



REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

ALESSANDRA LIMA ROCHA

**Atividade antitumoral da *Morinda citrifolia* sobre o Tumor de Ehrlich: ensaio
in vitro e in vivo**

São Luis,
2017

**Atividade antitumoral da *Morinda citrifolia* sobre o Tumor de Ehrlich: ensaio
in vitro e in vivo**

ALESSANDRA LIMA ROCHA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, com sede na Universidade Federal Rural de Pernambuco e ponto focal na Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia em Agropecuária

Orientadores: Profa. Dra. Ana Lúcia Abreu Silva

Prof. Dr. Fernando Almeida de Souza

São Luis,
2017

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Rocha, Alessandra Lima.

Atividade antitumoral da *Morinda citrifolia* sobre o Tumor de Ehrlich: ensaio in vitro e in vivo / Alessandra Lima Rocha, renata mondêgo de Oliveira, BRENO GLAESSNER GOMES FERNANDES DE Souza. - 2017.

89 f.

Coorientador(a): Ana Paula S. de Azevedo dos Santos Santos.

Orientador(a): Ana Lucia Abreu-Silva.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - Renorbio/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luis, 2017.

1. Ciclosfosfamida. 2. Extrato hidroalcolico. 3. Noni. I. Abreu-Silva, Ana Lucia. II. Oliveira, renata mondêgo de. III. Santos, Ana Paula S. de Azevedo dos Santos. IV. Souza, BRENO GLAESSNER GOMES FERNANDES DE. V.

ALESSANDRA LIMA ROCHA

**Atividade antitumoral da *Morinda citrifolia* sobre o Tumor de Ehrlich: ensaio
in vitro e in vivo**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, com sede na Universidade Federal Rural de Pernambuco e ponto focal na Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Defendida em: / /2017.

1º Membro

2º Membro

3º Membro

4º Membro

4º Membro

“É preciso passar por uma metamorfose lenta e segura, para voar como uma borboleta madura. Olhar para trás e ler escrito no antigo casulo: Aqui jaz um inseto incerto e quase nulo. Ao olhar para frente e ler novamente: Aqui há uma libélula de luz que faz jus ao poder da criação”

Metamorfose – A. Grimaldi

*Aos meus amados Pais, Benoni e Conceição,
por acreditarem que a educação é um elemento
transformador na vida de um ser humano.*

Agradecimentos

A Deus por me dar forças a continuar nos dias cinzas e me fazer enxergar novamente as cores da vida.

A minha orientadora, Prof^a Ana Lucia Abreu Silva, por nunca ter desistido de me orientar ao longo dos onze anos que convivemos. Hoje deixo a orientadora, mas levarei em meu coração uma segunda mãe. Muito obrigada por tudo!

Aos meus pais, Benoni e Conceição, que mesmo diante de todas as dificuldades, me incentivaram a transformar o meu sonho em realidade;

Aos meus irmãos, Emannuelle e Ronaldo, por serem um porto seguro em todos os momentos;

Aos Fernando Almeida, pela paciência e a ajuda imprescindível na escrita. E a minha co-orientadora Prof^a Ana Paula Azevedo pela acolhida no LIAC e total apoio a essa pesquisa.

Ao André por toda ajuda nos experimentos realizados, ao longo destes anos e acima de tudo, o carinho a mim dedicado.

Ao Prof Fábio, pelos conselhos, orientações e principalmente pela amizade ao longo destes anos no laboratório de Anatomopatologia;

A equipe que me ajudou no desenvolvimento deste experimento: Eslen, Higor, Breno, Ana Eliza, Anderson, Gustavo, Isabel, Carol, Alana, Kelvin, Debora, Ailesio, Ranny, Gaby, Nathalya, Adriana, Mylena, Solange, Renata e Joyce;

Ao Programa de Pós-graduação Renorbio e a Fapema pelo auxílio ao longo do doutorado;

Meu sincero obrigada!

Resumo

Dada a preocupação quanto à alta incidência das neoplasias e baixa especificidade de antineoplásicos disponíveis, alguns fitoterápicos vem sendo utilizados como suplementos alimentares, imunomoduladores e antitumorais. *Morinda citrifolia* é uma planta medicinal conhecida por possuir diversas atividades biológicas, como anti-inflamatória, antiviral, antioxidante, antitumoral, etc. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antitumoral do extrato hidroalcoólico do fruto de *M. citrifolia* em camundongos Swiss com Tumor Ascítico de Ehrlich. Os animais foram divididos em 8 grupos: controle negativo, tratados com extrato hidroalcoólico do fruto de *M. citrifolia* nas concentrações de 125, 250, 500mg/Kg/dia, ciclofosfamida 40mg/kg/dia e associações de ciclofosfamida com o extrato hidroalcoólico de *M. citrifolia* nas concentrações 125, 250, 500mg/Kg/dia. Foram realizadas avaliações clínicas do desenvolvimento tumoral, hematológicas, dosagens de citocinas do tipo Th1, Th2 e Th17 e avaliação da taxa de apoptose por anexina V. In vitro realizou-se cultura de esplenócitos por 48h, para a dosagem de citocinas do tipo Th1, Th2 e Th17. O extrato hidroalcoólico do fruto de *M. citrifolia* não teve atividade antitumoral, levando a um aspecto mais hemorrágico do tumor. A associação extrato hidroalcoólico do fruto de *M. citrifolia* com ciclofosfamida não teve maior desempenho na atividade antitumoral, quando ao tratamento convencional, porém o número de leucócitos totais foi maior nos grupos com as associações. O tratamento com o extrato hidroalcoólico do fruto de *Morinda citrifolia* e associação com ciclofosfamida não alterou os níveis de citocinas in vitro ou in vivo em animais inoculados com tumor de Ehrlich. Em conclusão, o extrato hidroalcoólico de *Morinda citrifolia* não apresentou atividade antitumoral, mas conduziu um aumento discreto da contagem de leucócitos quando associada à ciclofosfamida

Palavra-chave: ciclofosfamida, extrato hidroalcoólico, noni, citocinas, anexina V, leucócitos

