

**EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO Y GENOTÓXICO
in vitro DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Morinda citrifolia* L. (Noni)
EN LINFOCITOS HUMANOS.**

**JOHN JAIRO VIVEROS MUÑOZ
JUAN DAVID MUÑOZ MUÑOZ**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN TOXICOLOGÍA GENÉTICA Y CITOGÉNICA
POPAYÁN
2006**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO Y GENOTÓXICO
in vitro DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Morinda citrifolia* L. (Noni)
EN LINFOCITOS HUMANOS.**

**JOHN JAIRO VIVEROS MUÑOZ
JUAN DAVID MUÑOZ MUÑOZ**

Trabajo de Grado como requisito parcial para optar al título de Biólogos

**Director
Magíster. SILVIO M. CARVAJAL V.**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN TOXICOLOGÍA GENÉTICA Y CITOGÉNICA
POPAYÁN
2006**

Nota de aceptación:

Director
Mg. SILVIO MARINO CARVAJAL V.

Jurado
Mg. LUZ STELLA HOYOS G.

Jurado
Mg. EDNA LOURDES OROZCO C.

Fecha de Sustentación: Popayán, 15 de Marzo de 2006

A *Díos.*
nuestros padres, hermanos, abuelos y amigos...

AGRADECIMIENTOS

Gracias a DIOS por darnos vida y salud.

A nuestros padres y hermanos, por su constante apoyo en momentos de alegría e incertidumbre.

Al Mg. Silvio M. Carvajal excelente persona y profesional, quién con sus ideas y conocimiento contribuyo a que este trabajo llegara a buen término.

A la Mg. Luz Stella Hoyos, quién con su experiencia profesional y calidad humana nos hizo mejor como estudiantes, como personas y como futuros profesionales.

A la profesora Edna L. Orozco, quién con sus importantes observaciones permitió mejorar considerablemente el trabajo.

A Marsha M^ckoy, por el aporte desinteresado de bibliografía, la cual fue una gran ayuda para el avance del trabajo.

A nuestros compañeros de carrera y de énfasis en genética, en especial a Elsa B. Velasco y al grupo de Investigación en Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, por su contribución y valiosas críticas constructivas que permitieron desarrollar un mejor trabajo.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	11
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
2. JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	15
3. ANTECEDENTES	17
3.1 EFECTO ANTICANCERÍGENO	17
3.2 EFECTO TÓXICO	18
3.3 EFECTOS EN MICROORGANISMOS	19
3.4 EFECTO ANALGÉSICO	20
3.5 COMPUESTOS AISLADOS DEL NONI CON EFECTOS BIOLÓGICOS	21
4. OBJETIVOS	23
4.1 OBJETIVO GENERAL	23
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
5. MARCO TEÓRICO	24
5.1 CARACTERÍSTICAS DE LA PLANTA	24
5.1.1 Clasificación Taxonómica	24
5.1.2 Nombres comunes	25
5.1.3 Descripción y Distribución	25
5.1.4 Beneficios	26
5.2 BIOMARCADORES	27
5.2.1 Biomarcadores de Efectos Tempranos	27

5.3 CITOTOXICIDAD	29
5.3.1 Índice mitótico	29
5.4 GENOTOXICIDAD	29
5.4.1 Alteraciones Cromosómicas	30
5.5 LINFOCITOS HUMANOS DE SANGRE PERIFÉRICA	31
6. MATERIALES Y MÉTODOS	32
6.1 PREPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE LA FRUTA DE <i>Morinda citrifolia</i> L.	32
6.2 CULTIVO Y COSECHA DE LINFOCITOS	33
6.2.1 Protocolo de siembra	33
6.2.2 Protocolo de cosecha y tinción	33
7. DISEÑO EXPERIMENTAL	35
7.1 EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO MEDIANTE LA PRUEBA DE ÍNDICE MITÓTICO	35
7.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO MEDIANTE LAS PRUEBAS DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS	36
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
8.1 EFECTO CITOTÓXICO	37
8.2 EFECTO GENOTÓXICO	43
9. CONCLUSIONES	48
10. SUGERENCIAS	49
BIBLIOGRAFÍA	50
ANEXO	57

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Químicos constituyentes del noni.	28
Tabla 2. Concentraciones del extracto acuoso de la fruta de noni, incluido el control negativo.	32
Tabla 3. Número de metafases obtenidas en cuatro experimentos, índice promedio (\bar{X}) de metafases, en cultivos de linfocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones del extracto acuoso de la fruta de <i>Morinda citrifolia</i> L (noni), incluido el control negativo, con su respectivo error estándar (EE).	37
Tabla 4. Número de alteraciones cromatídicas, cromosómicas y promedio de alteraciones cromosómicas totales (\bar{X}), con su respectivo error estándar (EE) y tamaño de muestra (n), registradas en cultivos de linfocitos humanos, expuestos al extracto acuoso del fruto de <i>Morinda citrifolia</i> L (noni) y sus controles.	43

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Fruto de noni en diferentes estados de crecimiento y maduración	24
Figura 2. Arbusto de noni a nivel del mar	25
Figura 3. Protocolo de siembra de linfocitos para la prueba de índice mitótico	35
Figura 4. Protocolo de siembra de linfocitos para la prueba de alteraciones cromosómicas	36
Figura 5. Correlación lineal entre las concentraciones del extracto acuoso de noni y el número de metafases	38
Figura 6. Efecto del extracto acuoso de la fruta de noni sobre el número de metafases en cultivo de linfocitos	39
Figura 7. Metafases observadas en cultivos <i>in vitro</i> de linfocitos humanos tratados con diferentes concentraciones del extracto acuoso de la fruta de <i>Morinda citrifolia</i> L (noni)	40
Figura 8. Promedio de alteraciones cromosómicas	45
Figura 9. Alteraciones cromosómicas (AC) encontradas en cultivos <i>in vitro</i> de linfocitos humanos después de ser tratados con el extracto acuoso de la fruta de noni	46

RESUMEN

La *Morinda citrifolia* L (noni), pequeño árbol originario de la Polinesia, se usa ancestralmente para el tratamiento de varias enfermedades, como el cáncer, entre otras. El consumo del noni está ampliamente distribuido entre la población con un gran impacto en el mercado mundial, representado US \$400 millones para el año 2002 (Scot, 2003). Debido a que sólo se han realizado algunas pruebas de toxicidad aguda, subcrónica y crónica en animales, se planeó la investigación con el objetivo de evaluar la citotoxicidad y genotoxicidad *in vitro* del extracto acuoso de la fruta del noni en linfocitos humanos, mediante la prueba de índice de mitótico (IM) y alteraciones cromosómicas (AC), respectivamente; con el propósito de identificar potenciales riesgos para la salud humana, y contribuir científicamente con entidades reguladoras de alimentos.

La metodología empleada en la obtención del extracto acuoso fue una modificación del método empleado por Mckoy y colaboradores en el 2002; se realizaron 9 tratamientos diferentes (0, 0.0219, 0.0438, 0.0876, 0.17, 0.212, 0.265, 0.332 y 0.4144 mg /mL) incubando las células durante 72 h para la prueba de IM; a partir de la cual se eligieron tres tratamientos (0.0219, 0.17 y 0.4144 mg/mL) para la prueba de AC, incubando las células por 50 h. Las preparaciones citogenéticas se realizaron por tinción directa con Giemsa al 10%. Los datos del efecto citotóxico se analizaron mediante prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, análisis de correlación de Spearman y la prueba de comparaciones múltiples de Duncan; el efecto genotóxico se analizó con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y la prueba de comparaciones múltiples de Duncan.

Para el efecto citotóxico se identificó asociación lineal inversa entre el IM y la concentración del extracto ($p < 0,05$); es decir, un efecto depresor de la proliferación celular, dependiente de la dosis. En el rango de concentraciones 0,000 a 0,332 mg/mL el IM paso de 296 a 201 metafases/ 4000 células; es decir una reducción del 35%. Dicho análisis permitió inferir que la disminución observada en el IM depende en un 23% al incremento en la concentración del extracto acuoso. El extracto acuoso de la fruta de *Morinda citrifolia* L (noni), en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos, bajo las condiciones evaluadas en este trabajo, evidenció efecto genotóxico a las concentraciones 0.0219, 0.170 y 0.4144 mg/mL del extracto acuoso de la fruta noni, las cuales indujeron números promedio de ACs de 3.83 ± 0.31 , 1.50 ± 0.22 y 1.33 ± 0.33 en 100 células, respectivamente. En consecuencia, el extracto acuoso del noni en linfocitos humanos en condiciones *in vitro*, puede interactuar significativamente con estructuras u organelos de las células proliferativas somáticas expresado en el IM, y al parecer los compuestos de la mezcla compleja interactúan y alteran el ADN (material genético).

Palabras claves: *Morinda citrifolia* L, extracto acuoso, linfocitos humanos, efecto citotóxico, índice de metafases (IM), efecto genotóxico, alteraciones cromosómicas (ACs).

INTRODUCCIÓN

A través de la historia, las plantas han sido consideradas una fuente potencial para la medicina moderna, a nivel farmacológico, alimenticio e industrial o como un recurso terapéutico eficaz en el autocuidado y atención primaria de la salud. El interés en retomar el conocimiento de las propiedades curativas de las plantas, ha surgido por la necesidad de solucionar desde simples dolores, hasta enfermedades como el cáncer.

La planta *Morinda citrifolia* L es frecuentemente empleada en la medicina folclórica para prevenir y curar diversas enfermedades, conocida popularmente como noni, es un pequeño árbol originario de las islas de la Polinesia, con una amplia distribución alrededor del mundo como remedio popular ancestral, que se remonta aproximadamente a 2000 años. El valor del noni no se limita al empleo de la fruta, sino también a la corteza, hojas y raíz, etc., el cual ha sido ampliamente estudiado en la actualidad por diferentes científicos como Wang (2002), quien reporta que el noni posee un amplio valor terapéutico y nutricional. A pesar de que el noni ha resultado de mucho interés en la investigación, por su posible efecto en beneficio de la salud, no se ha evaluado el potencial que este puede tener para interactuar y alterar el ADN; es por lo tanto, importante determinar si existe un efecto a corto o largo plazo, como los efectos mutagénicos y carcinogénicos, los que permitan establecer una mayor seguridad o disminuir el consumo de este producto por parte de la comunidad.

Los efectos a corto plazo, causados por la exposición a la fruta de noni, no son muy conocidos, y aún menos, los efectos a largo plazo; aunque se han realizado estudios del efecto tóxico de la planta *M. citrifolia* L, en diferentes sistemas biológicos (Glerup, 2001; Kaaber, 2002; Wang *et al*, 2002). Debido a la falta de información y evaluación de sus efectos es importante y se hace necesaria la evaluación citotóxica y genotóxica del noni, en células humanas (linfocitos de sangre periférica), para determinar si existe un riesgo en la salud humana.

Por lo tanto, en este trabajo se plantearon los siguientes interrogantes: ¿La exposición de linfocitos humanos al extracto acuoso de la fruta de *M. citrifolia* L. induce efecto citotóxico el cual se refleja en una alteración del índice mitótico?. ¿La exposición de linfocitos humanos al extracto acuoso de la fruta de *M. citrifolia* L. causa efectos genotóxicos, representado en un incremento en la frecuencia de alteraciones cromosómicas?

Se elaboró un extracto acuoso de noni para evaluación citotóxica (IM) y genotóxica (AC) mediante pruebas *in vitro* en linfocitos humanos de sangre periférica de una sola persona, incubando las células durante 72 h para la prueba de IM y 50 h para la prueba de AC.

El objeto de este estudio fue evaluar el efecto citotóxico y genotóxico *in vitro* del extracto acuoso de la fruta de *M. citrifolia* L (noni) en cultivos de linfocitos humanos, mediante las pruebas de índice mitótico y alteraciones cromosómicas, con el propósito de divulgar y alertar a la comunidad sobre los posibles efectos negativos que motiven a la reducción o autorregulación del consumo de este producto natural. Este proyecto se desarrolló en el laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca (Colombia).

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde la antigüedad, las plantas medicinales han desempeñado un papel decisivo en la salud de muchas culturas, a veces como única alternativa de supervivencia. Desde su origen, el hombre a través de procesos evolutivos de aprendizaje, logró comprender al mundo vegetal, de esta forma pudo detectar plantas que le servían para alimentarse y otras con las cuales podía curar sus males, este conocimiento ha pasado de generación en generación, sin ir más allá de un juicio empírico; siendo aún en la actualidad uno de los desafíos para la medicina.

Durante los últimos años, el tema de las plantas medicinales ha recobrado un nuevo auge, y cada vez son más las disciplinas científicas que se han dado a la tarea de estudiarlas y aplicarlas para el mundo moderno. En la actualidad la Organización Mundial de la Salud estima que se fabrican alrededor de 4.000 medicamentos de origen vegetal, lo que quiere decir en términos económicos, aproximadamente 19.5 billones de dólares de ventas en el mundo, que para el 2002 bordearon los 24 billones de dólares (Gruenwald, 2000).

A pesar de este auge, todavía no hay un marco conceptual y técnico que unifique criterios para el uso de las plantas medicinales; mientras los laboratorios farmacéuticos insisten en buscar recursos vegetales para el aislamiento de principios activos, aparece en el mercado cada vez con mayor fuerza la elaboración de productos conocidos como naturistas, es decir, preparaciones farmacéuticas de origen vegetal, que contienen toda la planta o parte de ella y no un principio activo; como es el caso de la *M. citrifolia* L, la cual se consume en diferentes presentaciones (cápsulas de la fruta y hojas, jugo fresco y fermentado de la fruta, aceite de las semillas, fruto seco, etc.) o productos expandidos por todo el mundo, consecuencia de su gran impacto en el mercado mundial, presentando US \$ 400 millones en ventas en el mundo para el 2002 (Scot, 2003).

La *M. citrifolia* L (noni), es una de las plantas más tradicionales usada como medicina popular, empleada desde hace más de 2000 años por los polinesios y durante las dos últimas décadas alrededor del mundo, esto se debe básicamente a su amplio espectro de aplicaciones en beneficio de la salud; el jugo de la fruta tiene una alta demanda en la medicina alternativa, para controlar diferentes enfermedades, tales como artritis, asma, diabetes, dolor de cabeza, úlceras gástricas, torceduras, enfermedades del corazón, senilidad, mala digestión, arterosclerosis, infecciones (Atkinson, 1956; Bushnell *et al*, 1950; Duncan *et al*, 1998; Leach *et al*, 1988), dolores musculares e inflamatorios (Li *et al*,

2003; Mckoy *et al*, 2002), hipertensión (Dang-Van, 1955), dificultades menstruales (Chearskul *et al*, 2004), SIDA (Umezawa, 1992) cáncer (Furusawa *et al*, 2003; Guangming *et al*, 2001; Hirazumi *et al*, 1994-96-99; Hiwasa *et al*, 1999; Wang y Su, 2001), efecto sedativo y analgésico (Younos *et al*, 1990; Wang *et al*, 2002), problemas de circulación sanguínea (Hornick *et al*, 2003), entre muchos otros.

