avances en la evaluación terapéutica de la indirubina

Se está proyectando la evaluación de la actividad anticancerígena de la indirubina y sus derivados en modelos vegetales con extractos líquidos de hojas de añil y se producirán cantidades adecuadas de indirubina para proporcionárselas a los laboratorios e instituciones de investigación sobre el cáncer y otras enfermedades en México para que hagan su evaluación terapéutica y en su caso desarrollen los protocolos respectivos.

Conclusión

Existe una certeza científica sobre la actividad anticancerígena de la indirubina, fruto de múltiples trabajos desarrollados sobre todo en Europa en la última década, y el añil (*Indigofera suffruticosa* Mill.) en nuestro país representa una fuente renovable para la obtención de este compuesto a precios reducidos. Lo anterior, aunado a los estudios de evaluación en modelos animales o directamente con pacientes, puede ser en el futuro una alternativa accesible, para la sociedad mexicana, en el tratamiento de diversos tipos de cáncer y otras enfermedades.

Bibliografía

1. Adachi, J., Mori, Y., Matsui, S., Takigami, H., Fujino, J., Kitagawa, H., Miller, C.A., Kato, T., Saeki, K. and Matsuda, T. 2001. Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. *J. Biol. Chem.* 276(34):31475-31478.
2. Beauchard, A., Ferandin, Y., Frère, S., Lozach, O., Blairvacq, M., Meijer, L., Thiéry, V. and Besson T. 2006. Synthesis of novel 5-substitued indirubins as protein kinases inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 14:6434-6443.
3. Beyerinck, M. K. 1899. The production of indigo from woad (*Isatis tinctoria*). *Nature* 61(1568):71.
4. Cannon, M., Cannon, J. and Dalby-Quenet, G. 1994. Dye Plants. Ed. The Herbett Press Ltd. The Royal Botanic Gardens, Kew, London. 8 p.
5. Cherchiaro, G. and da Costa, F. A.M. 2006. Oxindoles and Copper Complexes with Oxindole-Derivativs as Potential Pharmacological Agents. *J. Braz. Chem. Soc.* 17(8):1473-1485.
6. Damiens, E., Baratte, B., Marie, D., Eisenbrand, G. and Meijer, L. 2001. Anti-mitotic properties of indirubina-3'-monoxime, a CDK/GSK-3 inhibitor: induction of endoreplication following prophase arrest. *Oncogene* 20:3786-3797.
7. Duensing, S., Duensing, A., Lee, C.D., Edwards, M.K., Piboonniyom, S.O., Manuel, E., Skaltsounis, L., Meijer, L. and Munger, K. 2004. Cyclin-dependent kinase inhibitor indirubin-3'-oxime selectively inhibits human papillomavirus type 16 E7-induced numerical centrosome anomalies. *Oncogene* 23:8206-8215.
8. Epstein, E., Nabors, M.W. and Stowe, B.B. 1967. Origin of indigo of woad. *Nature* 216(11):547-549.
9. Fisher, P.M. and Gianella-Borradori, A. 2005. Recent progress in the discovery and development of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Exp. Opin. Investig. Drugs* 14(4):457-477.

10. García-Macías, P. and Jhon, P. 2004. Formation of Natural Indigo Derived from Woad (*Isatis tinctoria* L.) in Relation to Product Purity. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 52:7891-7896.
11. Heredia, A., Davis, C., Bamba, D., Le, N., Gwarzo, M.Y., Sadowska, M., Gallo, R.C. and Redfield, R.R. 2005. Indirubin-3'-monoxime, a derivative of a Chinese antileukemia medicine, inhibits P-TEFb function and HIV-1 replication. *AIDS* 19(18):2087-2095.
12. Hoessel, R., Leclerc, S., Endicott, J., Noble, M., Lawrie, A., Tunnah, P., Leost, M., Damiens, E., Marie, D., Marko, D., Niederberger, E., Tang, W., Eisenbrand, G. and Meijer, L. 1999. Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. *Nature Cell Biology* 1:60-67.
13. Kokubun, T., Edmonds, J. and Jhon, P. 1998. Indoxyl derivatives in Woad in relation to medieval indigo production. *Phytochemistry* 49(1):79-87.
14. Kosmopoulo, M.N., Leonidas, D.D., Chrysin, E.D., Bischler, N., Eisenbrand, G., Sakarellos, C.E., Pauptit, R. and Oikonomakos, N.G. 2004. Binding of the potential antitumor agent indirubina-5-sulphonate at the inhibitor site of rabbit muscle glycogen phosphorylase b. Comparison with ligand binding to pCDK2-cyclin A complex. *Eur. J. Biochem.* 271:2280-2290.
15. Ku, Q. V. 1997. El añil en el sur del Istmo oaxaqueño. Perspectivas de sustentabilidad de los sistemas agrícolas actuales. Tesis. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 87 p.
16. Leclerc, S., Garnier, M., Hoessel, R., Marko, D., Bibb, J.A., Snyder, L.G., Greengard, P., Biernat, J., Wu, Y.Z., Mandelkow, E.M., Eisenbrand, G. and Meijer, L. 2001. Indirubins Inhibit Glycogen Synthase Kinase-3 β and CDK5/P25, Two Protein Kinases Involved in Abnormal Tau Phosphorylation in Alzheimer's Disease. *J. Biol. Chem.* 276(5):251-260.
17. Maier, W., Schumann, B. and Groger, D. 1990. Biosynthesis of indoxyl derivatives in *Isatis tinctoria* and *Polygonum tinctorium*. *Phytochemistry* 29(3):817-819.
18. Marko, D., Schatzle, S., Friedel, A., Genzlinger, A., Zankl, H., Meijer, L. and Eisenbrand, G. 2001. Inhibition of cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) by indirubina derivatives in human tumor cells. *British J. Cancer* 84(2):283-289.
19. Matadamas, O.E.J. 2002. Étude et caractérisation des matières colorantes du Pastel (*Isatis tinctoria* L.). Détermination des conditions optimales d'extraction pour leur utilisation à l'échelle industrielle. Tesis Ph. D. Op. Réactivité des Agroressources. Institut National Polytechnique. École Nationale Supérieure des Ingénieurs en Arts Chimiques et Technologiques de Toulouse. Toulouse, Francia. 275 p.
20. Matadamas, O.E.J. 2005. Oro azul. El índigo. Propiedades, fuentes y métodos de extracción. Ed. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 124 p.
21. Matadamas, O.E.J. 2006. Rendimientos de índigo en hojas de Añil (*Indigofera suffruticosa* Mill.) a diferentes temperaturas de extracción y con tratamiento de lavado. En: *Memorias del III Congreso Internacional de Grana cochinilla y Colorantes naturales*. Morelia, Michoacán. México.
22. Matadamas, O.E.J. 2007. Caracterización de las moléculas colorantes del Añil (*Indigofera suffruticosa* Mill.) por Espectrofotometría UV-Visible, Infrarrojo y Resonancia Magnética Nuclear protónica (RMN ^1H). En: *Memorias de las XVIII Jornadas de Investigación en Preparatoria Agrícola. 14º Encuentro de investigadores en Preparatoria Agrícola 2007*. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. pp-33-41.
23. Matadamas, O.E.J. 2008. Análisis cuantitativo de las moléculas colorantes de extractos sólidos de hojas de Añil (*Indigofera suffruticosa* Mill.). En: *Grana Cochinilla y Colorantes Naturales*. Editores: Llanderal, C., Zetina, D.H., Vigueras, A.L. y Portillo, L. Colegio de Postgraduados, México. 124 p.
24. Maugard, T., Enaud, E., Choisy, P. and Legoy, D. 2001. Identification of an indigo precursor from leaves of *Isatis tinctoria* (Woad). *Phytochemistry* 58:897-904.
25. Meijer, L. 2005. Le cycle de division cellulaire et sa régulation. In: *Cancérologie Fondamentale. Collection Société Française du Cancer*. Coordinateurs: Christian-Jacques Larsen et Jacques Robert. Ed. John Libbey Eurotext. Paris, Francia. pp-19-29.