Abstract

Given the concern about the high incidence of neoplasias and the low specificity of available antineoplastic agents, some herbal medicines have been used as food supplements, immunomodulators and antitumorals. *Morinda citrifolia* is a medicinal plant known to have several biological activities, such as anti-inflammatory, antiviral, antioxidant, anti-tumor, etc. The present study had as objective to evaluate the antitumor activity of the hydroalcoholic extract of the fruit of *M. citrifolia* in Swiss mice with Ehrlich ascitic tumor. The animals were divided into 8 groups: negative control, treated with hydroalcoholic extract of the *M. citrifolia* fruit at concentrations of 125, 250, 500mg / kg / day, cyclophosphamide 40mg / kg / day and combinations of cyclophosphamide with the hydroalcoholic extract of *M. Citrifolia* at concentrations 125, 250, 500mg / kg / day. Clinical evaluations of tumor development, hematological, Th1, Th2 and Th17 cytokine dosages and evaluation of the apoptosis rate by annexin V were performed. In vitro splenocytes were cultured for 48 hours for Th1 type cytokine dosing, Th2 and Th17. The hydroalcoholic extract of the *M. citrifolia* fruit had no antitumor activity, leading to a more hemorrhagic appearance of the tumor. The combination of hydroalcoholic extract of the *M. citrifolia* fruit with cyclophosphamide had no higher performance in antitumor activity, when compared to conventional treatment, but the total number of leukocytes was higher in the groups with the associations. Treatment with the hydroalcoholic extract of the *Morinda citrifolia* fruit and association with cyclophosphamide did not alter cytokine levels in vitro or in vivo in animals inoculated with Ehrlich tumor. In conclusion, the hydroalcoholic extract of *Morinda citrifolia* showed no antitumor activity, but led to a slight increase in leukocyte count when associated with cyclophosphamide

Key words: cyclophosphamide, hydroalcoholic extract, noni, cytokines, annexin V, leukocytes

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: representativo de densidade de tamanho (FSC) versus granulidade (SSC) obtido após seleção da população de interesse por citometria de fluxo **38**
- Figura 2: representativo bidimensional de densidade de FL1/Anexina V/FITC versus FL2/PI utilizado para quantificar o percentual de células viáveis, apoptóticas e necróticas. **39**
- Figura 3 - Efeito do extrato hidroalcoólico de frutos de *M. citrifolia* no tumor ascítico de Ehrlich. Consumo de ração (A) e consumo de água (B) do tumor de Ehrlich ascítico em camundongos swiss após 7 dias de tratamento com extrato hidroalcoólico de fruto de *M. citrifolia*, ciclofosfamida e sua associação **41**
- Figura 4 - Efeito do extrato hidroalcoólico de frutos de *M. citrifolia* no tumor de Ehrlich ascítico. Circunferência abdominal (A), volume ascítico (B), total (C) e células tumorais (D) do Tumor de Ehrlich ascítico em camundongos swiss após 7 dias de tratamento com extrato hidroalcoólico de fruta de *M. citrifolia*, ciclofosfamida e sua associação. Os dados representativos significam \pm SEM (n = 5) de duas experiências independentes. ** p <0,01; *** p <0,001 quando comparado com o grupo não tratado por teste de Tukey **43**
- Figura 5 - Efeito do extrato hidroalcoólico de frutos de *M. citrifolia* no tumor de Ehrlich ascítico. Plaquetas (A) e Leucócitos (B) do tumor de Ehrlich ascítico em camundongos swiss após 7 dias de tratamento com extrato hidroalcoólico de fruta de *M. citrifolia*, ciclofosfamida e sua associação. Os dados representativos significam \pm SEM (n = 5) de duas experiências independentes. ** p <0,01; *** p <0,001 quando comparado com o grupo não tratado por teste de Tukey **45**
- Figura 6 - Efeito do extrato hidroalcoólico de frutos *Morinda citrifolia* na morte de células tumorais de Ehrlich ascítico. Contagem de células tumorais (A), apoptose precoce (B), necrose (C) e apoptose / necrose tardia (D) de células tumorais de Ehrlich ascítico de camundongos suíços após 7 dias de tratamento com extrato hidroalcoólico de fruta de *M. citrifolia*, ciclofosfamida e sua associação. Os dados representativos significam \pm SEM (n = 5) de duas experiências independentes. * P <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001 quando comparado com o grupo não tratado por teste de Tukey. **46**

Figura 7 - Efeito do extrato hidroalcoólico de frutos de *Morinda citrifolia* em níveis séricos de citocinas de camundongos suíços com tumor de Ehrlich ascitic. TNF- α (A) e IFN- γ (B) depois de 7 dias de tratamento com extrato hidroalcoólico de fruta de *M. citrifolia*, ciclofosfamida e sua associação. Os dados representativos significam \pm SEM (n = 5) de duas experiências independentes. ** p <0,01; *** p <0,001 quando comparado com o grupo não tratado por teste de Tukey.

LISTA DE TABELAS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1: Atividade de produtos naturais em tumor de Ehrlich | 23 |
| Tabela 2. Compostos identificados dos frutos, folhas e raízes de <i>M. citrifolia</i> | 25 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------------|-----------------------------------------------------------|
| µg/mL | Micrograma por mililitro |
| µL | Microlitro |
| BALB-c | Linhagem genética de rato Albino c. |
| BHK | Células de rim de hamster |
| Caco-2 | Células de adenocarcinoma de cólon humano |
| CBA | Cytometric Bead Array |
| Cm | Centímetros |
| COX2 | Ciclooxigenase 2 |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| EDTA | Ácido Etilenodiaminotetracético |
| EGFR | Receptor do fator de crescimento epidérmico |
| H | Horas |
| HCT-116 | Linhagem celular de câncer colorretal humano |
| Hep-2 | Linhagem de células epiteliais humanas |
| HER2 | Fator de crescimento epidérmico humano Receptor de tipo 2 |
| HIF-1α | proteína de fator de indução de hipoxia 1-alfa |
| HT-29 | Linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano |
| IFN-γ | Interferon gama |
| IL-10 | Interleucina 10 |
| IL-17 ^a | Interleucina 17 ^a |
| IL-2 | Interleucina 2 |
| IL-4 | Interleucina 4 |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| IL-8 | Interleucina 8 |
| IM | Intramuscular |
| i.p. | Intraperitoneal |
| LAN5 | Linhagem de células de melanoma B16-F10 |
| LLC | carcinomatose peritoneal pulmonar de Lewis |
| MA | Maranhão |
| MCF-7 | Linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano |

| | |
|---------------|-------------------------------------------------------------|
| MDA-MB-231 | Linhagem celular de Adenocarcinoma de mama humano |
| Mg | Miligrama |
| mg/kg | Miligrama por quilo |
| mg/kg | Miligrama por quilo |
| mL | Mililitro |
| MMTV-Neu | Ratos transgênico que expressão o oncogene do tumor mamário |
| PBS | Tampão fosfato-salino |
| PC-3 | Linhagem celular de câncer de próstata humano |
| PGE2 | Prostaglandina E2 |
| S-180 | Sarcoma 180 ou Tumor de Crocker |
| SID | Uma vez por dia |
| TAE | Tumor Ascítico de Ehrlich |
| Th-1 | T <i>helper</i> 1 |
| Th-17 | T <i>helper</i> 1 |
| Th-2 | T <i>helper</i> 2 |
| TNF- γ | Fator de Necrose Tumoral gama |
| TNF- α | Fator de Necrose Tumoral Alfa |
| Vero | Linhagem celular de rim de macaco-verde africano |