A pesar de haberse realizado una gran cantidad de estudios referentes a las propiedades medicinales de la *M. citrifolia* L (noni), son muy pocos los estudios sobre citotoxicidad, solo se han reportado unas cuantas publicaciones en diferentes modelos biológicos: ratones (Glerup, 2001), cobayos (Kaaber, 2002) y líneas celulares de leucemia (Wang *et al*, 2002); y hasta el momento no existen estudios que evalúen su potencial efecto genotóxico en alguno de los modelos biológicos disponibles.

Por esta razón, en este trabajo se emplearon pruebas de citotoxicidad y genotoxicidad, a través de biomarcadores de daño genético, que permitieron identificar si existe interacción entre los componentes activos de la muestra compleja de *M. citrifolia* L (noni) y el ADN, para predecir el posible riesgo de producir efectos secundarios o desarrollar enfermedades; o si por el contrario, ayuda de cierta manera a menguar el daño del material genético.

Este estudio respondió a los siguientes interrogantes: ¿La exposición de linfocitos humanos al extracto acuoso de la fruta de *M. citrifolia* L. induce efecto citotóxico el cual se refleja en una alteración del índice mitótico?. ¿La exposición de linfocitos humanos al extracto acuoso de la fruta de *M. citrifolia* L. causa efectos genotóxicos, representado en un incremento en la frecuencia de alteraciones cromosómicas?

En consecuencia, en este trabajo se sometieron a prueba las siguientes hipótesis:

Si la exposición de linfocitos humanos al extracto acuoso de la fruta de *M. citrifolia* L, en cultivos *in vitro*, tiene efecto citotóxico, se espera que el índice mitótico (IM) difiera (H_i) del registrado en los linfocitos tratados con el solvente puro (Control), de lo contrario el IM será igual (H_0).

Si la exposición de linfocitos humanos al extracto acuoso de la fruta de *M. citrifolia* L, en cultivos *in vitro*, tiene efecto genotóxico, se espera que la frecuencia de alteraciones cromosómicas (AC), se incremente respecto a la frecuencia registrada en los linfocitos tratados con el solvente puro (Control) (H_i), de lo contrario esa frecuencia será igual e incluso menor (H_0).

2. JUSTIFICACIÓN

La *Morinda citrifolia* L, conocida comercialmente como noni, es uno de los recursos medicinales más significativo de la medicina natural actual, reconocido popularmente por sus beneficios en la salud humana. Estudios con diferentes partes del noni, principalmente la fruta, demuestran que este posee moderadas propiedades antioxidantes (Zin *et al*, 2002) y previene la formación de aductos entre agentes xenobióticos y el ADN (Wang y Su, 2001), entre otros; abriendo la posibilidad de realizar estudios toxicológicos, para entender si realmente el noni ejerce un posible efecto preventivo o, por el contrario, este pueda llegar a afectar el material genético.

El objetivo de la presente investigación fue someter a pruebas de citotoxicidad y genotoxicidad el extracto acuoso de *M. citrifolia* L. (noni), en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos, que permitan identificar la posible interacción de los metabolitos activos (o productos secundarios) de esta muestra compleja con estructuras celulares y/o el ADN de los linfocitos humanos, para producir un daño que se puede corregir por mecanismos de reparación o muerte celular o, de no ser reparada o reparada incorrectamente, pueden producir cambios (mutaciones) cuyo efecto biológico puede ser impredecible.

Para la valoración correcta de una planta medicinal, existe una ruta crítica, mediante evaluación genotóxica, la cual fue propuesta en Cuba por Miranda (1995); esta consta de diferentes pasos: selección de las plantas a investigar, identificación botánica correcta, características fitoquímicas mínimas, estudio farmacológico y estudio toxicológico, para decidir si se continúa o se abandona el uso tradicional. La Organización Mundial de la Salud, al igual que Cuba, ha insistido en que el uso de plantas medicinales puede ser de gran aplicación en la atención primaria de la salud, pero sobre bases científicas que sustenten seguridad, efectividad y calidad, requeridas para la administración en humanos (Guerrero, 1996).

Asimismo, los estudios toxicológicos ofrecen la posibilidad de realizar pruebas con linfocitos humanos, los cuales circulan en la sangre y linfa por largos periodos de tiempo en estado de latencia, acumulando daños por exposición a xenobióticos, característica que ha hecho de los linfocitos un sistema centinela muy útil tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*, debido a que permiten extrapolar un efecto que puede ocurrir, en otras células o tejidos de un individuo, como las células somáticas y/o células germinales. Por esto, los ensayos de citotoxicidad y genotoxicidad en linfocitos humanos, son una herramienta

importante en el análisis de un producto natural, que permita clasificarlo como viable o no para consumo humano, sin limitarse a los tradicionales pruebas de toxicidad aguda, subcrónica o crónica en animales.

En Colombia, no existe soporte alguno sobre evaluación citotóxica o genotóxica, que ayude a regular o definir si el noni se considera una planta medicinal que presente riesgo; y ese, fue particularmente el interés en este trabajo, en determinar si existe un riesgo para los consumidores de la fruta de *M. citrifolia* L. (noni), mediante la aplicación de pruebas de citotoxicidad y genotoxicidad, con el propósito de divulgar y alertar sobre los potenciales efectos negativos, que motiven a la reducción o autorregulación del consumo de estos productos.

La pertinencia de esta investigación se basa en que Colombia es un país muy arraigado a leyendas o tradiciones populares y se tiene una fe ciega en cualquier producto natural, sin asegurarse de leer las etiquetas del producto, en el cual deben mencionarse posibles efectos secundarios y contraindicaciones, y en el más común de los casos, sucede que no tienen ninguna información, lo que al consumidor poco le interesa; además, comúnmente se escucha que todo lo "natural" es por definición saludable, pues "si no cura no dañará". A pesar del consumo desmedido de productos naturales como en el caso del noni, existe un desconocimiento generalizado sobre sus efectos colaterales en la salud.

En el laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, existen recursos como personal, equipos, y protocolos de tratamientos validados para la prueba de citotoxicidad y genotoxicidad en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos, que garantizan la confiabilidad de los resultados e incrementan la validez del estudio.

3. ANTECEDENTES

El interés en la planta *M. citrifolia* L. (noni), proviene desde hace 2000 años, cuándo los habitantes de la Polinesia lo empleaban para remedios populares; desde entonces, se ha reportado que el noni posee un amplio rango de efectos terapéuticos: incluyendo efectos antibacteriales, antivirales, antihongos, antitumoral, antihelmíntico, analgésico, hipotensivo, etc. Para revelar el valor nutricional y medicinal de la planta de noni, a continuación se presenta un resumen de la evidencia científica que soporta algunas de estas características, teniendo en cuenta que no se encontró en las bases de datos consultadas (MEDLINE, HINARI, ELSEVIER, TOXNET) estudios acerca del efecto citotóxico y genotóxico del extracto acuoso del noni en cultivos de linfocitos humanos.

3.1 EFECTO ANTICANCERÍGENO

Un grupo de investigadores de la Universidad de Hawái, reportaron acerca de la actividad anticancerígena del precipitado alcohólico del jugo de la fruta de noni (noni-ppt) sobre el cáncer de pulmón, en ratones C57 B1/6. El noni-ppt, mostró una prolongación significativa, de la vida del ratón, hasta un 75% con el carcinoma de Lewis implantado, comparado con el grupo control. Se concluyó que el noni-ppt, al parecer, suprime el crecimiento del tumor indirectamente, por estimulación del sistema inmune (Hirazumi *et al*, 1994).

El noni-ppt se combinó con dosis subóptimas de los agentes quimioterapéuticos patrón, tales como adriamicina (Adria), cisplatino (CDDP), 5-fluorouracil (5-FU) y vincristina (VCR), sugiriendo importantes aplicaciones clínicas en el tratamiento del cáncer. Este resultado indica que el noni-ppt puede ejercer los efectos terapéuticos de drogas anticáncer (Hirazumi *et al*, 1999).

Para el año 2001 se estudió la hipótesis que *M. citrifolia* L posee un efecto preventivo en los estados de iniciación de la carcinogénesis. Resultados preliminares indican que el Jugo de Noni Tahitiano (TNJ) 10%, hecho de fruta de *M. citrifolia* L, fue capaz de prevenir la formación de aductos DNA-DMBA. Los resultados sugieren que la prevención de la formación de aductos carcinógenos-ADN y la actividad antioxidante de TNJ, puede contribuir al efecto preventivo de cáncer (Wang *et al*, 2001).

Se determinó la actividad antioxidante del extracto metanólico (EM) y etil-acetato (EA) del noni (hojas, frutas, raíz). El EM de la raíz de noni, mostró mayor actividad antioxidante que la fruta y hojas, mientras que el EA de todas las partes de la planta mostraron igual actividad antioxidante , comparable con el α - tocoferol (Zin *et al*, 2002).

Por lo antes expuesto, se puede concluir que entre los aspectos más significativos del fruto de noni están: estimular el sistema inmune, lo que provoca un retraso del crecimiento de los tumores por estimulación del sistema inmune e incremento de la función celular debido a la sinergia de los metabolitos, sugiriendo que existen aplicaciones en el tratamiento del cáncer.

3.2 EFECTO TÓXICO

En mayo de 2001, se da a conocer un estudio de toxicidad oral llevado a cabo durante 13 semanas en ratas. Ochenta ratas Sprague-Dawley fueron dispuestas en cuatro grupos; un grupo control y tres grupos dosis. La dosis diaria por gavage incluyó 0.4 mL/Kg. Todos los grupos no mostraron señales clínicas adversas (Glerup, 2001).

Se llevaron a cabo dos estudios usando conejillos de indias para evaluar el riesgo alergénico del TNJ. Los animales fueron observados por 24 h. No se presentó reacción alérgica al TNJ en este estudio (Kaaber, 2002).

En el 2002 el Dr. WANG y colaboradores, en su revisión sobre los avances en la investigación del noni, dan a conocer el resultado de su trabajo, concluyendo que existe un efecto citotóxico del TNJ, en cultivos de una línea de células de leucemia a diferentes concentraciones. Así mismo, da a conocer un estudio de la farmacocinética del noni en ratas hembras SD, después de la administración oral de una dosis de 1mL de puré de noni por 100 g de peso corporal. Un componente principal conocido como escopoletina, en noni, fue escogido como un marcador para monitoreo en el plasma y en diferentes órganos por análisis de HPLC. La máxima concentración en diferentes tejidos ocurrió, aproximadamente a las 3 h.

En explantes de la placenta humana, el jugo de fruta de noni al 5 % (v/v) inhibió el crecimiento y proliferación de nuevos vasos sanguíneos y capilares; a concentración 10 % (v/v) indujo degeneración y apoptosis en capilares y venas. En explantes de tumor de seno humano, tratadas con el jugo de fruta de noni al 10 % (v/v) se presentó un efecto inhibitor sobre el desarrollo de capilares y degeneración de vasos sanguíneos (Hornick *et al*, 2003).

En larvas de *Drosophila sechellia* se evaluó el efecto tóxico de la fruta madura de *M. citrifolia* L. El ácido octanoico, es responsable de la toxicidad general de la fruta, para todas las especies de *Drosophila*; solo *D. Sechellia* es la única especie resistente a este ácido. El ácido hexanoico causó coma reversible, pero no-mortalidad, mientras que el ácido decanoico es inactivo. Una mezcla de estos tres ácidos, en proporciones similares a las encontradas en la fruta, imita los efectos de la fruta madura de *M. citrifolia* L (Farine *et al*, 1996).

La concentración de potasio en un jugo de noni equivale a $\cong 56.3$ mEq/L; por lo tanto, no es indicado para pacientes con alguna enfermedad de tipo renal (hipercalcemia) (Mueller *et al*, 2000).

En cuanto al efecto tóxico se puede señalar que la información científica disponible presenta resultados contradictorios, lo que no permite establecer una conclusión final acerca de la toxicidad del jugo de noni, debido a que los estudios farmacológicos y las investigaciones toxicológicas, que respaldan la seguridad, son insuficientes.

3.3 EFECTO EN MICROORGANISMOS

El extracto de la fruta madura de noni, exhibe moderadas propiedades antibacteriales contra *Ps. aeruginosa*, *M. pyrogenes* y *E. Coli*, *Salmonella typhosa*, *Salmonella montevideo*, *Salmonella schottmuelleri*, *Shigella paradys*, BH y *Shigella paradys*. (Bushnell *et al*, 1950).

Los componentes acubin, L-asperulosido y alizarin en la fruta de noni, así como las antraquinonas en raíces de noni, probaron ser agentes antibacteriales. Estos componentes, mostraron acabar con infecciones bacterianas tales como: *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus morgaii*, *Staphylococcus aureus*, *Baciillis subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, y *Shigela*. Estos elementos antibacteriales del noni, se utilizan para el tratamiento de infecciones en la piel, escalofríos, fiebre y otros problemas de salud causados por bacterias (Atkinson, 1956).

El extracto de acetona, obtenido de *Cycas circinalis*, *Morinda citrifolia* L, *Bridelia penangiana*, *Tridax Procumbens*, *Hibiscus tiliaceus* e *Hypericum papuanun*, presentan actividad antibacterial. El amplio uso medicinal de estas plantas sugiere que ellas contienen sustancias farmacológicamente activas y en métodos de extracción alternativos, pueden ser utilizados para encontrar más componentes bioactivos en las plantas, con el propósito de desarrollar nuevas medicinas (Leach *et al*, 1988).

La escopoletina, un promotor natural del noni, inhibe la actividad de *E. coli*. El noni también previene contra las úlceras estomacales, por la inhibición de la bacteria *Helicobacter pylori* (Duncan *et al*, 1998).

En el Congreso Internacional de Química, de la Sociedad Base del Pacífico sede en Honolulu, realizado en el año 2000, se reportó que el noni es responsable de matar a *Mycobacterium tuberculosis*. Una concentración de extractos de hojas de noni, mató al 89% de la bacteria en un ensayo *in vitro*, casi tan efectivo como la droga anti-tuberculosis Rifampin, la cual presenta una tasa de inhibición del 97% a concentración estándar (ACS, 2000).

El extracto crudo etanólico y la fracción hexano de *M. citrifolia* L, mostraron una alta actividad antitubercular. Los principales constituyentes de la fracción hexano son E-fitol, cicloartenol, estigmasterol, beta-sitosterol, campesta-5,7,22-trien-3-beta-ol y el quetosteroides estigmasta-4-en-3-one y estigmasta-4-22-dien-3-one (Saludes *et al*, 2002).

La evidencia científica, permite concluir que la *Morinda citrifolia* L, posee moderada actividad antibacteriana, antiviral, antifúngica y antihelmíntica; lo que puede convertirlo en un recurso complementario en el tratamiento de enfermedades infecciosas.