26. Meijer, L., Flajolet, M. and Greengard, P. 2004. Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase-3. *Trends Pharmacol. Sci.* 25(9):471-480.
27. Meijer, L., Shearer, J., Bettayeb, K. and Ferandin, Y. 2006. Diversity of intracellular mechanism underlying the anti-tumor properties of indirubins. In: *Indirubin, the red shade of indigo*. Editors Meijer, L., Guyard, N., Skaltsounis, L. & Einsenbrand, G.). Ed. Life in Progress. Station Biologique de Roscoff. pp-235-246.
28. Minami, Y., Kanafuji, T. and Miura, K. 1996. Purification and characterization of a β -Glucosidasa from *Polygonum tinctorium*, Which catalyses preferentially the hydrolysis of indican. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60(1):147-149.
29. Minami, Y., Takao, H., Kanafuji, T., Miura, K., Kondo, M., Hara-Nishimura, I. and Matsubara, H. 1997. β -Glucosidasa in the indigo plant: intracellular localization and tissue specific expression in leaves. *Plant Cell Physiol.* 38(9):1069-1074.
30. Moziño, S.F. 1994. Tratado del Xiquilite y Añil de Guatemala. En: *La grana y el añil. Técnicas tintóreas en México y América Central*. Publicaciones de la Escuela de Estudios Hispano-Americanos de Sevilla. N° general catálogo 374. Ma. Justina Sarabia Viejo Ed. Sevilla, España. pp-56-75.
31. Nam, S., Buettner, R., Turkson, J., Kim, D., Cheng, J.Q., Muehlbeyer, S., Hippe, F., Vatter, S., Merz, K.H., Eisenbrand, G. and Jove, R. 2005. Indirubin derivatives inhibit Stat3 signaling and induce apoptosis in human cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102(17):5998-6003.
32. Polychronopoulos, P., Magiatis, P., Skaltsounis, A.L., Myrianthopoulos, V., Mikros, E., Tarricone, A., Musacchio, A., Roe, S.M., Pearl, L., Leost, M., Greengard, P. and Meijer, L. 2004. Structural Basis for the Synthesis of Indirubins as Potent and Selective Inhibitors of Glycogen Synthase Kinase-3 and Cyclin-Dependent Kinases. *J. Med. Chem.* 47:935-946.
33. Quian, B., Panichayupakaranant, P., Sirikatitham, A., Zhang, R.P., Guo, Y.D. y Wu, Y.Q. 2005. Determinación cuantitativa de indigotina e indirubina en el indigo Stoker, G.K., Cooke, T.D. and Hill, J.D. 1998a natural mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). *Ars. Pharm.* 46(4):429-438.
34. Stoker, G.K., Cooke, T.D. and Hill, J.D. 1998a. An improved method for the large-scale processing of woad (*Isatis tinctoria*) for possible commercial production of woad indigo. *J. Agric. Eng. Res.* 71:315-320.
35. Stoker, G.K., Cooke, T.D. and Hill, J.D. 1998b. Influence of light on natural indigo production from woad (*Isatis tinctoria*). *Plant Growth Regulation* 25(3):181-185.
36. Zhi-Qiang, X. and Meinhart, H.Z. 1992. Biosynthesis of indigo precursors in higher plants. *Phytochemistry* 31(8):2695-2697.