SUMÁRIO

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| REVISÃO DE LITERATURA..... | 18 |
| Aspectos gerais sobre neoplasias | 18 |
| Tumor de Ehrlich | 19 |
| CICLOFOSFAMIDA | 21 |
| <i>Morinda citrifolia</i> | 25 |
| ATIVIDADE ANTITUMORAL DE <i>M. citrifolia</i> | 28 |
| 3 HIPÓTESE | 32 |
| Objetivos | 33 |
| Objetivo geral | 33 |
| Objetivo específico | 33 |
| MATERIAIS E MÉTODOS | 34 |
| Coleta de <i>Morinda citrifolia</i> | 34 |
| Preparação do extrato hidroalcoólico de <i>Morinda citrifolia</i> | 34 |
| ANIMAIS | 34 |
| INDUÇÃO DO TUMOR NA FORMA ASCÍTICA..... | 35 |
| DELINEAMENTO EXPERIMENTAL | 35 |
| AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS..... | 36 |
| NECROPSIA DOS ANIMAIS, COLETA DE SANGUE, VOLUME DA ASCITE, ASPECTO DA ASCITE | 36 |
| AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS..... | 36 |
| REMOÇÃO DO BAÇO DOS ANIMAIS E CULTURA DE ESPLENÓCITOS..... | 37 |
| QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS Th-1, Th-2 e Th17 | 37 |
| ANEXINA V E IODETO DE PROPIDIO | 38 |
| ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 40 |
| 6.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 41 |
| 7.0 CONCLUSÕES..... | 49 |
| APENDICE 1..... | 60 |
| ANEXO 1 | 79 |

INTRODUÇÃO

A neoplasia maligna ou câncer é um grande problema de saúde pública de caráter inquestionável nas mais variadas partes do mundo e bastante presente nos países em desenvolvimento, como no Brasil. É atualmente a segunda causa de morte no país, podendo até mesmo, superar as doenças cardíacas previstas para os próximos anos. Essa afirmativa faz com que o câncer de mama seja o segundo mais frequente no mundo e no Brasil, sendo o mais comum a ocorrer em mulheres. Dados divulgados pela Organização Mundial de Saúde registraram cerca de 1.050.000 casos novos de câncer de mama no ano de 2012, e espera-se que, nas próximas décadas a incidência de câncer na população dos países em desenvolvimento corresponda a 80% dos mais de 20 milhões de casos novos estimados para 2025 (OMS – IARC 2014).

No Brasil, o biênio 2016-2017, a ocorrência tem sido de aproximadamente 600 mil casos novos de câncer. Com exceção do câncer de pele não melanoma (cerca de 180 mil casos novos), 420 mil casos novos de câncer estão ocorrendo. O perfil epidemiológico observado assemelha-se ao da América Latina e do Caribe, onde os cânceres de próstata (61 mil) em homens e mama (58 mil) em mulheres são os mais frequentes na atualidade. Observando-se individualmente os tipos mais frequentes, em homens são próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os cânceres de mama (28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) figurarão entre os principais, sem contar os casos de câncer de pele não melanoma. (MS – INCA, 2015).

O câncer é uma enfermidade que tem como terapias convencionais a cirurgia seguida de radioterapia e/ou quimioterapia as quais em sua maioria leva à morte celular por mecanismo que induzem a apoptose ou por inibição da proliferação celular, tais mecanismos não são seletivos levando a morte tanto de células normais como neoplásicas.

Nos últimos trinta anos, os quimioterápicos oriundos de produtos naturais vêm sendo utilizados no tratamento de neoplasias, deste modo a

prospecção desses produtos tem aumentado com vista a obtenção de novos medicamentos, que possam levar a cura e/ou o aumento de sobrevivência dos pacientes.

A legislação brasileira define fitoterápico como produtos tradicionais obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e efetividade seja baseada em dados de uso seguro e efetivo publicados na literatura técnico-científica e que sejam concebidos para serem utilizados sem a vigilância de um médico para fins de diagnóstico, de prescrição ou de monitorização. Não se considera medicamento fitoterápico ou produto tradicional fitoterápico aquele que inclua na sua composição substâncias ativas isoladas ou altamente purificadas, sejam elas sintéticas, semissintéticas ou naturais e nem as associações dessas com outros extratos, sejam eles vegetais ou de outras fontes, como a animal (ANVISA, 2014).

Natural do sudeste da Ásia, o noni (*Morinda citrifolia*) apresenta um alto consumo no Taiti (maior produtor mundial) podendo também ser encontrado na Polinésia, Malásia, Filipinas e algumas regiões do Japão e da China. É uma planta de pequeno porte que pode atingir de 9 a 10 metros de altura e cresce em temperatura e umidade adequadas, o seu fruto é bastante parecido com a fruta-do-conde e na medicina popular oriental vem sendo utilizado para combater desde dores no corpo até tumores ou diabetes. No entanto, ele ainda é visto com cautela no ocidente devido à falta de estudos científicos acerca de seus efeitos no organismo e à ligação com possíveis danos no fígado e nos rins.

Kharis e Azimahtol (2004) demonstraram que o suco do noni tem atividade antiproliferativa por induzir apoptose em adenocarcinoma de pulmão, o que também foi observado em tumor de mama em camundongo BALB/-c, que além de diminuir o tamanho do tumor, também promoveu a ativação de apoptose (TASKIN et al, 2009).

A utilização de modelos experimentais em neoplasias, principalmente, o tumor de Ehrlich, que é um tumor espontâneo da glândula mamária de camundongo, é muito comum na avaliação da atividade e do mecanismo de ação antitumoral de diferentes compostos (VERLENGIA, 1994).