3.4 EFECTO ANALGÉSICO

Se evaluó el efecto sedativo y analgésico de diferentes extractos de *M. citrifolia* L. Los resultados indican que se presentó una relación significativa entre la dosis y la actividad analgésica en los ratones tratados. Se estableció que esto “valida las propiedades analgésicas tradicionales de esta planta.” La eficacia analgésica del extracto del noni, es 75% tan fuerte como la morfina, pero libre del efecto adictivo (Younos *et al*, 1990).

En un trabajo desarrollado en cooperación entre el Colegio de Medicina de la Universidad de Illinois y la Universidad Médica de Henan, se examinaron las propiedades analgésicas del TNJ en modelos animales. Emplearon dosis de TNJ de 5, 10 y 20 %. El efecto analgésico del grupo con TNJ es estadísticamente significativo, comparado con el grupo control (Wang *et al*, 2002).

Se evaluó la capacidad de *M. citrifolia* L para restaurar el ciclo menstrual y aliviar los síntomas. Se empleó tejido prepubertal de ratón, tratado subcutáneamente con diferentes concentraciones de la planta, comparado con ratones tratados con 17-β estradiol. La potencia estrogénica relativa del extracto alcohólico y acuoso de *M. citrifolia* L fue 1:1.000

y 1:10.000 respectivamente, indicando que la actividad estrogénica se presenta solo a bajas dosis (Chearskul *et al*, 2004).

A pesar de la valiosa evidencia científica, aunque escasa; se puede concluir que el jugo de noni posee cierta propiedad analgésica, la cual amerita continuar con este tipo de estudios.

3.5 COMPUESTOS AISLADOS DEL NONI CON EFECTOS BIOLÓGICOS

Se encontró un compuesto aislado de raíces de noni, llamado 1-metoxi-2-formil-3-hidroxi-antraquinona, que suprime el efecto citopático del VIH, infectando células MT-4, sin inhibición del crecimiento celular (Umezawa, 1992).

En estudios con el damnacantal, una sustancia aislada de la raíz de *M. citrifolia* L, se encontró que inhibe la función del oncogén ras (Hiramatsu *et al*, 1993).

Dos conocidos glucósidos y un nuevo éster de ácido graso trisacárido, se aislaron de la fracción soluble del n-butanol de la *M. citrifolia* L (noni). El éster, tiene una estructura química 2,6-di-O-(beta-D-glucopiranosil)-1-O-octanoil-beta-D-glucopiranososa. Los nuevos compuestos fueron identificados como rutin y ácido asperulosídico (Wang *et al*, 1999).

En investigaciones recientes se aislaron tres nuevos glucósidos de la fruta de noni. Sus estructuras fueron determinadas así: 6-O-(beta-D-glucopiranosil)-1-O-octanoil-beta-D-glucopiranososa, 6-O-(beta-D-glucopiranosil)-1-O-hexanoil-beta-D glucopiranososa, 3-metilbut-3-enil 6-O-beta-D-glucopiranosil-beta-D-glucopiranosido, usando el método de resonancia magnética nuclear (Wang *et al*, 2000).

Se han caracterizado dos nuevos glucósidos 6-O-(beta-D-glucopiranosil)- 1-O-octanoil-beta-D-glucopiranososa y ácido asperulosídico, extraídos del jugo de la fruta de noni, los cuales fueron usados para examinar sus efectos sobre 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF), induciendo transactivación AP-1 y transformación celular en células epidérmicas JB6 de ratón. El resultado indicó que ambos compuestos fueron efectivos en la supresión de TPA o EGF, induciendo transformación celular y actividad asociada a AP-1 (Guangming *et al*, 2001)

Sang *et al*, en 2001, aislaron un nuevo iridoide inhibidor de la proteína-1 (AP-1) de las hojas de *M. citrifolia* L., llamado citrifolinosido. Posteriormente se aislaron dos nuevos iridoideos de las hojas de *M. citrifolia* L., llamados asperuloside y ácido asperulosídico, también lograron determinar un nuevo iridoide glicosido y 5 glucósidos flavonol conocidos.

Todos estos compuestos muestran la formación de radicales libres a una concentración de 30 μ M. De la misma manera en el 2003, aislaron de las hojas de noni un nuevo dímero de iridoide unidos por un raro grupo éter, que en cultivo celulares, inhiben la actividad de la proteína-1 inducida por UVB.

Dos nuevos componentes han sido aislados de la planta de noni. Un nuevo benzofuran, bis-nor-isoprenoide y blumenol C. Sus estructuras son 5-benzofuran carboxílico ácido-6-formil metil ester y 4-(3'(R)-hidroxibutil)-3,5,5,trimetil-ciclohexano-2-en-1-one, respectivamente (Siddiqui *et al*, 2003).

En cultivos celulares de *M. citrifolia* L, se evaluó la biosíntesis de antraquinona (metabolito secundario), determinándose la presencia de Isocrorismato sintasa, enzima involucrada en dicha biosíntesis, que actúa por una ruta secundaria específica (Stalman *et al*, 2003).

Se aisló una sustancia rica en un polisacárido, llamada noni-ppt, con efecto inmunomodulador del jugo de la fruta de *M. citrifolia* L y se encontró que tiene propiedades terapéuticas y profilácticas en la sensibilidad inmunomoduladora para sarcomas en 180 clases de tumores. (Furusawa *et al*, 2003).

En un estudio sobre el damnacantal, un compuesto antraquinona aislado de la raíz de noni, se encontró que posee una potente actividad inhibidora de la Tirosin Kinasa, tales como Lck, Src, Lyn, y receptores EGF. En este estudio se examinó los efectos del damnacantal sobre la apoptosis inducida por rayos ultravioleta en células humanas Uvr-1, resistentes a la luz ultravioleta. Consecuentemente, la luz ultravioleta induce un incremento en la señal regulada por kinasas extracelulares fosforiladas y proteínas kinasas, activadas por el estrés. Después del pretratamiento con damnacantal, este tuvo un efecto estimulante sobre la apoptosis, inducida por ultravioleta (Hiwasa *et al*, 1999).

El estudio de compuestos aislados o principios activos puros extraídos de diferentes partes de la planta, aunque han demostrado tener efecto biológico, no permiten asegurar que el extracto crudo produzca la misma actividad por las múltiples interacciones de sus numerosos componentes; sin embargo, el extracto crudo puede presentar actividad biológica por acción de un efecto sinérgico de los componentes presentes en el fruto, y no con sus compuestos aislados.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto citotóxico y genotóxico *in vitro*, del extracto acuoso de la fruta de *Morinda citrifolia* L (noni), en cultivo de linfocitos humanos.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Identificar el efecto citotóxico *in vitro* del extracto acuoso de la fruta de *Morinda citrifolia* L (noni), mediante el índice mitótico (IM), en cultivos de linfocitos humanos.

Determinar el efecto genotóxico *in vitro* del extracto acuoso de la fruta de *Morinda citrifolia* L (noni), mediante el biomarcador de alteraciones cromosómicas (ACs), en cultivos de linfocitos humanos.

5. MARCO TEÓRICO

El uso de las plantas medicinales en Colombia, es uno de los principales recursos que la población esta empleando para prevenir o aliviar numerosas dolencias y enfermedades. A pesar de ser el siglo en el que la tecnología esta influenciando la medicina y la investigación, mediante el desarrollo de nuevas técnicas y estrategias para el control de enfermedades, se esta presentado un acrecentado e inesperado uso de la medicina naturista, la necesidad de aprovechar y dinamizar el conocimiento de las plantas medicinales y la importancia de su investigación, para de este modo llegar a entender, refutar o admitir las propiedades de su aporte medicinal.

5.1 CARACTERÍSTICAS DE LA PLANTA

5.1.1 Clasificación Taxonómica

Reino: vegetal

Clase: dicotiledónea

Orden: rubiales

Familia: rubiaceae

Subfamilia: rubioideae

Nombre científico: *Morinda citrifolia* L.

Figura 1. Fruto de noni en diferentes estados de crecimiento y maduración

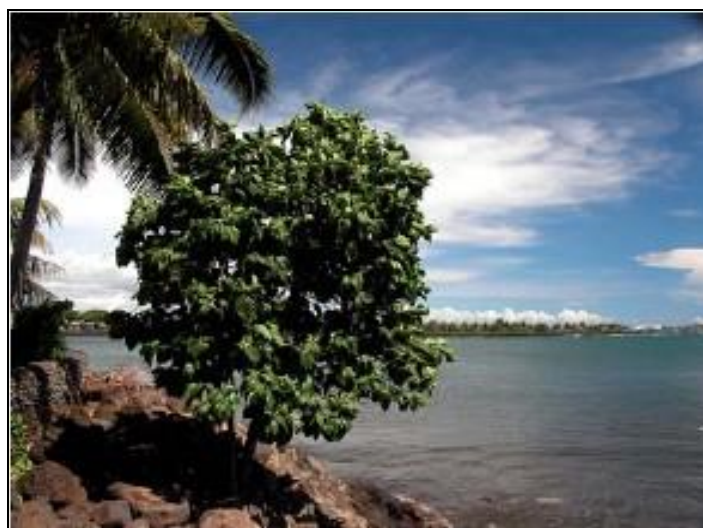


Scot, 2003

5.1.2 Nombres comunes. El noni, debido a su gran distribución en el globo, ha adquirido diferentes nombres como: canario de monte (Australia), fromager, murier indien (Francés), mora de la India (Inglés, español), lada (Guam, Norte Marianas), kikiri (Islas Solomon), kura (Fiji), nen, nin (Islas Marshall), non (Kiribati), noni (Hawái), nono (Tahití), nonu, nonu atoni, gogu atoni (Samoa, Tonga), weipwul (Pohnpei).

5.1.3 Descripción y distribución. El noni es un arbusto verde, con una altura aproximada de 6m y un diámetro de 13cm; la savia es amarilla-café y de textura blanda; la corteza es gris o café, de suave a ligeramente áspera; las ramas son de color verde claro y de forma cuadrangular; las hojas son opuestas y están unidas por pecíolos succulentos de 1 a 2 cm de largo, son de color verde oscuro y lustrosas, ovaladas o elípticas, de 14 a 30 cm de longitud por 8 a 18 cm de ancho y tiene una venación prominente. Las flores son tubulares de color blanco, tienen 5 pétalos formando una estructura tubular de aproximadamente 6 mm de longitud; el fruto tiene un color que varía del verdoso-blanco al amarillo pálido (figura 1) de forma ovoide o sincarpo de 5 a 7 cm de longitud, poseen un olor desagradable semejante al queso y contienen semillas en promedio de 4 mm de longitud (Howard, 1989; Liogier, 1997; Little y Wadsworth, 1964).

Figura 2. Arbusto de noni a nivel del mar.



Scot, 2003

Esta especie tolera suelos con gran contenido de sales, posee tolerancia media a la sombra, crece bajo el dosel de los bosques así como en campo abierto, sobre la orilla de los mangles, en los límites de los bosques y sobre la parte de la playa donde se encuentra vegetación, razón por la cual el noni crece en todo tipo de suelos, desde los arenosos hasta

los altamente rocosos, desde el nivel del mar hasta pasados los 800 metros (Stevens *et al*, 2001) (Fig. 2).

La distribución de *M. citrifolia* L es pantropical, su distribución Indo-Pacífica incluye el este de la Polinesia (Hawái, Islas Line, Cook etc.), Melanesia (Fiji, Vanuatu, Nueva Guinea, Nueva Caledonia, y las Isla Salomon), oeste de la Polinesia (Samoa, Tonga, Futuna, etc.), la Micronesia (Phonpei, Guam, Palau, las islas Marsharll, y las Marianas Septentrional), Indonesia, Australia, y el sur este de Asia. El noni ha sido naturalizado en las costas de América Central (de México a Panamá), Sur América (Venezuela, Colombia y Surinam), islas del oeste de la India, las Bahamas, Bermuda, los muelles de la Florida y partes de África (Scot, 2003).

5.1.4 Beneficios. El jugo de la fruta de noni es la forma más consumida en Indonesia, Australia, Islas del Pacífico, en Norte y Sudamérica, (aunque a las hojas, corteza y la raíz también se le atribuyen propiedades medicinales), para tratar: adicciones, alergias, asma, problemas del cerebro, enfermedades cardiovasculares, sensibilidad a químicos, fatiga crónica, endometriosis, fibromialgia, gota, deficiencia de sistema inmune, inflamaciones, retraso, esclerosis múltiple, dolor muscular y de las articulaciones, polio, artritis, diabetes, heridas en la piel, senilidad, depresión, diarrea, arteriosclerosis, cáncer, SIDA, infecciones de la piel y males respiratorios, etc.

De las semillas de noni trituradas se obtiene un aceite de fuerte olor, que se emplea como insecticida o repelente; trituradas se emplean como laxantes. Las hojas se aprovechan para el dolor estomacal, fracturas, diabetes, pérdida del apetito, problemas del tracto urinario, cólicos, hernias y deficiencia de la vitamina A; preparadas en forma de té se consumen como tratamiento para la malaria, la fiebre y como analgésico; en cataplasma se emplea para la fiebre.

Se consume la fruta fresca contra los parásitos intestinales, para tratar las heridas y cortes, abscesos, infecciones de la encía, de la boca y dolor de dientes; en forma de cataplasma se usa contra el carbúnculo y quemaduras; del amasijo se acostumbra hacer gárgaras para problemas en la faringe; los aceites de la fruta alivian úlceras estomacales. La cocción de la corteza del tallo se utiliza contra la ictericia; el extracto de las hojas, fruto y corteza se emplea como antihipertensivo; el cataplasma de la fruta o de las hojas se usa en la tuberculosis, contusiones fuertes, reumatismo y torceduras; todas las partes de la planta como laxante.

Se han identificado algunos de los principales componentes de la planta de noni (Tabla 1), los cuales pueden ser responsables de estas propiedades, entre ellos están: la escopoletina,

ácido octoanoico, potasio, vitamina C, terpenoides, alcaloides, antraquinonas (nordamnacantal, morindona, rubiadina, y rubiadina-1-metileter, glicosido antraquinona), β -sitosterol, caroteno, vitamina A, flavon glicosidos, ácido linoleico, alizarin, amino ácidos, acubin, *L*-asperulosido, ácido caproico, ácido caprílico, ácido ursólico, rutin, y una proxeronina (Heinicke, 1985; Levand y Larson, 1979). Por otro parte, se ha realizado un análisis de los componentes nutricionales principales de la fruta de noni, entre los más abundantes están los carbohidratos y la fibra dietética.

5.2 BIOMARCADORES

Los biomarcadores han sido empleados desde hace muchos años para estudiar las enfermedades. Los marcadores biológicos, en el contexto de la salud ambiental, son indicadores de eventos (alteraciones detectables) en sistemas o muestras biológicas. Los biomarcadores han sido desarrollados para evaluar exposición, efectos tempranos y susceptibilidad de los individuos y poblaciones en contacto con agentes tóxicos, que permiten predecir el riesgo a desarrollar enfermedades e implementar programas preventivos.