Considerando o aumento do número de casos de neoplasias em animais domésticos e a incipiente oncologia veterinária, faz-se necessário a busca de novas drogas, bem como, a obtenção de novos protocolos terapêuticos que visem amenizar o sofrimento dos animais e daqueles que os assistem. Desta forma, a droga vegetal de *M. citrifolia* foi avaliada frente ao tumor sólido e ascítico de Ehrlich, buscando conhecer a sua possível atividade e mecanismo de ação antitumoral em camundongos com adenocarcinoma mamário.

Para melhor aproveitamento dos dados esta tese foi escrita no modelo clássico e ao final do texto estão anexados dois artigos científicos: o primeiro “One Plant, Many Uses: A Review of the Pharmacological Applications of *Morinda citrifolia*” (Apêndice 1), trata-se de um artigo de revisão já publicado no periódico *Phytotherapy Research* (Fator de Impacto: 2.694) e o outro derivado dos experimentos intitulado “*Morinda citrifolia* Linn improves leucocytes count in swiss mice with Ehrlich ascites tumor treated in association with cyclophosphamide” (Apêndice 1), que foi submetido ao periódico *BMC Cancer* (Fator de Impacto: 3.288).

REVISÃO DE LITERATURA

Aspectos gerais sobre neoplasias

A palavra neoplasia é originária do termo neoplasma (*neo*, novo e *plasia*, formação). O conceito de neoplasia é bem amplo, mas no geral pode ser definida como uma massa anormal de tecido que se expande por meio do crescimento desordenado de células. Popularmente, as neoplasias são conhecidas como câncer, que geralmente é um termo associado a neoplasias malignas. De uma maneira geral, as neoplasias são conhecidas também pela palavra “tumor”, que é um termo associado a neoplasias tanto benignas quanto malignas (JONES et al., 2000). Para o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o conceito de câncer é o usado a um conjunto, composto por mais de 100 doenças, que possuem em comum o ciclo celular desordenado e a capacidade de invadir órgãos e tecidos (PORTUGAL, 2012).

Parte do equilíbrio homeostático do organismo é mantido por meio da adaptação celular às alterações do meio interno, estas realizam proliferação em resposta aos sinais externos executando funções de reparação tecidual, substituição de células defeituosas e quando necessário ocorre a morte celular programada, também conhecida por apoptose sendo que estes mecanismos tendem a cessar quando termina a necessidade de adaptação, isso é determinado pela ação de um conjunto de sinais de proliferação-repressão que quando ativados permitem que as células se retirem do ciclo de proliferação, isso ocorre em um estado normal de homeostase celular. Quando as alterações do meio interno ultrapassam os limites morfo-fisiológicos das células, ocorre lesão irreversível, com diferenciação ou mesmo indiferenciação das células que compõe o tecido afetado, por fim surge uma nova formação tecidual, a neoplasia, usualmente denominado câncer. Sabe-se que o câncer, seja herdado ou não, é causado pela instabilidade genômica mediada por alterações no DNA, incluindo anormalidades cromossômicas, mutações, alterações na sequência do gene, e ativação e desativação de oncogenes e genes supressores de tumor (WILLBANKS et al, 2016).

O número de casos de neoplasias em animais tem aumentado significativamente nos dias atuais (DOBSON & LASCELLES, 2011). Essa maior frequência está relacionada à melhoria no cuidado dos animais de companhia, favorecendo o aumento da expectativa de vida.

HANSEN & KHANNA (2004) estimaram que 8 milhões de animais, entre cães e gatos, irão desenvolver algum tipo de neoplasia, o que desafia os profissionais da medicina veterinária, pois os tratamentos atuais são baseados em protocolos que além de pouco eficazes são de alto custo, envolvendo cirurgias, quimioterapias e radioterapias. Segundo GARCIA et al (2009), apesar da evolução da oncologia veterinária nas últimas décadas, aproximadamente 50% dos pacientes oncológicos evoluem para óbito.

O desenvolvimento de novas estratégias seguras e eficazes para tratamento do câncer é extremamente necessário. Nesse contexto, as plantas medicinais representam uma fonte de produtos biologicamente ativos, cujos compostos tem potencial terapêutico, como por exemplo, o sulfato de vincristina e vimblastina que foram isolados da planta *Catharanthus roseus*, o paclitaxel das plantas *Taxus baccata L.* e *Taxus brevifoliae o Nutt*, irinotecan e topotecan derivados da *Camptotheca acuminata* (BRANDÃO et al, 2010).

Tumor de Ehrlich

O tumor de Ehrlich é um adenocarcinoma mamário de camundongos que foi descrito pela primeira vez por Paul Ehrlich em 1905. É um modelo bastante utilizado em estudos nas áreas de oncologia, imunologia e farmacologia, principalmente para avaliar a influência do stress sob o câncer, efeitos de extratos vegetais, drogas anti-inflamatórias, agentes químicos e outros (Tabela 1) (QUILLES, 2010).

A indução do tumor de Ehrlich ocorre por meio de transplante de células tumorais por via subcutânea ou intraperitoneal. A forma sólida desenvolve-se quando a inoculação das células tumorais é realizada em tecido subcutâneo ou no coxim plantar do camundongo. Entretanto, ao administrar a suspensão de células tumorais no peritônio, o camundongo desenvolverá a forma ascítica do

tumor. Após o sétimo dia de inoculação observa-se desenvolvimento da massa tumoral com conseqüente aumento do volume intraperitoneal (NERY, 2004).

As principais características do tumor ascítico são crescimento rápido, comportamento agressivo, desenvolvimento de neoplasia em todas linhagens de camundongos estudadas, reação inflamatória local, o que explica aumento na produção do fluido ascítico e conseqüente distensão da cavidade abdominal. Normalmente há evolução para óbito no período máximo de 30 dias devido a fatores como a pressão mecânica exercida pelo fluido ascítico, e hemorragias (NASCIMENTO et al., 2006).

A forma sólida caracteriza-se histologicamente por apresentar células pleomórficas, com citoplasma abundante, com presença ou não de vacúolos, escassez de estroma, poucas células inflamatórias e alto índice mitótico (PORTUGAL, 2012). O exame citológico do líquido ascítico do tumor de Ehrlich revela a presença de células pleomórficas e anaplásicas, aumento da relação núcleo-citoplasma e hipercromasia nuclear. Segundo Guerra (1983), após 10 dias de inoculação do tumor, 90% das células peritoneais são células neoplásicas.

No tumor de Ehrlich ascítico verifica-se uma quantidade de fluido levemente viscoso e com aspecto leitoso de coloração cinza-claro, contendo em torno 10 milhões de células neoplásicas em cada 0,1ml em células tumorais, pleomórficas e com nucléolos únicos ou múltiplos, de 4 a 7 dias após a inoculação há formação de aproximadamente 10 ml de líquido ascítico (SILVA et al., 2006; OZASLAN et al., 2011).

A rápida divisão celular na fase proliferativa e o acúmulo de ascite ocorre paralelamente à proliferação celular, a fase de quiescência, o número de células permanece mais constante. Além disso, é observado declínio na concentração de ATP, mudanças morfológicas e metabólicas nas células, diminuição no número de mitocôndrias e na síntese de RNA e DNA. A morte do animal se dá em período variável, em decorrência do aumento da pressão intra-abdominal, processo hemorrágico, compressão dos órgãos adjacentes e a liberação de substâncias tóxicas pelas células tumorais mortas (OZASLAN ET AL., 2011). Haveit (1965), demonstrou que sobrevivida dos animais, tem uma

diminuição quando o aspecto da ascíte apresenta-se na forma hemorrágica, sugerindo que os animais veem a óbito devido por processo hemorrágico.

CICLOFOSFAMIDA

A ciclofosfamida é um agente alquilante inativo, de pequeno peso molecular, que é metabolizado principalmente pelo fígado, pelo sistema do citocromo P-450 que, após várias oxidações, dá origem a vários metabólitos (KIM et al, 1985). Trata-se de uma das drogas de eleição para o tratamento de diversos tipos de cânceres tanto para cães quanto para gatos (SONRENMO, 2003) além de animais de produção como ovinos (Garcia et al, 2004); e, têm como alvo aquelas células que apresentam características peculiares como atividade proliferativa acentuada, o que inclui também tecidos com células normais com natureza de constante mitose, semelhante as vilosidades intestinais, medula óssea e folículos pilosos; dessa forma, é comum encontrarmos como efeito colateral da quimioterapia, cistite hemorrágica estéril, mielossupressão, sinais gastrointestinais e alopecia (NELSON e COUTO, 2001; DAGLI, 2002; ROSENTHAL, 2004) e como achados laboratoriais é comum a linfopenia, sendo este resultado muito mais expressivo que qualquer outro e a hipogamaglobulinemia nos animais em tratamento reforçando assim o efeito imunodepressor da droga (Garcia et al, 2004; SILVA, 2000).

A quimioterapia convencional utilizando-se as drogas de eleição normalmente causam lesões na síntese de ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA) ou na replicação celular, de modo a interromper a divisão ou morte celular, alterando inclusive as células normais (O'KEEFE & HARRIS, 1990, DAGLI, 2002). Reações de hipersensibilidade devido ao uso de ciclofosfamida têm sido largamente descritas (KNYSAK et al, 1994; POPESCU et al, 1995; THONG et al, 2002), podendo ser atribuídas à droga em si ou a um dos seus metabólitos secundários, tais como 4-hidroxiciclofosfamida (CROMAR et al, 1991), mostarda fosforamida (KRITHARIDES et al, 1987) ou ifosfamida (POPESCU et al, 1995).

De um modo geral, as reações indesejadas estão relacionadas com todas as classes de agentes antineoplásicos, dentre estes, os agentes alquilantes são os quimioterápicos mais antigos e utilizados para o tratamento do câncer desde 1940, fazem uma interação com o DNA inibindo a síntese de novo material genético causando lesão irreparável do mesmo (ALMEIDA et al, 2006; (HURLEY, 2002). Estes agentes são considerados ciclo-celular não específicos, ou seja, têm a capacidade de exterminarem as células tumorais independentemente de estarem no ciclo celular ou estarem em repouso causando seus efeitos e encontram-se divididos em mostardas nitrogenadas, alquil sulfonados, nitrosuréias, triazenos (ALMEIDA et al, 2006).

No tratamento de diversos tipos de canceres, a ciclofosfamida tem sido largamente utilizada e em experimentos envolvendo Tumor de Erlich, a droga tem demonstrado ser eficaz na diminuição da fração mucosa proteica do carcinoma ascítico em roedores logo após a primeira aplicação por via subcutânea (ABREU & ABREU, 1973); entretanto Urano et al (1970), demonstram que em tumores sólidos existe uma relação dose-célula quanto à sensibilidade à ciclofosfamida e que tumores sólidos podem conter tanto populações celulares sensíveis quanto resistentes à droga e/ou seus compostos; devendo-se portanto, levar em consideração que uma diferença no estado celular no tumor e/ou determinados estágios no ciclo de geração celular são os principais fatores que induzem um tipo de resposta à ciclofosfamida ou frações; por esse fator não deve ser descartada a possibilidade de ser administrada em associação com outras drogas, inclusive com fitoterápicos que ajam com como coadjuvantes ou auxiliares na tentativa de diminuição dos efeitos indesejáveis tais como leucopenia dentre outros (KUTTAN e DAVIS, 1998) ou na tentativa de aumentar a sobrevivência dos animais portadores de tumor de Ehrlich a fim de que seja obtido um efeito sinérgico *in vivo* sobre o dano citogenético causado pelo quimioterápico.

Tabela 1: Atividade de produtos naturais em tumor de Ehrlich

| Gênero/Espécie | Modelo/ concentrações | Resultados/ Conclusão | Veículo | Referência |
|------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| <i>Curcuma zedoaria</i> | <i>In vivo</i> | Redução do tumor, aumento da sobrevida | Extrato metanólico | PROSANTO et al., 2015 |
| <i>Curcuma amada</i> e <i>Curcuma zedoaria</i> | <i>In vivo</i> | atividade antineoplásica, antioxidante | Extrato de acetona de <i>C. Amada</i> Extrato isopropilo de <i>C. zedoaria</i> | KUMAR et. al., 2012 |
| <i>Terminalia arjuna</i> | <i>In vivo</i> e <i>in vitro</i> | Redução do volume tumoral | Ácido arjunólico da casca | NEHAL e ELSHERBINY, 2016 |
| <i>Mussaenda roxburghii</i> | <i>In vivo</i> / 20, 40 e 60 mg/kg/dia) | Inibição do crescimento de células e aumento na sobrevida | Extrato metanolico | FARHADUL et. al., 2015 |
| <i>Trichosanthes dioica</i> | <i>In vivo</i> | Redução do tumor, aumento da sobrevida | Extrato hidroalcoólico da raiz | BHATTACHARYA et al., 2011 |
| <i>Argyrea nervosa</i> | <i>In vivo</i> | Redução do tumor, aumento da sobrevida | Extrato metanólico | SHARMA, 2015 |
| <i>Zizyphus</i> spp. | <i>In vivo</i> | Melhoranfo nível de corticosteroidee marcadores imunológicos | Extrato das folhas | HASSAN e ABDEL-GAWAD, 2010 |