Los biomarcadores se utilizan para detectar la exposición a sustancias potencialmente genotóxicas, determinar las consecuencias biológicas de la exposición, detectar los estados iniciales e intermedios de un proceso patológico e identificar en una población a los individuos sensibles con el propósito de fundamentar políticas de prevención contra riesgos de salud. En el diseño de una rutina de muestreo es necesario considerar la especificidad y sensibilidad del biomarcador, la dificultad de muestreo, la cinética de la formación del biomarcador y estabilidad del biomarcador. Los biomarcadores más útiles son los que se pueden obtener de forma menos invasiva, por eso se prefieren los que se analizan en sangre periférica (Kopplin, 2001).

5.2.1 Biomarcadores de Efectos tempranos. Son cambios cualitativos o cuantitativos (fisiológicos, bioquímicos) identificados en los seres vivos, predictivos de potenciales problemas de salud asociados con la exposición a factores ambientales como mutágenos y/o carcinógenos. Estos efectos pueden ser medidos en el tejido blanco o en tejidos de fácil obtención, como por ejemplo en células de sangre periférica. Entre los biomarcadores de efecto se incluyen mutación puntual de un gen, o daños como alteraciones cromosómicas (AC), micronúcleos (MN). Los factores, como el medio ambiente, estilo de vida, los hábitos de fumar cigarrillo, ingesta de alcohol, exposición a radiaciones, drogas e infecciones virales, pueden afectar los resultados de estos ensayos. Estos biomarcadores

permiten obtener datos de gran valor que alerten sobre problemas potenciales de salud por la exposición ambiental. (Albertini y O’neill, 1995).

Tabla 1. Químicos constituyentes del noni (*Morinda citrifolia* L)

Órganos planta de Noni	Componente(s)	Efecto propuesto o documentado de los compuestos	Discusión y Notas
Fruto y Jugo	<i>Alcaloides</i> (xeronina)	En teoría, la xeronina incrementa la actividad enzimática y estructura proteínica	Los efectos propuestos del alcaloide xeronina, y/o el compuesto pre-xeronina, no han sido comprobados.
	<i>Polisacáridos</i> (ácido glucurónico; galactosa; arabinosa; ramosa; glicosidos; ester de ácido graso trisacarido)	Immuno-estimulador; immuno-modulador; anti-bacterial; anti-tumor; anti-cáncer.	Un área promisoría para la investigación y un grupo de compuestos beneficiosos.
	<i>Escopoletina</i>	Vasodilatador e hipotensivo; anti-bacterial y anti-fungal; anti-inflamatorio; analgésico; inhibidor de histamina; condiciones artríticas; alergias; somnífero; dolor de cabeza asociado a migraña; depresión; enfermedad de Alzheimer.	Aplicaciones amplias
	<i>Vitaminas y Minerales:</i> magnesio; hierro; potasio; selenio; zinc; cobre; sulfuro; ácido ascórbico.	Los efectos médicos positivos de las vitaminas y minerales del jugo de noni están ampliamente documentados.	El jugo de Noni es una excelente recurso de vitamina C.
Follaje	<i>Antraquinonas</i> (damnacantal)	Efectos antisépticos y antibacteriales en tracto digestivo (<i>Staphylococcus</i> , <i>Shingela</i> , <i>Salmonella</i>).	Aplicaciones amplias
	<i>Glicosidos</i> (flavonol glicosido; iridoide glicosido, “citrifolinosido”)	Efectos Anti-cáncer	Descubrimiento reportado en 2001.
Raíces	<i>Antraquinonas</i> (damnacantal)	Inhibe la formación de carcinoma de pulmón en ratón.	Investigación de la Universidad de Hawai en Manoa
	<i>Morindin y Morindona</i>	Tintes amarillos y colorantes rojos usados para teñir ropa; anti-bacterial.	Significante Culturalmente

Scot C. N, Ph. D. <http://www.ctahr.hawaii.edu/noni/>.

5.3 CITOTOXICIDAD

La citotoxicidad es una de las pruebas más empleadas para identificar la capacidad de un agente físico, químico o biológico para trastornar la morfología o fisiología celular, logrando alterar el ciclo celular y desencadenando procesos que pueden finalizar en la muerte celular. La evaluación citotóxica, en este trabajo, se determinó mediante la técnica de índice mitótico.

5.3.1 Índice Mitótico (IM). En los estudios citogenéticos, el IM suele incrementarse utilizando compuestos antimitóticos o venenos del huso acromático, cuya acción impide el ensamble de las fibras del huso, indispensable para que los cromosomas de las células en división migren hacia los polos y se distribuyan a las células hijas (Manfriedi *et al*, 1986).

El índice mitótico permite determinar la proporción de células que se encuentra en el estado de mitosis (División celular). En consecuencia, el resultado de esta prueba permite comparar los datos obtenidos en el grupo experimental versus el control, para establecer si la sustancia en estudio es ciclo activa (Inhibe o acelera el ciclo celular).

$$\text{IM} = \frac{\text{Número de células en metafase}}{\text{Número total de células analizadas}} \times 100$$

5.4 GENOTOXICIDAD

Las pruebas de genotoxicidad permiten identificar la capacidad que posee un agente biológico, químico o físico para producir efectos tóxicos, letales o heredables al material genético (nuclear o extranuclear) en células somáticas y germinales. La evaluación de la genotoxicidad por medio de las alteraciones cromosómicas (AC) en linfocitos de sangre periférica es un ensayo citogenético lo bastante sensible para detectar exposición a mutágenos y carcinógenos. Su eficacia está confirmada por un vasto número de estudios de biomonitoreo en poblaciones expuestas a agentes genotóxicos (Bonassi *et al*, 1995).

Una relación entre daño cromosómico y desarrollo del cáncer ha sido sugerida desde el inicio del siglo XX, pero solo desde 1960 se han reunido extensos datos sobre la frecuencia de alteraciones cromosómicas en poblaciones humanas expuestas a conocidos o supuestos carcinógenos y/o genotóxicos. La idea de una asociación causal entre alteraciones

cromosómicas y riesgo de cáncer esta basada sobre el concepto que el daño genético en linfocitos refleja daño similar en células que sufren carcinogénesis (Bonassi *et al*, 2000).

Las alteraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica, así como otros biomarcadores citogenéticos tal como intercambios de cromátidas hermanas y micronúcleos, han sido usadas durante un tiempo relativamente largo en trabajos ambientales por exposición a bajas dosis de mutágenos o carcinógenos. Sin duda, estos marcadores citogenéticos pueden servir como biomarcadores para mínimas exposiciones a genotóxicos en el medioambiente. Frecuentemente ha sido postulado que la prueba de AC sirve para predecir riesgo de cáncer (Hagmar *et al*, 1998).

5.4.1 Alteraciones Cromosómicas (ACs). Las alteraciones cromosómicas son cambios en la estructura o en el número de cromosomas; se clasifican en: alteración cromosómica (afecta ambas cromátidas, chrb), alteración cromatídica (afecta solamente una cromátida, chtb), deleciones, inversiones y figuras trirradiales, tetrarradiales generadas a partir de traslocaciones; con diferentes mecanismos de formación. Las ACs permiten determinar daños a nivel cromosómico, puesto que son originadas por lesiones en el ADN por agentes externos, expresadas debido a la no reparación, reparaciones incorrectas o por errores en la replicación; por lo tanto, este biomarcador representa daños genéticos de gran magnitud, monitoreando las anomalías que se presentan en los cromosomas. Se ha relacionado fuertemente las ACs y serias consecuencias biológicas, ya que se han localizado en células cancerosas, pérdidas fetales y algunos tipos de enfermedades genéticas (Jacobs *et al*, 1974; Rowley, 1986; Yamamoto *et al*, 1979).

Las alteraciones cromosómicas son sumamente valiosas, porque son indicadores altamente relevantes para la detección de carcinógenos potenciales (Swierenga *et al*, 1991). Las alteraciones cromosómicas son cambios en la estructura del cromosoma, generados de un quiebre en la doble cadena del ADN (DSB = Double Strand Break) o intercambio de material cromosómico (Pfeiffer *et al*, 2000), que pueden también formarse espontáneamente por eventos celulares, tales como la acción topoisomerasa, replicación del ADN, elementos transponibles, sitios frágiles, reparación por escisión de daño oxidativo al ADN, sitio Apurínico y Apirimidínico y productos de deaminación.

Las alteraciones cromosómicas se originan de quiebres en la doble cadena del ADN no replicado en fase G0 y G1 del ciclo celular; mientras que los quiebres generados en la fase S tardía y G2 originan alteraciones cromatídicas. Las sustancias genotóxicas dependientes de la fase S forman en las células alteraciones cromatídicas. De este modo, las alteraciones cromosómicas y las alteraciones cromatídicas tienen diferentes mecanismos de formación,

resultado de diferentes clases de lesiones al ADN, inducidas por diferentes tipos de clastógenos. Por lo tanto, la idea de que las alteraciones cromosómicas sean predictivas de cáncer, se debe tanto a las alteraciones tipo cromosómica y/o cromatídica, proporcionando indicaciones importantes de cómo las alteraciones cromosómicas se relacionan con el origen del cáncer (Hagmar *et al*, 2004). La mayoría de las ACs observadas en las células son letales, pero hay muchas alteraciones que son viables y pueden causar efectos genéticos en células somáticas o reproductivas (Swierenga *et al*, 1991).

5.5 LINFOCITOS HUMANOS DE SANGRE PERIFÉRICA

Los linfocitos humanos por ser un tejido accesible en el cual el daño genético es medible, constituye uno de los modelos biológicos más empleados para realizar monitoreos y estudios de riesgo por exposición a factores externos. Los linfocitos circulan en la sangre y linfa por largos periodos de tiempo (meses y años), se encuentran en estado de latencia o de no-división G₀, logrando acumular así daños por exposición a xenobióticos. Los linfocitos son inducidos a continuar el ciclo celular por acción de un mitógeno (Fitohemaglutinina PHA), entrando en la etapa de división G₁ y posteriores. Estas características han hecho de los linfocitos un sistema centinela muy útil para el estudio del ciclo de división celular y replicación del ADN, permitiendo investigar el efecto que pueden ejercer tóxicos ambientales sobre el material genético y su acción sobre el ciclo celular, tanto *in vivo* como *in vitro* (Hoyos y Carvajal, 2002).

Los ensayos citogenéticos en Linfocitos de Sangre Periférica (LSP) han sido ampliamente usados durante varias décadas para medir la exposición humana a agentes genotóxicos. La base conceptual para este acercamiento ha sido la hipótesis de que la magnitud del daño genético en LSP refleja eventos críticos para procesos de carcinogénesis en tejidos blanco. El valor predictivo de esta prueba para riesgo de cáncer ha sido evaluado en dos estudios cohorte de incidencia de cáncer y mortalidad, en Italia y cinco países del Norte de Europa (Lando *et al*, 1998).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 PREPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Morinda citrifolia* L. (noni)

El método empleado en la obtención del extracto acuoso para este trabajo, fue una modificación del procedimiento empleado por McKoy y colaboradores en el 2002. Las frutas maduras de la *M. citrifolia* L (noni), se cortan en pequeños trozos y se procesan en agua destilada (aprox. 100 ml), del cual se obtiene un puré; luego se hacen las diluciones necesarias (se realizaron dos diluciones de 1/5 y 1/10 que se almacenaron en frío por 24 horas), las diluciones se centrifugan a 1000 rpm (precipitar restos de semillas), se colecta el líquido sobrenadante y se procede a pasar por filtro Watman (2 veces), luego por filtro microporo 0.45 μm , y finalmente, en cámara de flujo laminar, se esteriliza el líquido con filtro microporo 0.22 μm .

Para determinar la concentración de las diluciones del extracto acuoso de la fruta de noni, se toma en un recipiente de vidrio previamente pesado y limpio un volumen exacto del extracto (5 mL), y se pesa junto con el recipiente, luego a temperatura moderada (30°C), se evapora el líquido, subsiguientemente se pesa la sustancia que queda después de la evaporación y, por diferencia de peso, se determina la concentración. Se obtuvo una concentración de 10.36 mg/mL y 4.38 mg/mL para las diluciones de 1/5 y 1/10, respectivamente. Finalmente se realizaron ocho diluciones de los extractos obtenidos, para su evaluación en la prueba de citotoxicidad (tabla 2).

Tabla 2. Concentraciones del extracto acuoso de la fruta noni, incluido el control negativo.

Solución de trabajo mg/mL	Concentración final en medio de cultivo mg/mL
10.36	0,4144
8.29	0,332
6.63	0,265
5.30	0,212
4.24	0,17
4.38	0,0876
2.19	0,0438
1.095	0,0219
Control negativo (Agua)	0

6.2 CULTIVO Y COSECHA DE LINFOCITOS

La evaluación citotóxica y genotóxica del extracto acuoso de la fruta de *M. citrifolia* L. (noni) se realizó en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos, obtenidos de sangre periférica humana. La muestra de sangre se tomó del antebrazo, siempre de la misma persona, la cual presentaba buenas condiciones de salud, no consumía bebidas alcohólicas o cigarrillo, esto con el fin de disminuir posibles sesgos en los resultados. La cantidad de sangre empleada fue suficiente para realizar cultivos de 5 mL.

6.2.1 Protocolo de siembra: La siembra de linfocitos se realiza bajo condiciones de esterilidad en cámara de flujo laminar, se emplean tubos estériles desechables de 15 mL que contengan 4.5 mL de medio RPMI 1640 suplementado con estreptomicina (100 µg/mL) y penicilina (100 U/mL), suero fetal bovino (10%) y l-glutamina (2 mM); posteriormente se agrega 0.5 ml de sangre heparinizada a cada tubo de cultivo, por último 0.1 mL de fitohemaglutinina (10 µm/mL). Los tubos de cultivo se colocan a incubar por 72 horas para la evaluación citotóxica (índice mitótico) y por 48 horas para la prueba de genotoxicidad (alteraciones cromosómicas), a una temperatura de 37°C.

Aproximadamente a las 24 h de iniciada la siembra, se adicionan las diferentes concentraciones del extracto acuoso de noni y el control negativo (solvente); se continúa con el tiempo de incubación. Dos horas antes de la cosecha se agrega 0.1 mL de colcemid (10 µg/mL; SIGMA); a las 72 h para IM y 50 h para AC, se realizó la cosecha de las células (Hoyos y Carvajal, 2002).