| | | | | |
|-------------------------------|----------------|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------|
| <i>Anthocephalus cadamba</i> | <i>In vivo</i> | Redução do tumor, aumento da sobrevida | Extrato metanólico | DOLAI, et. al., 2012 |
| <i>Caesalpinia bonducella</i> | <i>In vivo</i> | Redução do tumor, aumento da sobrevida | Extrato das folhas | GUPTA et al., 2004 |
| <i>Thevetia peruviana</i> | <i>In vivo</i> | Redução do tumor, aumento da sobrevida | Extratos metanólico | HALDAR, et. al., 2015 |
| <i>Uncaria tomentosa</i> | <i>In vivo</i> | Redução na proliferação do tumor | Extrato etanólico | MIRANDA E FREITAS, 2008 |
| <i>Euphorbia tirucalli</i> | <i>In vivo</i> | Redução do tumor, aumento da sobrevida, e da celularidade da medula óssea | Extrato hidroalcoólico | DOS SANTOS, et. al. 2016. |
| <i>Ageratum conyzoides L.</i> | <i>In vivo</i> | Doses de 50 mg/kg inibiram o crescimento tumoral | Frações clorofórmica e metanólica do extrato das folhas | MOMESSO et. al., 2009 |
| <i>Alomia myriadenia</i> | <i>In vivo</i> | Os grupos não apresentaram diferença significativa, desenvolveram degeneração hepática | Produto isolado de <i>Alomia myriadenia</i> (miriadenólídeo) | VERÇOSA et al., 2006 |

Morinda citrifolia

Morinda citrifolia é uma planta de pequeno porte originária da Polinésia, que produz o fruto popularmente conhecido como noni. Sua classificação taxonômica é descrita da seguinte forma: Reino Plantae, Filo Magnoliophyta, Classe Magnoliopsida, Ordem Rubiales, Família Rubiaceae, Gênero *Morinda*, Espécie *Morinda citrifolia* (INBiO, 1997). A variedade de maior importância econômica e medicinal é a *Morinda citrifolia* (RAZAFIMANDIMBISON *et al.*, 2010).

A planta pode chegar de 9 a 10 metros de altura e cresce em temperatura e umidade adequadas. Produz flores e frutos durante todo o ano, suas folhas são largas, simples e opostas com 7 a 25 cm de largura e 20 a 45 cm de comprimento, de coloração verde escura. O fruto é oval e atinge de 4 a 7 cm de tamanho e cerca de 100 a 300 gramas. Ela tem sido utilizada tanto na alimentação quanto no tratamento de doenças, tais como artrites, hipertensão arterial, úlceras gástricas, diabetes e câncer (WANG *et al.*, 2002). É considerada uma planta adaptogênica, com propriedades que exercem influência de homeostase no organismo.

As pesquisas sobre os componentes fitoquímicos de noni despertam interesse dos pesquisadores devido o uso medicinal e crescente uso como suplemento dietético botânico (PAWLUS & KINGHORN, 2007). Os principais compostos isolados de noni podem ser visualizados na Tabela 2.

Tabela 2. Compostos identificados dos frutos, folhas e raízes de *M. citrifolia*

| Parte da planta | Composto | Classificação química | Referência |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------|-----------------------|----------------------------------------------------------------|
| Folha | Americanin A | Ligana | Kovendan <i>et al.</i> (2012) e Kovendana <i>et al.</i> (2014) |
| | Prolina Leucina Cisteína Metionina Glycine Histidina | Aminoácido | Shovic <i>e</i> Whistler (2001), Elkins (1998) e Sang |

| | | | |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | Isolucine Ácido glutâmico Fenilalanina Serina Treonina Tryptofano Tirosina Arginina Valina | | et al. (2001) |
| | Quercetina glucopiranoside | 3-O-β-D- | Flavonóides |
| | Quercetina lrhamnopiranosil-(1-6)-β- digropiranoside | 3-O-a- | |
| | Ácido ursólico | | Triterpenóides Chan-Blanco et al. (2006) e Sang et al. (2001) |
| | β-sitosterol | | Esteróis |
| | Citrifolinoside B | | Iridóides Elkins (1998), Sang et al. (2001) e Dittmar (1993) |
| | Kaempferolm Dglucopiranosil-(1-2)-a- Lrhamnopiranosil-(1-6)-βD- galactopiranoside | 3-O-β- | Derivados de clorofila Shovic e Whistler (2001) e Wang et al. (2002) |
| | Escopoletina | | Derivado de cumarina Sang et al. (2001) |
| | | | Sang et al. (2001) |
| | | | Kamiya et al. (2010) and Mohd Zin et al. (2007) |
| Fruto | Ácido octanóico (caprílico) Ácido hexanóico Ácido capróico | | Ácido graxo Elkins (1998), Dittmar (1993), Wang et al. (1999, 2002), Mohd Zin et al. (2007), Jayaraman et al. (2008), Liu et al. (2001) e Zhang et al. |
| | Vitamina C Vitamina E Niancina | | Vitaminas |

| | | | |
|------|--------------------------------------------------------------|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | | | (2014) |
| | Manganês, Selênio | Elementos químicos | Zin et al. (2002) e West et al. (2011) |
| | Ácido Asperuloside | Iridóide | |
| | Quercetina | Flavonóides | Zin et al. (2002) e West et al. (2011) |
| | 2,6-di-O-(β-Dglucopiranosil-1-O-octanoil-b-D glucopiranosose | Éster de ácidos graxos | West et al. (2012) |
| | 6-O-(β-D-glucopiranosil-1-O-octanil-β-D glucopiranosose | | Elkins (1998), Sang et al. (2001), Liu et al. (2001), Morton |
| | Damnacanthal | Antraquinonas | (1992), Yu (2004) e Deng et al. (2007b) |
| | Americanin A | Ligana | Nelson (2006), Kamiya et al. (2010), Jayaraman et al. (2008) e Lin et al. (2013) |
| | | | Liu et al. (2001), Wang et al. (1999), Zhang et al. (2014) and Akihisa et al. (2012) Chan-Blanco et al. (2006) e Kamata et al. (2006) |
| Raiz | 8-hidroxi-8-metoxi-2- | Antraquinona | Su et al. (2005) Elkins (1998), |

| | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|------------------------------------------------------------|
| metil-antraquinona, rubiadina 1,3-di-hidroxi-6-metil antraquinona Morenone 1 Morenone 2 | s | Morton (1992) e Inoue et al. (1981) |
| Asperuloside | Iridóide | Elkins (1998) e Solomon (1999) |
| Quercetina | Flavonóides | Bushnell et al. (1950) |
| Escopoletina | Derivado de cumarina | Mohd Zin et al. (2007) e Mandukhail et al. (2010) |
| Damnacanthal | Antraquinona s | Sang et al. (2001) e Jensen et al. (2005) |
| | | Nualsanit et al. (2012) |