6.2.2 Protocolo de cosecha y tinción: Trascorridas las 72 hrs. (para IM) o 50 hrs. (para AC) desde la siembra, se centrifugan los tubos de cultivo a 1000 rpm por 5 minutos, luego se remueve el sobrenadante con cuidado de no perturbar el botón celular y se resuspende. Se agrega lentamente 6 mL de solución hipotónica KCl 0.075 M precalentada (37°C). Las células se resuspenden con pipeta pasteur con cuidado, y se incuban a 37°C por 30 minutos. Trascorrido los 30 minutos, se realiza una prefijación de las células agregando 1mL de fijador carnoy (metanol: ácido acético glacial, 3:1) con fuerza. Se mezcla y se deja reposar por un minuto. Se centrifuga a 1000 rpm por 5 minutos, se remueve el sobrenadante y se resuspende el botón celular. La fijación se realiza agregando 5 mL de fijador y refrigerando por 20 minutos. La suspensión celular se centrifuga (1500 rpm/5min.), se remueve el sobrenadante y se resuspende. Este paso se repite dos veces. En la última fijación se deja suspensión celular suficiente para gotear los portaobjetos.

Para la coloración de los portaobjetos se emplea tinción directa, así: para la obtención de extendidos celulares y tinción, se toma un portaobjetos limpio, frío y humedecido en agua destilada o ácido acético al 60% refrigerado. Se extienden de 3 a 5 gotas de la suspensión celular fijada, con pipeta Pasteur. Los portaobjetos se dejan secar a temperatura ambiente o en una plancha caliente (37°C). Después de tres días de permitir una buena adherencia del material a la placa, se tiñen con Giemsa al 10% durante 5 a 10 min.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL

7.1 EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO MEDIANTE LA PRUEBA DE ÍNDICE MITÓTICO (IM)

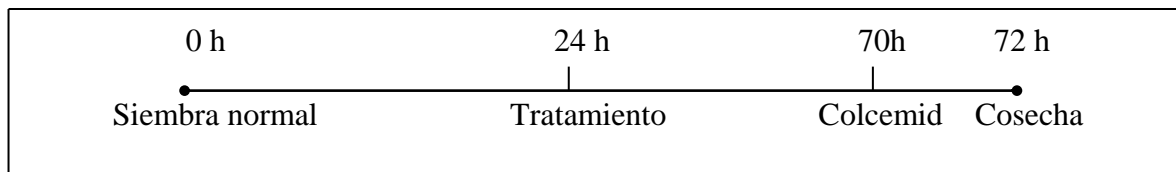
Las ocho concentraciones del extracto acuoso de la fruta de *M. citrifolia* L y el grupo control negativo (solvente), se sometieron a la prueba de índice mitótico (IM) con el fin de evaluar citotoxicidad y determinar las concentraciones alta, media y baja para la prueba de genotoxicidad. Para la determinación de las concentraciones de trabajo para la prueba de genotoxicidad, se procedió de la siguiente manera:

ALTA: la concentración que disminuyó el IM aproximadamente a un 20%, respecto al grupo control,

MEDIA: concentración que disminuyó el IM en un 50% respecto al control,

BAJA: concentración que presentó una disminución no significativa respecto al control.

Figura 3. Protocolo de siembra de linfocitos para la prueba de índice mitótico (IM).



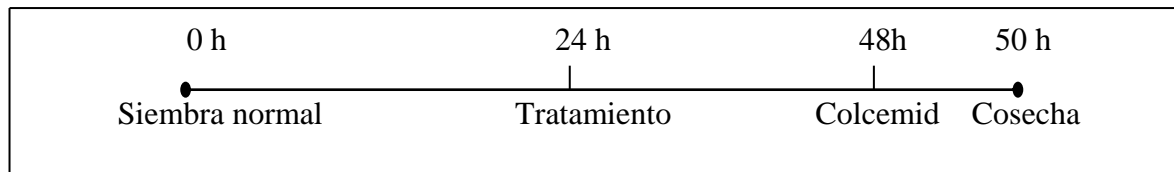
Se realizaron dos cultivos por concentración (incluido el control negativo), de cada cultivo se gotearon cuatro portaobjetos (dos por tubo). El IM se calculó mediante la proporción de metafases en 4000 células/concentración. Los portaobjetos con los extendidos celulares de cada concentración, se analizan al microscopio óptico con objetivo de 40X. (aumento total 400 veces). Este experimento se repitió tres veces. En esta investigación el dato se expresa como el número de metafases registradas en 4000 células (no. metafases/4000 células).

Los datos obtenidos se sometieron a prueba de normalidad de **Shapiro-Wilk**. Para las pruebas de significancia estadística se empleó el análisis no paramétrico de correlación de **Spearman** y la prueba de comparaciones múltiples de **Duncan**.

7.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO MEDIANTE LA PRUEBA DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS (AC)

La concentración alta (0.4144 mg/mL), media (0.170 mg/mL) y baja (0.0219 mg/mL) del extracto acuoso de noni, seleccionadas con base a la prueba anterior, el control negativo (solvente, agua) y el control positivo (mitomicina C, 0.25 μ g/mL), se sometieron a evaluación genotóxica mediante la prueba de alteraciones cromosómicas (ACs) mediante protocolo estandarizado en el laboratorio de Toxicología genética y citogenética de la Universidad del Cauca (Hoyos y Carvajal, 2002) (Fig. 4).

Figura 4. Protocolo de siembra de linfocitos para la prueba de alteraciones cromosómicas (ACs)



Se realizaron dos cultivos por concentración (alta, media, baja, control negativo y control positivo); de cada cultivo se gotearon cuatro portaobjetos (dos por tubo). Por placa se analizaron aproximadamente 50 metafases (que contengan un número completo de 46 centrómeros y que se encuentren en primer ciclo de división); es decir, un total de 200 metafases/concentración. Los portaobjetos se analizan al microscopio óptico con objetivo de 100X (Aumento total 1000 veces). Este experimento se repitió dos veces.

El dato de alteraciones cromosómicas (ACs) se expresó en número de alteraciones cromosómicas, alteraciones cromatídicas y el número total de alteraciones cromosómicas (ACs). A los datos obtenidos se les realizó estadística descriptiva y se sometieron a prueba de significancia estadística de carácter no-paramétrico de **Kruskal-Wallis** y la prueba de comparaciones múltiples de **Duncan**.

Las diferentes pruebas estadísticas empleadas en este trabajo se realizaron con el programa estadístico **SPSS versión 8.0** (Statistical Procedures for Social Sciences), con un nivel de significancia máximo de 0,05.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 EFECTO CITOTÓXICO

En la tabla 3, se reporta el número de metafases o células en división celular, identificadas al analizar 4000 células por tratamiento. En adelante el número de metafases/4000 células se le denominará índice de metafases (IM).

Tabla 3. Número de metafases obtenidas en cuatro experimentos, índice promedio (\bar{X}) de metafases, en cultivos de linfocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones del extracto acuoso de la fruta *M. citrifolia* L (noni), incluido el control negativo, con su respectivo error estándar (EE).

Concentración Final (mg/mL)	Número de metafases/ 4000 células (IM)				$\bar{X} \pm EE^*$
	Experimento				
	1	2	3	4	
0	292	233	288	373	296.50 \pm 28.834
0,0219	191	217	271	317	249.00 \pm 28.131
0,0438	159	236	256	298	237.25 \pm 29.107
0,0876	199	210	260	301	242.50 \pm 23.588
0,17	208	201	247	282	234.50 \pm 18.791
0,212	227	217	254	296	248.50 \pm 17.656
0,265	199	204	209	313	231.25 \pm 27.326
0,332	188	194	197	251	207.50 \pm 7.580 ^a
0,4144	200	169	188	219	194.00 \pm 7.771 ^a

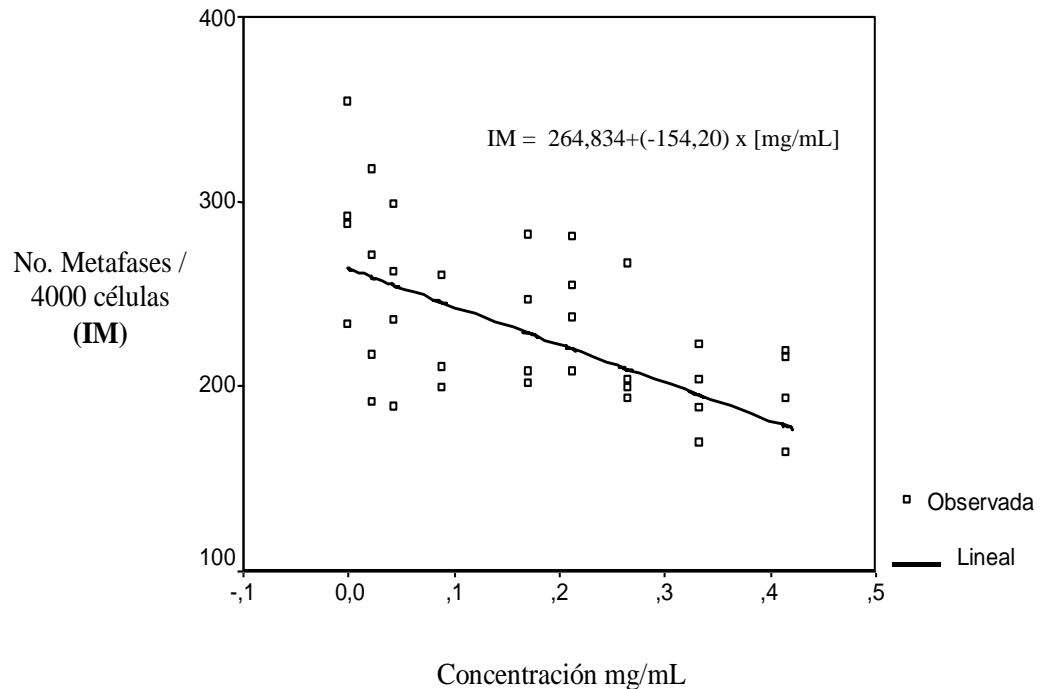
* Índice promedio con su Error Estándar, resultado de analizar 16000 células / concentración

^a Tratamientos con los valores más altos que difiere significativamente del control negativo, según prueba de Duncan (P<0.05).

El IM obtenido para las diferentes concentraciones del extracto acuoso de noni, se ajusta a la distribución normal (según prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, P>0.05), debido a esto se procedió a emplear pruebas de significancia estadística de carácter paramétrico.

Mediante la prueba de comparación múltiple de Duncan se logró establecer que el efecto de las concentraciones altas del extracto acuoso del noni (0.3320 - 0.4144 mg/mL), es tan drástico en la depresión del IM, que difiere significativamente del resto de concentraciones (Tabla 3).

Figura 5. Correlación lineal entre las concentraciones del extracto acuoso de noni y el número de metafases.

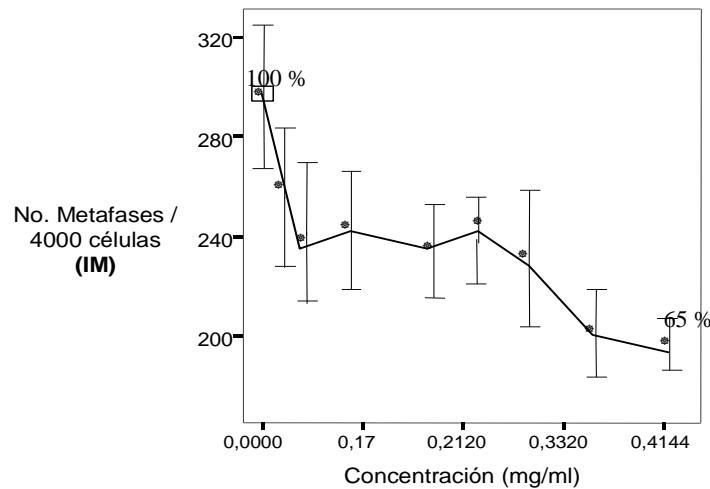


Por medio del análisis de correlación lineal, se logró determinar que existe una asociación lineal inversa estadísticamente significativa entre el IM (var. dependiente) y la concentración (var. independiente) del extracto acuoso de la fruta de noni ($Rho = -0.46$; $P < 0.004$); por lo tanto, existe una relación dosis-efecto (Fig. 5).

En la figura 6 se muestra que a medida que la concentración del extracto se incrementa, se presenta una disminución en el número de metafases; por ejemplo, a las concentraciones más altas (0.3320 - 0.4144 mg/mL) el número de metafases disminuyó aproximadamente en un 35%, respecto del control negativo.

Dicha asociación refleja una influencia de la concentración del extracto acuoso de la fruta del noni en el IM ($r^2 = 0.216$); con lo cual, se logró determinar que la disminución observada en el No. de metafases se debe aproximadamente en un 22% al incremento en la concentración del extracto acuoso de noni; por lo tanto subsiste un 78% de variabilidad sin explicación definida, debida posiblemente a factores propios de estos experimentos (reactivos, variación en T° , manipulación).

Figura 6. Efecto del extracto acuoso de la fruta de noni sobre el número de metafases en cultivos de linfocitos humanos.

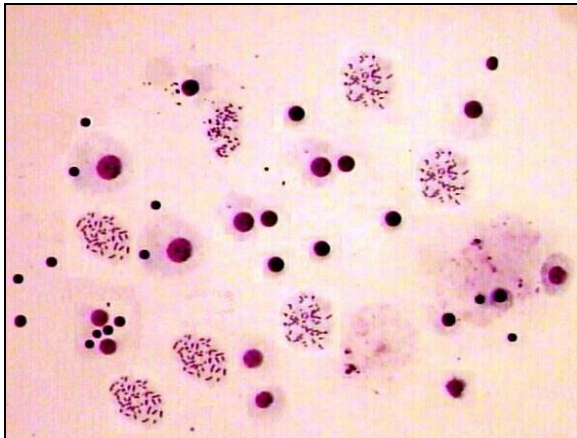


Esta investigación hace parte de los pocos estudios reportados aplicando algún tipo de prueba citotóxica en líneas celulares humanas, siendo este el único trabajo, bajo las condiciones experimentales aplicadas, que emplea células sanas y aplica la prueba de IM para la evaluación del extracto acuoso de noni, en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos.

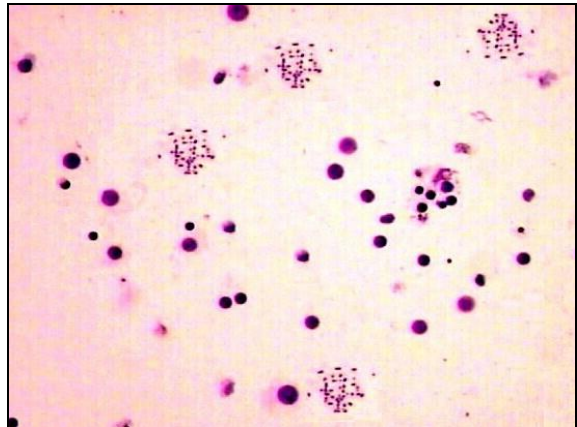
El mecanismo de acción de la citotoxicidad del jugo de noni puede involucrar activación de macrófagos. Los macrófagos liberan productos que son importantes mediadores de la citotoxicidad en tumores. Por lo tanto, el noni puede mediar su actividad citotóxica por la estimulación de macrófagos para liberar numerosos mediadores tumorocidas (agentes que matan células cancerosas) (Hirazumi *et al*, 1999) y/o estimular células T que causan el incremento del efecto citotóxico en respuesta al crecimiento tumoral o infecciones (Roitt *et al*, 1999). Ya que el jugo de noni es efectivo en la estimulación y aceleración de macrófagos, e indirectamente estimula y acelera la acción de células T, la elección de los linfocitos de sangre periférica como el blanco para el estudio del efecto citotóxico-genotóxico del noni sobre las células, es adecuado.

El índice mitótico como biomarcador de proliferación celular, ha sido ampliamente utilizado para medir la proporción de células en la fase M del ciclo celular; entonces, el efecto depresor del número de metafases inducido por el aumento en la concentración del extracto acuoso de la fruta de noni, indica un efecto citotóxico premitótico, presumiblemente con efecto en etapas de la interfase (G1, S y G2), ya que se ha restringido la cantidad de células que pasan a la fase M; es decir, la disminución del IM refleja una inhibición del progreso del ciclo celular y/o pérdida de la capacidad proliferativa, fenómeno posiblemente causado por muerte celular o apoptosis (Rojas *et al*, 1993) (Fig. 7).

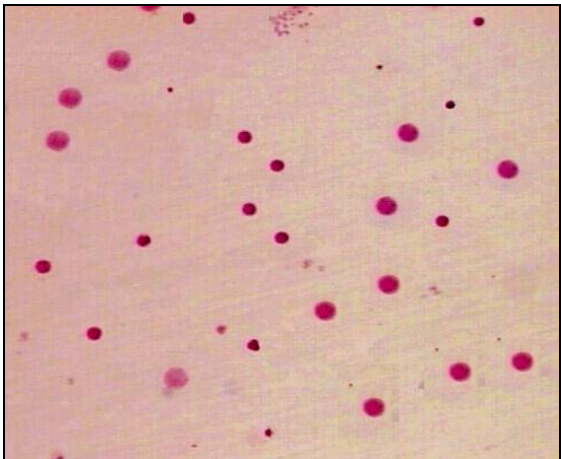
Figura 7. Metafasas observadas en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos tratados con diferentes concentraciones del extracto acuoso de la fruta de *M. citrifolia* L (noni).



Control negativo (Agua), aumento de 20X



Concentración 0.17 mg/mL, aumento 10X



Concentración ≥ 0.3320 mg/mL, aumento 10X

Los resultados obtenidos en este trabajo se relacionan con los datos del estudio preliminar *in vitro* en células de leucemia tratadas con jugo de noni tahitiano (siglas en inglés TNJ™) en el cual, el TNJ presentó citotoxicidad sobre las células cancerosas a diferentes concentraciones de una manera dosis-dependiente, por inducción de necrosis a altas dosis y apoptosis a bajas dosis (Wang *et al*, 2002). De manera similar, en otra investigación empleando tejidos humanos como placenta y explantes de tumor de mama, se determinó que el jugo de noni, a concentración de 5% (v/v) y superiores, suprimió el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos y capilares en tejido de la placenta; el noni, a concentración de 10% en medio de cultivo, indujo degeneración de vasos sanguíneos, apoptosis y fue un eficaz inhibidor del crecimiento capilar en tejidos de tumor de mama (Hornick *et al*, 2003).

El resultado del efecto citotóxico del noni al parecer esta mediado por un efecto sinérgico de los componentes activos de la fruta; que incluye escopoletina, potasio, ácido ascórbico, terpenoides, alcaloides, antraquinonas (nordamnacantal, morindona, rubiadina y rubiadina-1-metil éter, antraquinon glucósido), carotenos, vitamina A, vitamina E, flavonol glucósido, ácido linoleico, aminoácidos, L-asperulosido, ácido caproico, ácido caprilico, y diversos compuestos volátiles, tales como ácidos (octanoico y hexanoico), alcoholes, esterres, cetonas y lactonas (Wang *et al*, 2002; Farine *et al*, 1996), entre otros. Por otra parte, se ha comparado el efecto citotóxico del jugo de noni con drogas anticáncer como prednisolona y taxol. Con dosis subóptimas de prednisolona y jugo de noni en cultivos de células de leucemia, se obtuvo un incremento significativo de células apoptóticas. Con una sola dosis de taxol se indujo un porcentaje bajo de apoptosis, mientras que el TNJ ejerció apoptosis en un 100%. Estos datos indican que el jugo de noni es capaz de ejercer un efecto citotóxico similar al de drogas anticáncer tales como prednisolona y taxol (Wang *et al*, 2002).

El nordamnacantal, morindona y la rubiadina, son antraquinonas presentes en el fruto de la planta *M. citrifolia* L (noni) en grandes cantidades y al parecer son responsables del efecto citotóxico del extracto acuoso de noni, tal como lo reporto Millonig y colaboradores (2005). Estos compuestos se han relacionado con efectos citotóxicos en humanos como resultado de tres casos de hepatotoxicidad provocado por el jugo de noni en un hombre de 29 años, una mujer de 62 años y un paciente de 45 años. El primero, con antecedentes de hepatitis tóxicas anteriores asociadas a dosis pequeñas de paracetamol, desarrolló falla hepática sub-aguda después de consumir 1.5 L de jugo de noni por más de 3 semanas; el segundo, sin antecedente de enfermedad del hígado, desarrolló un episodio de hepatitis aguda después del consumo de 2 L de jugo de noni por más de 3 meses (Stadlbauer *et al*, 2005); y el último presentó un cuadro de hepatitis aguda después del consumo de jugo de noni durante 3 semanas (Millonig *et al*, 2005). El primer paciente sufrió trasplante de

hígado exitoso, mientras los otros dos pacientes se recuperaron espontáneamente después de cesar el consumo de jugo de noni.

El posible mecanismo de citotoxicidad de las antraquinonas, ha sido descrito con ayuda de una antraquinona conocida como *rheim* (ácido 4,5-dihidroxiantraquinona-2-carboxílico) la cual produce radicales libres derivados de oxígeno por ciclo redox, los que a su vez, reducen al glutatión intracelular, disminuyendo el potencial de la membrana mitocondrial, y dando como consecuencia la iniciación de peroxidación lipídica y muerte celular (Bironaite y Ollinger, 1997). Las antraquinonas presentes en otros remedios de origen vegetal, han reportado de la misma manera ser citotóxicas en pruebas *in vitro* (Itoh *et al*, 1995; Li *et al*, 2004).

Sin embargo, se han reportado estudios de toxicidad subaguda y subcrónica en ratones, tratados durante varias semanas con diferentes concentraciones de puré de noni (1000-1500 mg/kg) y TNJ (0.4-80 mL/kg), en la que el jugo de noni administrado diariamente, no presentó señales de toxicidad comparados con grupos control (Glerup, 2000-2001; Mancebo *et al*, 2002; OECD, 1998; PSL, 1999A, B y C-2000). No obstante, se ha podido establecer la toxicidad aguda, determinada por la DL₅₀ del extracto acuoso y alcohólico de la fruta de noni siendo de 7500 y 3500 mg/kg, respectivamente (Chearskul *et al*, 2004). Entonces, prevalece uno de los principales problemas de la toxicología, la diferencia entre los resultados de toxicidad obtenidos con experimentos *in vivo* y los realizados *in vitro*; por lo tanto, la no concordancia entre el efecto citotóxico del noni observado en la presente investigación y la no toxicidad reportada en investigaciones expuestas anteriormente, permiten resaltar el importante papel que desempeña el proceso de desactivación metabólica (Fase I y II del metabolismo celular), en la acción de los compuestos activos del noni dentro de un organismo.

Los resultados muestran que el extracto acuoso de la fruta de *M. citrifolia* L. (noni), bajo las condiciones experimentales ensayadas, presentó efecto citotóxico para los linfocitos humanos en condiciones *in vitro*. Al parecer, el extracto acuoso de noni, a las concentraciones valoradas, interactúa con estructuras celulares o material genético de los linfocitos de importancia biológica para la estabilidad celular. Con el fin de determinar si este efecto influye en el material genético, el extracto acuoso de noni se sometió a evaluación genotóxica mediante la prueba de alteraciones cromosómicas (AC).

A partir de las concentraciones del extracto acuoso de la fruta de *M. citrifolia* L. (noni), evaluadas con la prueba anterior, se seleccionaron tres concentraciones para valorar el efecto genotóxico mediante la prueba de alteraciones cromosómicas (ACs). Las

concentraciones elegidas fueron: baja (0.0219 mg/mL) con la cual se obtuvo una disminución del índice de metafase (IM), estadísticamente no significativa; concentración media (0.170 mg/mL), que redujo el IM aproximadamente a la mitad (50-60%); y la concentración alta (0.4144 mg/mL) que disminuyó el IM a un 20%, comparadas al grupo control negativo.

8.2 EFECTO GENOTÓXICO

En la tabla 4, se reporta el número de alteraciones cromatídicas, alteraciones cromosómicas y alteraciones totales, con su promedio y medida de variabilidad (error estándar), registrados al analizar 100 células/cultivo (2 cultivos / concentración) en cada experimento. En total se realizaron 3 experimentos.

Tabla 4. Número de alteraciones cromatídicas y cromosómicas, promedio de alteraciones cromosómicas (\bar{X}), con su respectivo error estándar (EE) y tamaño de muestra (n), registradas en cultivos de linfocitos humanos, expuestos al extracto acuoso de la fruta *M. citrifolia* L (noni) y sus controles.

Tratamiento (Concentración mg/mL)	Alteraciones cromosómicas / 100 células											
	Alteración es cromatídicas				Alteración es cromosómicas				Alteraciones Totales			
	Exp. No.			$\bar{X} \pm EE$ (n)*	Exp. No.			$\bar{X} \pm EE$ (n)*	Exp. No.			$\bar{X} \pm EE$ (n)*
	1	2	3		1	2	3		1	2	3	
C-negativo (0)	1	1	1	1.33 ± 0.21 (6)	1	1	0	0.33 ± 0.21 (6)	2	2	1	1.67 ± 0.21 (6)
	2	1	2		0	0	0		2	1	2	
Dosis baja (0.0219)	3	5	3	3.50 ± 0.34 (6) ^a	1	0	1	0.33 ± 0.21 (6)	4	5	4	3.83 ± 0.31 (6) ^c
	3	4	3		0	0	0		3	4	3	
Dosis media (0.170)	1	2	1	1.50 ± 0.22 (6)	0	0	0	0.00 ± 0.00 (6)	1	2	1	1.50 ± 0.22 (6)
	2	1	2		0	0	0		2	1	2	
Dosis alta (0.4144)	2	1	1	1.17 ± 0.31 (6)	1	0	0	0.17 ± 0.17 (6)	3	1	1	1.33 ± 0.33 (6)
	1	2	0		0	0	0		1	2	0	
C-positivo MMC (0.25µg/mL)	10	10	9	10.0 ± 1.00 (6) ^a	2	1	2	2.00 ± 2.00 (6) ^b	12	11	11	12.0 ± 3.00 (6) ^c
	11	9	11		2	2	3		13	11	14	
P	0.001				0.430				0.001			

* Promedio de alteraciones cromosómicas con su error estándar (número de cultivos), resultado de analizar 600 metafases/concentración.

P = significancia estadística según la prueba de Kruskal-Wallis

^a Tratamientos con los valores más altos que difieren significativamente del control negativo y de la concentración media y alta, según prueba de Duncan (P<0.05).

^b Tratamiento con el valor más alto que difiere significativamente del resto de tratamientos, según prueba de Duncan.

^c Tratamientos con los valores más altos que difieren significativamente del control negativo y de la concentración media y alta, según prueba de Duncan.

Debido a que los datos no cumplen con la asunción de normalidad e igualdad de varianza y al tamaño de la muestra (n), los datos se analizaron mediante prueba de significancia estadística no paramétrica, con un nivel máximo de significancia de 0,05. La evaluación del efecto genotóxico del extracto acuoso del noni se hizo en tres experimentos, realizados a diferentes tiempos (uno por mes); razón por la cual se identificó la variabilidad entre los experimentos con la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis, encontrando que no existe diferencia significativa entre ellos ($p > 0.05$).

En la tabla 4, se observa que a la concentración baja (0.0219 mg/mL) le corresponde un número promedio de *alteraciones cromatídicas* de 3.50 ± 0.34 (figura 8a), el cuál es significativamente mayor que los *alteraciones cromatídicas* registrados en el control negativo (1.33 ± 0.21), en la concentración media (0.170 mg/mL = 1.50 ± 0.22) y la concentración alta (0.4144 mg/mL = 1.17 ± 0.31); sin embargo, el control positivo (MMC) exhibió un número promedio de *alteraciones cromatídicas* de 10.0 ± 1.00 , el cual fue significativamente mayor que el resto de tratamientos (Figura 9).

Por otra parte, el número de *alteraciones cromosómicas* no cambió significativamente entre los tratamientos del extracto acuoso de la fruta de noni (incluido el control negativo), aunque el control positivo fue el tratamiento que indujo un número mayor de *alteraciones cromosómicas* (2.00 ± 2.00) (figura 8b). Para las ACs totales el comportamiento fue similar al observado para los chtb (figura 8c), indicando que son estos los que más fueron inducidos por los tratamientos.