Adaptado de Assi et al. (2015) e Oliveira et al. (2016).

ATIVIDADE ANTITUMORAL DE *M. citrifolia*

O efeito antiproliferativo do noni já foi descrito em várias linhagens celulares, como em células de rim de hamster (BHK), células Vero, Hep2, MCF7, neuroblastoma e células de melanoma B16-F10 (LAN5) (ARPORNSUWAN & PUNJANON, 2006; CANDIDA et al., 2014).

O suco de noni reduziu a expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), um biomarcador de adenocarcinoma de pulmão (LIM et al., 2016), além de ter ação no carcinoma pulmonar de Lewis em camundongos singênico (HIRAZUMI et al., 1994). Na composição química do suco encontra-se uma substância rica em polissacarídeos, o noni-ppt, que possui atividade antitumoral frente à carcinomatose peritoneal pulmonar de Lewis (LLC). A administração terapêutica do noni-ppt aumentou significativamente a sobrevivência de camundongos portadores deste tumor (HIRAZUMI & FURUSAWA, 1999).

O suco do fruto de *M. citrifolia* isoladamente ou associado ao quimioterápico doxorrubicina apresentou potencial citotóxico em carcinoma mamário de camundongos BALB/c. De acordo com os autores essa atividade antineoplásica foi induzida via ativação da caspase-3 (TASKIN et al., 2009).

M. citrifolia é usada na medicina popular como suplemento alimentar em pacientes com diferentes tipos de câncer. Diversos trabalhos têm demonstrado a ação desta planta sobre células tumorais, sobre vias envolvidas na resposta imunológica, como a supressão de ciclooxygenase 2 (COX2), marcadores inflamatórios e aumento do gene supressor de tumor (LIM et al., 2016). A interferência do noni também se estende à inibição de mutações gênicas: compostos carcinogênicos ligam-se de forma covalente ao DNA do indivíduo, formando estruturas denominadas adutos que, se não reparados, provocam mutações. O noni pode ser usado para prevenir a formação dessas estruturas (WANG & SU, 2001).

O suco do fruto de noni tem a capacidade de regular negativamente, e de maneira acentuada, a expressão da proteína HIF-1 α induzida por manganês, em células da linhagem A549 de câncer de pulmão humano. Isso sugere os efeitos benéficos de noni sobre neoplasias pulmonares em que o manganês e a superexpressão de HIF-1 α desempenham papéis fundamentais, já que a exposição ao manganês é um fator de risco para muitas doenças pulmonares (JANG, 2012).

Em ensaios in vitro, o extrato da folha fresca de *M. citrifolia* apresentou efeito inibitório sobre células KB (carcinoma epidermoide humano), HeLa (carcinoma cervical humano), MCF-7 (adenocarcinoma mamário) e HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), bem como em linhagem de células Vero (rim de macaco-verde africano), podendo agir como um suplemento alimentar na quimioprevenção contra câncer epidermóide e cervical (THANI et al., 2010). Já a fração acetato de etila do extrato inibiu a proliferação de células MCF-7 e MDA-MB-231, ambas associadas ao adenocarcinoma mamário. Esse efeito é atribuído ao aumento do número de células em apoptose e à estagnação das fases do ciclo celular (SHARMA et al., 2016).

Em cultivo de células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2), o tratamento com as frações etanólica e acetato de etila do extrato do fruto de noni reduziram a oxidação intracelular e a inflamação, através da redução de espécies reativas de oxigênio intracelulares, e suprimiu significativamente a produção de COX-2, IL-8 e da prostaglandina E2 (HUANG et al., 2015).

O suco de noni em camundongos transgênicos MMTV-Neu reduziu significativamente o peso e o volume do tumor de mama HER2-positivo. No entanto, a latência desse tumor e a incidência de metástases não foram afetadas pelo tratamento. Esses resultados, ao serem extrapolados para seres humanos, sugerem que mulheres que consomem o suco de noni com outros propósitos medicinais não teriam risco maior ou menor de desenvolver a doença, mas caso apresentassem tal neoplasia mamária, o suco de noni seria capaz de melhorar a resposta ao tratamento (CLAFSHENKEL et al., 2012).

M. citrifolia apresentou potencial citotóxico em células do tumor de Ehrlich em camundongos BALB/c tratados com o liofinizado do suco, demonstrando ser útil no tratamento de carcinoma mamário, seja utilizado isoladamente ou em conjunto com a droga doxorubicina, um potente agente anticâncer. Seu efeito é resultante da indução da apoptose (TASKIN et al., 2009).

Quando utilizado no tratamento do sarcoma 180 (S-180) ou tumor de Crocker em camundongos, o noni apresentou atividade antitumoral com taxa de cura de entre 25 a 45%, e mostrou efeito sinérgico ou aditivo quando combinado com um largo espectro de fármacos quimioterapêuticos (FURUSAWA et al., 2003).

O damnacanthol isolado a partir da fração clorofórmica do extrato da raiz de *M. citrifolia* inibe significativamente a reprodução de células RAS, precursoras de diversos tumores malignos (HIRAMATSU et al., 1993). Em células MCF-7, esse composto apresentou atividade antiproliferativa após 72 horas de tratamento, em uma concentração de 8,2µg/ml, e induziu a interrupção do ciclo celular na fase G1, além do processo de apoptose, através da ativação do gene p21 e caspase-7 (AZIZ et al., 2014). Também inibiu o

crescimento de várias linhas celulares de câncer: câncer colorretal (HCT-116), adenocarcinoma de cólon humano (HT-29), câncer de mama (MCF-7) e câncer de próstata (PC-3), de forma dose-dependente e tempo-dependente (NUALSANIT et al., 2012; SUKAMPORN et al., 2016).