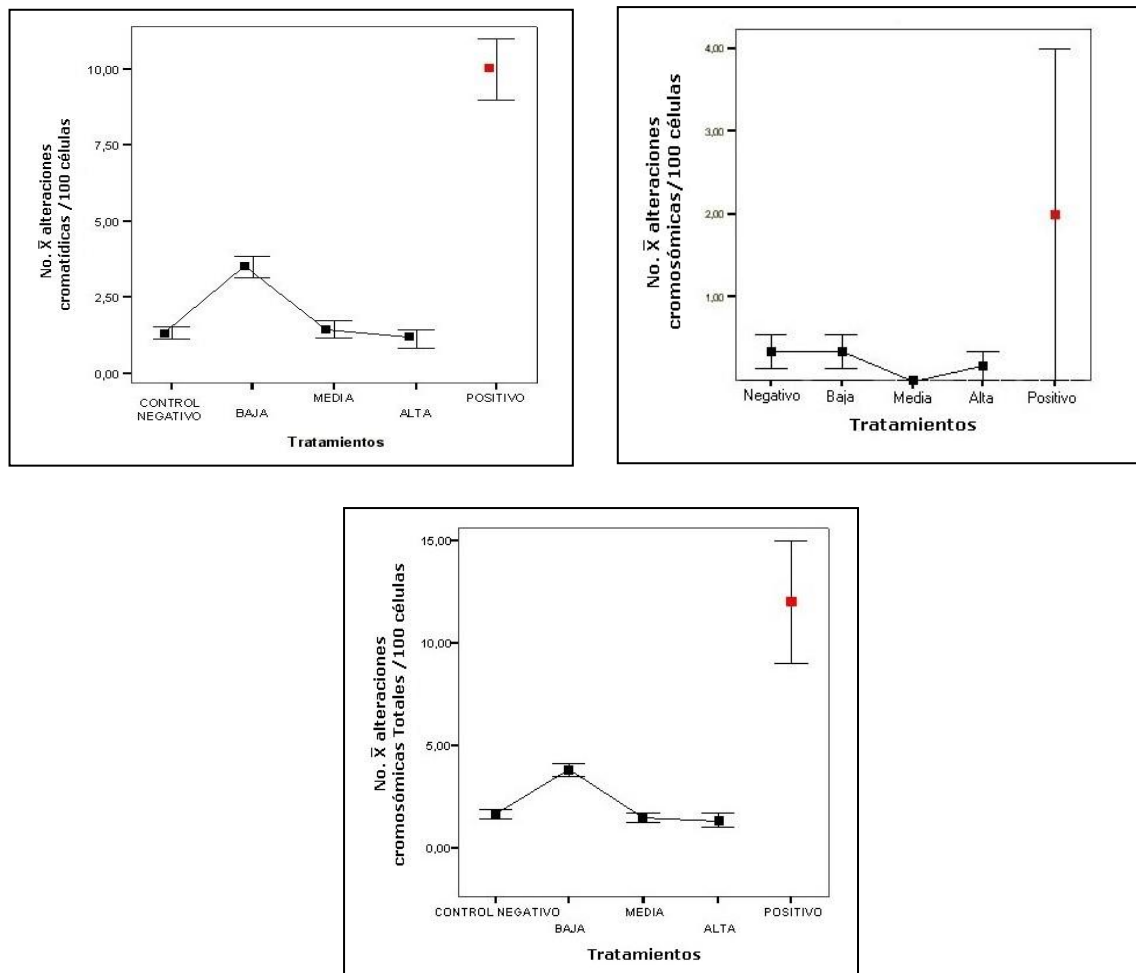
La concentración baja (0.0219mg/mL) del extracto acuoso de la fruta de noni, presentó un promedio de 3.83 ± 0.31 ACs/100células, el cuál fue significativamente mayor al promedio de ACs del resto de concentraciones y el control negativo (1.67 ± 0.21 ACs/100 células) (tabla 5), pero muy inferior al promedio de ACs inducidas por la mitomicina C (12.0 ± 3.00 ACs/100 células). Este dato permite concluir que el extracto acuoso del fruto de *M. citrifolia* L (noni) a las concentraciones evaluadas, en condiciones *in vitro*; exhibió efecto genotóxico, al compararlo con el control negativo (agua).

Asumiendo que el extracto de noni tiene efecto genotóxico, asunción de mayor validez; pero que debido al efecto citotóxico observado, no permitió que los daños en el material genético logran ser observados a las concentraciones superiores (media 0.170 mg/mL y alta 0.4144 mg/mL), a causa de la muerte celular o apoptosis que sufrieron los linfocitos. Esto se correlaciona con el resultado de IM, el cual fue bajo a estas concentraciones (tabla 3); lo anterior sugiere que existe una interacción entre los principios activos de la muestra

compleja del extracto a nivel de estructuras u organelos de los linfocitos y a nivel del material genético infiriendo algún tipo de alteración a nivel de la fase G2 del ciclo celular.

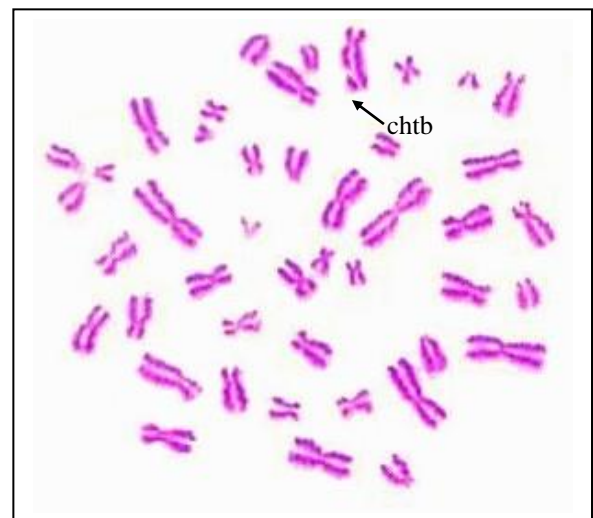
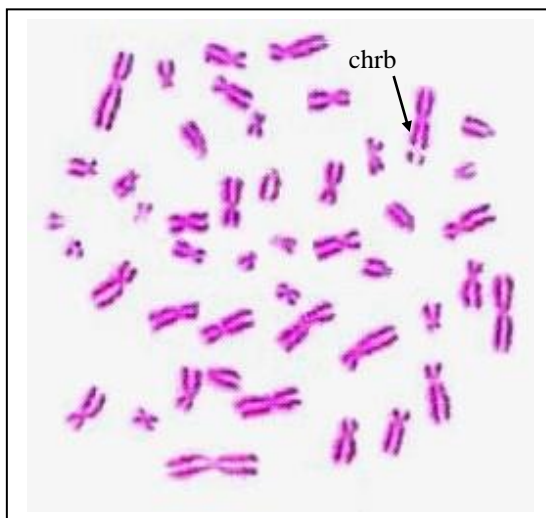
Los resultados obtenidos en esta investigación no concuerdan con los resultados obtenidos en tres trabajos reportados por el Comité Científico de Alimentos sobre el jugo de noni Tahitiano® (European Comisión, 2002). En el primero se expone que, mediante la prueba HPRT (Hypoxanthine-phosphoribosyl-transferase), empleando una línea celular V79 derivada de fibroblastos de pulmón de hámster Chino, a un rango de dosis entre 0.003 y 3 µL/mL del extracto etil-acetato de jugo de noni Tahitiano, no se observó genotoxicidad, en ausencia y presencia de fracción microsomal S9 (Westendorf, 2002a).

Figura 8. Número promedio de: (a) alteraciones cromatídicas, (b) alteraciones cromosómicas, (c) alteraciones cromosómicas totales (ACs), identificadas para el extracto acuoso del fruto de noni a dosis baja (0.0219 mg/mL), media (0.170 mg/mL) y alta (0.4144 mg/mL), control negativo (agua) y control positivo (MMC).



En el otro trabajo, mediante la prueba de micronúcleos en médula ósea de ratón, a dosis de 1 y 10 g/Kg de jugo de noni Tahitiano, no se presentó un incremento estadísticamente significativo en la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (Edwards, 2002). De forma similar, el último trabajo reporta que, mediante la prueba de UDS (Unscheduled DNA Synthesis = síntesis de DNA no programada) en hepatocitos de ratón, a dosis de 100 y 1000 mg/Kg del extracto etil-acetato de jugo de noni Tahitiano, no se evidenció potencial genotóxico (Westendorf, 2002b).

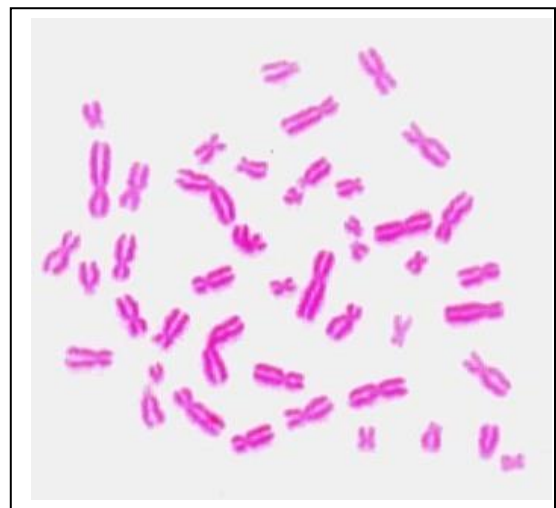
Figura 9. Alteraciones cromosómicas (AC) encontradas en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos observadas con diferentes tratamientos.



Concentración baja (0.0219mg/mL): 100X



Control positivo (MMC, 0.25µg/mL): 100X



Control negativo (agua): 100X

Por otra parte, la disminución aparente de las ACs a medida que se aumenta la concentración del extracto acuoso del fruto de noni (tabla 4), al parecer concuerda con el hecho de que el jugo de noni posee importantes propiedades antioxidantes, demostradas por Zin y colaboradores (2002), quienes encontraron que extractos de carácter polar, no-polar y el extracto crudo (Zin *et al*, 2006) de la fruta de noni, presenta actividad antioxidativa significativa, comparable con alfa-tocoferol (vitamina E); y esta, a su vez, hace parte de los compuestos que por acción sinérgica se relaciona con la citotoxicidad observada por parte del noni, tal como lo reportaron Wang y colaboradores (2002) y Farine y colaboradores (1996a); sucesos que aportan evidencia de que los antioxidantes de origen natural pueden mediar una respuesta citotóxica por acción sinérgica de diferentes componentes.

El extracto acuoso de la fruta de noni a las concentraciones evaluadas en este trabajo, presentó incremento significativo en el promedio de AC, comparado al control negativo; representando una disminución de la viabilidad celular, exhibida en la respuesta citotóxica que se observó a las concentraciones superiores. Esto concuerda con el efecto de una sustancia abundante en polisacáridos, llamada noni-ppt, presente en gran cantidad en el jugo de la fruta de noni, la cual se encontró responsable de tener actividad antitumor (efecto citotóxico) en el modelo de carcinoma de pulmón de Lewis (Hirazumi *et al*, 1994).

Los resultados de este estudio constituyen una valiosa herramienta para continuar la caracterización del noni, generando nuevo conocimiento sobre sus efectos para la atención primaria de los sistemas de salud, porque hace parte de los diferentes pasos para la valoración correcta de una planta medicinal, mediante la propuesta de ruta crítica realizada en Cuba (Miranda, 1995), como estudio toxicológico, para generar nuevos tratamientos y recomendaciones según su valoración con otras pruebas fitoquímicas y farmacológicas. Además, el desarrollo de nuevas drogas que posean potencial antitumor (citotoxicidad), es un gran desafío de la medicina actual. El descubrimiento de estas drogas es muy difícil, porque ellas deben ser capaces de destruir células cancerosas sin causar efectos secundarios excesivos. La mayoría de drogas anti-tumor causan hepatotoxicidad, alteraciones del corazón y nefrotoxicidad (Navis *et al*, 1999). Una terapia que no provoque los efectos adversos de las clásicas drogas anti-tumor o la cual pueda ser usada como un coadyudante con drogas anticáncer, sin la pérdida de actividad contra las células del tumor, como una herramienta útil para tratar pacientes con cáncer (Hirazumi *et al*, 1999).

9. CONCLUSIONES

En las condiciones dadas en el presente trabajo, las diferentes concentraciones empleadas del extracto acuoso de la fruta de *Morinda citrifolia* L (noni), y mediante la prueba de citotoxicidad, permitieron establecer que existe una relación dosis-efecto; demostrando que a medida que la concentración del extracto se incrementa, se presenta una disminución en el índice de metafase (IM).

El extracto acuoso de la fruta de *Morinda citrifolia* L (noni), en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos, bajo las condiciones de este trabajo, presentó un efecto citotóxico severo a las concentraciones 0.3320 y 0.4144 mg/mL, representado en una depresión del índice de metafases (IM) significativa ($P < 0.05$) con respecto al control, indicando que existe un efecto bloqueador del ciclo celular en una etapa interfásica (efecto premitótico), posiblemente como consecuencia de un daño inducido en el material celular durante el tiempo de exposición.

El extracto acuoso de la fruta de *Morinda citrifolia* L (noni), en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos (sin activación metabólica), bajo las condiciones dadas en este trabajo, evidenció efecto genotóxico a las concentraciones baja (0.0219 mg/mL), media (0.170 mg/mL) y alta (0.4144 mg/mL) del extracto acuoso de la fruta noni, las cuales indujeron números promedio de ACs de 3.83 ± 0.31 , 1.50 ± 0.22 y 1.33 ± 0.33 respectivamente, comparadas con el control negativo (1.67 ± 0.21).

A la concentración baja (0.0219 mg/mL); se observó la mayor frecuencia de ACs, (3.83/100 células); la cual fue significativamente mayor que el resto de concentraciones, pero muy inferior a la frecuencia de ACs inducida por la MMC (12/100 células). Sin embargo, no se presentó un incremento de las ACs a las concentraciones media (0.170 mg/mL) y alta (0.4144 mg/mL), comparadas con el control negativo, posiblemente por el efecto citotóxico severo observado a estas concentraciones, que no permitió que los daños en el material genético logaran ser expresados y observados.

El análisis de alteraciones cromosómicas mostró que la mayoría de las alteraciones detectadas con los diferentes tratamientos, fueron de tipo cromatídico (*alteración cromatídica*), los cuales se forman por algún tipo de alteración a nivel de la fase G2 del ciclo celular.

10. SUGERENCIAS

Sería muy conveniente realizar futuros estudios similares a este, con diferentes fracciones aisladas de la planta de *Morinda citrifolia* L, para identificar cual de ellas contiene el principio activo, que permita establecer realmente la eficacia y finalmente la efectividad, en el tratamiento de pacientes con problemas de salud.

Para futuros trabajos es necesario la evaluación de la citotoxicidad y genotoxicidad *in vitro* del noni con activación metabólica (fracción microsomal S9) o realizar pruebas *in vivo* pero con extracto crudos, debido a que los resultados reportados para el noni han sido realizados con extractos diferentes (Ej: etil-acetato, etanólico, etc) a los consumidos por la comunidad.

Teniendo en cuenta que, la concentración baja (0.0219 mg/mL) del extracto acuoso de noni ocasiona daños en el material genético y a concentraciones superiores a esta (media 0.170 mg/mL y alta 0.4144 mg/mL) produce un efecto inhibitor sobre la proliferación celular (efecto citotóxico); es necesario determinar si se presenta una relación dosis-efecto a concentraciones menores a la baja.

Es muy importante continuar con la evaluación de plantas medicinales nativas o incluso foráneas de uso tradicional, realizando todos los estudios pertinentes y de este modo poder realizar los registros necesarios para la ampliación de la lista básica de productos naturales que se emplea con fines reguladoras en el país, por el INVIMA.

La experiencia del trabajo con el noni, permitió reconocer que realmente se está frente a un recurso con potencial terapéutico que merece seguir siendo investigado para que, en un futuro, pueda ser aplicado para el tratamiento de diferentes enfermedades.

BIBLIOGRAFÍA

ALBERTINI, R.J and O'NEILL, J.P. Human monitoring for somatic mutation in humans. En: Environmental Mutagenesis. (1995); p. 341-366

AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. Noni plant may yield new drugs to fight tuberculosis. En: Press release the 2000 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies. (2000)

ATKINSON, N. Antibacterial substances from flowering plants. Antibacterial activity of dried Australian plants by a rapid direct plate test. En: Australian J Exper Biol. Vol. 34. (1956); p. 17-26

BIRONAITE, D and OLLINGER, K. The hepatotoxicity of rhein involves impairment of mitochondrial functions. En: Chem Biol Interact. Vol. 103 (1997); p. 35-50

BONASSI, Stefano *et al.* Are Chromosome Aberrations in Circulating Lymphocytes Predictive of Future Cancer Onset in Humans? Preliminary Results of an Italian Cohort Study. En: Cancer Genet Cytogenet. Vol. 79 (1995); p. 133-135

_____. Chromosomal Aberrations in Lymphocytes Predict Human Cancer Independently of Exposure to Carcinogens. En: Cancer Research. Vol. 60 (2000); p. 1619-25

BUSHNELL, OA; FUKUDA, M and MAKINODIAN, T. The antibacterial properties of some plants found in Hawaii. En: Pacific Science. Vol. 4 (1950); p. 167-83

CHEARSKUL, S *et al.* *Morinda Citrifolia* Has Very Weak Strogenic Activity In Vivo. En: Thai journal of physiological sciences. Vol. 17. No.1 (2004); p. 22-29

DANG-VAN, H. Treatment and prevention of hypertension and its cerebral complications by total root extracts of *Morinda citrifolia*. En: Presse Med. Vol. 2. No. 63 (1955); p.1478

DUNCAN, SH; FLINT, HJ and STEWART, CS. Inhibitory activity of gut bacteria against *Escherichia coli* 0157 mediated by dietary plant metabolites. En: FEMS Microbiol Lett. Vol. 164 (1998); p. 283-58

EDWARDS, CN. Tahitian noni Juice - Mouse Micronucleus Test. En: Scantox Biologisk Laboratorium, Lille Skensved, Denmark (Lab no. 47053) (2002).

EUROPEAN COMMISSION. Health & Consumer Protection. Directorate-General. Scientific Committee on Food. SCF/CS/NF/DOS/18 ADD 2 Final. Opinion of the Scientific Committee on Food on Tahitian noni® juice (2002).

FARINE, JP *et al.* Volatile Components of Ripe Fruits of *Morinda Citrifolia* and their Effects on *Drosophila*. En: Phytochemistry. Vol. 41. No. 2 (1996); p. 433-38

FURUSAWA, E *et al.* Antitumour potential of a polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (Noni) on sarcoma 180 ascites tumour in mice. En: Phytother Res. Vol. 17. No. 10 (2003); p. 1158-64

GUANGMING, L *et al.* Two Novel Glycosides from the Fruits of *Morinda Citrifolia* (Noni) Inhibit AP-1 Transactivation and Cell Transformation in the Mouse Epidermal JB6 Cell Line. En: Cancer Research. Vol. 61 (2001); p. 5749–5756

GUERRERO, R. En: Rev Cubana Plant Med. Vol. 1. No. 2 (1996). Citado por: SANCHES, Lamar *et al.* Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en Cuba. La Habana. En: Rev Cubana Farm. Vol. 34. No. 1 (2000); p. 34-43

GLERUP, P. Tahitian noni Juice - A 13-week oral (gavage) toxicity study in rats. En: Scantox Biologisk Laboratorium, Lille Skensved, Denmark (Lab no. 35207) (2000).

GLERUP, P. TAHITIAN TNJ: A 13-week oral (gavage) toxicity study in rats. En: Scantox Biologisk Laboratorium (2001)

GRUENWALD, J. El mercado europeo de las plantas medicinales. Seminario Internacional de Plantas Medicinales: Mercado, Cultivo y Procesamiento. Universidad de Concepción (2000)

HAGMAR, L *et al.* Cancer predictive value of cytogenetic markers used in occupational health surveillance programs: a report from an ongoing study by the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. En: Mutation Research. Vol. 405 (1998); p. 171–178

HAGMAR, L *et al.* Impact of Types of Lymphocyte Chromosomal Aberrations on Human Cancer Risk: Results from Nordic and Italian Cohorts. En: Cancer Research. Vol. 64 (2004); p. 2258–2263

HEINICKE, R. The pharmacologically active ingredient of Noni. En: Bulletin of the National Tropical Botanical Garden. (1985)

HIRAMATSU, T *et al.* Induction of normal phenotypes in ras-transformed cells by damnacanthol from *Morinda citrifolia*. En: Cancer Lett. Vol. 30. No. 73 (1993); p. 161-6

HIRAZUMI, A *et al.* Anticancer activity of *Morinda citrifolia* (noni) on intraperitoneally implanted Lewis lung carcinoma in syngeneic mice. En: Proc West Pharmacol Soc. Vol. 37 (1994); p. 145-6

_____. An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni) with antitumour activity. En: Phytother Res. Vol. 13 (1999); p. 380-7

_____. Immunomodulation contributes to the anticancer activity of *Morinda citrifolia* (Noni) fruit juice. En: Proc West Pharmacol Soc. Vol. 39 (1996); p. 7-9

HIWASA, T *et al.* Stimulation of ultraviolet-induced apoptosis of human fibroblast UVr-1 cells by tyrosine kinase inhibitors. En: FEBS Lett. Vol. 12. No. 444 (1999); p. 173-6

HORNICK, C *et al.* Inhibition of angiogenic initiation and disruption of newly established human vascular networks by juice from *Morinda citrifolia* (Noni). En: Angiogenesis. Vol. 6. No. 2 (2003); p.143-9

HOWARD, R.A. Flora of the Lesser Antilles, Leeward and Windward Islands. Dicotyledoneae. Harvard University. Parte 3. Vol. 6 (1989); p. 658

HOYOS, LS y CARVAJAL, SM. Manual de Citogenética. Linfocitos Humanos. Universidad del Cauca. Grupo de Investigación en Toxicológica Genética y Citogenética. Departamento de Biología. Popayán. (2002). p. 56

ITOH, S *et al.* Liver injuries induced by herbal medicine, syo-saiko-to (xiao-chai-hu-tang). En: Dig Dis Sci. Vol. 40 (1995); p. 1845-1848.

JACOBS, P.A *et al.* A cytogenetic survey of 11,680 newborns infants. En: Hum.Genet. Vol. 35 (1974); p. 301-319

KAABER, K. TAHITIAN NONI® Juice: active systemic anaphylaxis test in the guinea pig. En: Scantox Biologisk Laboratorium. (2002)

KOPPLIN, Mike. Toxicología Ambiental. Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental. Universidad de Arizona. (online). (2001). <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/toxamb-dl.html>

LANDO, C; HAGMAR, L and BONASSI, S. Biomarkers of cytogenetic damage in humans and risk of cancer. The European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). En: Med Lav. Vol. 89. No. 2 (1998); p.124-31

LEACH, AJ; LEACH, DN and LEACH, GJ. Antibacterial activity of some medicinal plants of Papua New Guinea. En: Sci New Guinea. Vol. 14 (1988); p. 1-7

LEVAND, O and LARSON, HO. Some chemical constituents of *Morinda citrifolia*. En: Planta Med. Vol. 36. No. 2 (1979); p.186-7

LI, FK *et al.* Aggravation of non-steroidal anti-inflammatory drug-induced hepatitis and acute renal failure by slimming drug containing anthraquinones. En: Nephrol Dial Transplant. Vol. 19 (2004) p.1916-1917

LI, R *et al.* A cross-cultural study: anti-inflammatory activity of Australian and Chinese plants. En: J Ethnopharmacol. Vol. 85. no.1. (2003); p. 25-32.

LIOGIER, H.A. Descriptive flora of Puerto Rico and adjacent islands. Universidad de Puerto Rico, San Juan, PR. Vol. 5 (1997); p. 436

LITTLE, E.L, Jr and WADSWORTH, F.H. Common trees of Puerto Rico and the Virgin Islands. En: Agriculture Handbook. Vol. 249 (1964); p. 548

MANCEBO, A *et al.* Ensayo de toxicidad a dosis repetidas (28 días) por vía oral del extracto acuoso de *Morinda citrifolia* en ratas Sprague Dawley. En: Rev Toxicol. Vol. 19 (2002); p.73-78

MANFRIEDI, J.J and HORWITZ, B. Taxol: an antimetabolic agent with a new mechanism of action. Capítulo II. Cell Cycle Effect of Drugs. Editorial. En: International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics. (1986); p. 287

McKOY, ML; EVERTON, AT and SIMON, O R. Preliminary Investigation of the Anti-inflammatory Properties of an Aqueous Extract from *Morinda citrifolia* (Noni). En: Proc. West. Pharmacol. Soc. Vol. 45 (2002); p. 76-78

MILLONIG, G; STADLMANN, S and VOGEL, W. Herbal hepatotoxicity: acute hepatitis caused by a noni preparation (*Morinda citrifolia*). En: Eur J Gastroenterol Hepatol. Vol 17 No. 4 (2005); p.445-7

MIRANDA, M. Programa Nacional de Plantas Medicinales. Conferencia Sección Plantas Medicinales y Síntesis. En: Rev Cubana Farm. Vol. 30. (1995); p. 205

MUELLER, B *et al.* Noni juice (*Morinda citrifolia*): hidden potential for hyperkalemia? En: Am J Kidney Dis. Vol. 35 No.2 (2000); p. 310-2

NAVIS, I; SRIGANTH, P and PREMALATHA, B. Dietary curcumin with cisplatin administration modulates tumor marker indices in experimental fibrosarcoma. En: Pharmacol. Res. Vol. 39 (1999); p. 175-179

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). “Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents”. En: Guideline No. 408 (1998)

PFEIFFER, P; GOEDECKE, W and OBE, G. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. En: Mutagensis. Vol 15. No. 4 (2000); p. 289-302

PRODUCT SAFETY LABS (PSL). Acute oral toxicity study in rats - limit test: Tahitian noni juice. Product Safety Labs (Eurofins Scientific, Inc.), East Brunswick, New Jersey, US (1999a)

_____. Acute oral toxicity study in rats - limit test: Tahitian noni concentrate. Product Safety Labs (Eurofins Scientific, Inc.), East Brunswick, New Jersey, US (1999b)

_____. Acute oral toxicity study in rats - limit test: Tahitian noni puree. Product Safety Labs (Eurofins Scientific, Inc.), East Brunswick, New Jersey, US (1999c)

_____. Guinea pig antigenicity study. Product Safety Labs (Eurofins Scientific, Inc.), East Brunswick, New Jersey, US (study no. 8472) (2000)

ROITT, L; BROSTOFF, J and MALE, D. *Inmunología*. 5ª ed. Brazil (1999). Citado por: SELIGMAN, IC *et al.* The anticancer homeopathic composite “Canona Method” is not genotoxic for human lymphocytes *in vitro*. En: Genetic and Molecular Research. Vol. 2. No 2 (2003); p. 223-228

- ROJAS, E *et al.* Mitotic index and cell proliferation kinetics for the identification of antineoplastic activity. En: *Anti-cancer Drugs*. Vol. 4 (1993); p. 637-640
- ROWLEY, J.D. Identification of the constant chromosome regions involved in human hematologic malignant disease. En: *Science*. Vol. 216 (1986); p. 749-751
- SALUDES, J *et al.* Antitubercular constituents from the hexane fraction of *Morinda citrifolia* Linn. (Rubiaceae). En: *Phytother Res*. Vol. 16. No. 7 (2002); p. 683-5
- SANG, S *et al.* A new unusual iridoid with inhibition of activator protein-1 (AP-1) from the leaves of *Morinda citrifolia* L. En: *Org Lett*. Vol. 3. No. 9 (2001); p.1307-9
- _____. New unusual iridoids from the leaves of Noni (*Morinda citrifolia* L.) show inhibitory effect on ultraviolet B-induced transcriptional activator protein-1 (AP-1) activity. En: *Bioorg Med Chem*. Vol. 12. No. 11-12 (2003); p. 2499-502
- SCOT, Nelson C. *Morinda citrifolia* L. Rubiaceae (Rubiaceae) Coffee family. En: *Permanent Agriculture Resources*. University of Hawaii at Manoa, College of Tropical Agriculture and Human Resources (CTAHR), Department of Plant & Environmental Protection Sciences (PEPS) (online). (2003). Web: <http://www.ctahr.hawaii.edu/noni/>
- SIDDIQUI, B *et al.* Isolation and structure determination of a benzofuran and a bis-nor-isoprenoid from *Aspergillus niger* grown on the water soluble fraction of *Morinda citrifolia* Linn. leaves. En: *Nat Prod Res*. (2003); p.17
- STADLBAUER, V *et al.* Hepatotoxicity of NONI juice: Report of two cases. En: *World J Gastroenterol*. Vol. 11. No. 30 (2005); p. 4758-4760
- STALMAM, M *et al.* Regulation of anthraquinone biosynthesis in cell cultures of *Morinda citrifolia*. En: *J Plant Physiol*. Vol. 160. No.6 (2003); p. 607-14
- STEVENS, W.D *et al.* Flora de Nicaragua. Monographs in Systematic Botany. En: *Missouri Botanic Garden*. Vol. 85. No. 3 (2001); p. 1911-2664
- SWIERENGA, S *et al.* Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories, IV. Chromosome aberrations and Sister-Chromatid exchange in Chinese hamster ovary, V79 Chinese hamster lung and human lymphocyte cultures. En: *Mutation Research*. Vol. 246 (1991); p. 301-322

UMEZAWA, K. Isolation of 1-methoxy-2-formyl-3-hydroxyanthraquinone from *Morinda citrifolia* and neoplasm inhibitors containing the same. En: Japan Kokai Tokyo Koho. (1992)

WANG, M.Y y SU, C. Cancer preventive effect of *Morinda citrifolia* (Noni). En: Ann N Y Acad Sci. Vol. 952 (2001); p.161-8

WANG, MY *et al.* *Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in Noni research. En: Acta Pharmacol Sin. Vol. 23. No.12 (2002); p. 1127-1141

_____. Novel glycosides from Noni (*Morinda citrifolia*). En: J Nat Prod. Vol. 63. No. 8 (2000); p. 1182-3

_____. Novel trisaccharide fatty acid ester identified from the fruits of *Morinda citrifolia* (Noni). En: J Agric Food Chem. Vol. 47. No. 12 (1999); p. 4880-2

WESTENDORF, J. Investigation of Tahitian noni Juice in the *in vivo-in vitro* UDS-assay in rat hepatocytes. Institute of Experimental and Clinical Toxicology, University Medical School of Hamburg-Eppendorf, Germany (2002a)

_____. Investigation of Tahitian noni Juice in the V79-HPRT-Test. Institute of Experimental and Clinical Toxicology. University Medical School of Hamburg-Eppendorf, Germany (2002b)

YAMAMOTO, M and WATANABE, G. Epidemiology of gross chromosome anomalies at the early embryonic stage of pregnancy. En: Contr. Epidem. Biostatist. Vol. 1 (1979); p. 101-106

YOUNOS, C *et al.* Analgesic and behavioural effects of *Morinda citrifolia*. En: Planta Med. Vol. 56. No. 5 (1990); p. 430-4

ZIN, MZ; HAMID, AA and OSMAN, A. Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. En: Food Chemistry. Vol.78 (2002); p. 227-231

_____. Antioxidative activities of chromatographic fractions obtained from root, fruit and leaf of Mengkudu. En: Food Chemistry. Vol. 78. No. 2 (2006); p. 169-178