Um estudo clínico de fase I, envolvendo pacientes em estágio avançado de câncer, buscou avaliar qual a dose máxima diária recomendada a esses pacientes. A dose máxima tolerada foi de 3 gramas (seis cápsulas de 500mg do extrato seco do fruto, quatro vezes ao dia), embora não tenha sido relatado nenhum caso de toxicidade da dose. A ingestão de três ou quatro cápsulas, quatro vezes ao dia, é recomendada no controle da fadiga, dor e manutenção da função física. A escopoletina, um componente bioativo do extrato do fruto do noni, é mensurável no sangue e na urina após sua ingestão, e pode ser utilizado no estudo da farmacocinética do noni em pacientes com câncer (ISSELL et al., 2009).

3 HIPÓTESE

O extrato hidroalcoólico do fruto de *M. citrifolia* e associação com ciclofosfamida possui atividade antitumoral em camundongos com tumor ascítico de Ehrlich.

Objetivos

Objetivo geral

Avaliar a atividade antitumoral e imunomoduladora do extrato hidroalcoólico do fruto de *Morinda citrifolia* in vitro e in vivo.

Objetivo específico

Avaliar o desenvolvimento tumoral em camundongos inoculados com tumor de Ehrlich e tratados com extrato hidroalcoólico do fruto de *Morinda citrifolia* e associação com ciclofosfamida;

Avaliar o potencial do extrato hidroalcoólico do fruto de *Morinda citrifolia* e sua associação com ciclofosfamida em induzir apoptose/necrose em células do tumor de Ehrlich em modelo murino;

Avaliar os níveis de citocinas in vitro em cultura de esplenócitos de animais inoculados com tumor de Ehrlich e tratados com extrato hidroalcoólico do fruto de *Morinda citrifolia*;

Avaliar o perfil de citocinas no soro de camundongos inoculados com tumor de Ehrlich e tratados com extrato hidroalcoólico do fruto de *Morinda citrifolia* e associação com ciclofosfamida.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta de *Morinda citrifolia*

A planta foi coletada na Fazenda Escola da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), no Campus de São Luís – MA, onde foram coletados galhos da planta com folhas, flores e frutos de aproximadamente 30 cm de comprimento e após, foram levadas para o Herbário da UEMA, onde foi realizada a identificação botânica, sendo a exsicata depositada sob o número 2346.

Preparação do extrato hidroalcoólico de *Morinda citrifolia*

Os frutos coletados foram lavados e cortados, posteriormente colocados em estufa de secagem por 72h. Após a secagem, a matéria seca foi moída em moinho de facas, guardado em frascos âmbar até a diluição no solvente. O extrato foi obtido na proporção de 1:2:2, colocado por 72h e posteriormente levado a um rotoevaporador até sua secagem para obter 12,7g (25,4% p/p) do extrato hidroalcoólico.

ANIMAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos fêmea *Swiss* com idade aproximada de 6 a 8 semanas, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual do Maranhão. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, forradas com xilana estéril e tampadas com grades inoxidáveis, em sala climatizada com temperatura constante de 20°C, com ciclos de claro-escuro de 12 h. Ração e água estéreis foram fornecidas aos animais *ad libitum*. Os experimentos com animais foram realizados de acordo com os protocolos do Comitê de Ética e Experimentação Animal 09/2015.

INDUÇÃO DO TUMOR NA FORMA ASCÍTICA

A linhagem tumoral de Ehrlich é mantida no Laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão, através de sucessivas passagens intraperitoneais entre animais. O Tumor de Ehrlich foi inoculado em camundongos intraperitonealmente (ip) com 0,2 mL de uma suspensão de células tumorais contendo 5×10^6 células/mL, provenientes da cavidade peritoneal de camundongos doadores. Após a retirada do líquido ascítico do peritônio de camundongos doadores, o número e a viabilidade das células foram determinados pelo método de exclusão do corante Trypan-blue 0,2%, e câmara hemocitométrica, considerando adequado em 99% de viabilidade. Após a determinação da viabilidade, procedeu-se a inoculação por via intraperitoneal nos camundongos.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O ensaio com o tumor ascítico de Ehrlich teve a duração de 7 dias de tratamento. Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais (n=5), com início do tratamento 24h após a inoculação:

- 1) animais controle positivo, inoculados com Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE), administração de solução salina (PBS) por gavagem/ SID;
- 2) animais inoculados com TAE, tratados com extrato hidroalcoólico de *Morinda citrifolia* 125 mg/animal por gavagem/ SID;
- 3) animais inoculados com TAE, tratados com extrato hidroalcoólico de *Morinda citrifolia* 250 mg/animal por gavagem/ SID;
- 4) animais inoculados com TAE, tratados com extrato hidroalcoólico de *Morinda citrifolia* 500 mg/ animal por gavagem/ SID;
- 5) animais controle positivo, inoculados com TAE, administração de ciclofosfamida 40mg/ animal por via intraperitoneal/ SID;
- 6) animais inoculados com TAE, tratados com ciclofosfamida 40mg/kg por via intraperitoneal e associação do extrato hidroalcoólico de *Morinda citrifolia* 125 mg/ animal por gavagem/ SID;

- 7) animais inoculados com TAE, tratados com ciclofosfamida 40mg/kg por via intraperitoneal e associação do extrato hidroalcoólico de *Morinda citrifolia* 250 mg/ animal gavagem/ SID;
- 8) animais inoculados com TAE, tratados com tratados com ciclofosfamida 40mg/kg por via intraperitoneal e associação do extrato hidroalcoólico *Morinda citrifolia* 500 mg/ animal por gavagem/ SID.

AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS

Avaliação clínica durante o tratamento foi diária, observando-se a presença ou ausência de tais sinais: piloereção, diarreia, salivação, mobilidade, consumo de ração e água.

NECROPSIA DOS ANIMAIS, COLETA DE SANGUE, VOLUME DA ASCITE, ASPECTO DA ASCITE

Após 7 dias de tratamento, os animais de cada grupo foram eutanasiados por indução anestésica profunda por via intramuscular, usando xilazina 10mg/kg/IM e ketamina 90mg/kg/IM, na face posterior da coxa do animal. Após anestésiar os animais, o sangue foi coletado por via intracardiaca com auxílio de tubos de micro-hematócrito e distribuído em dois microtubos de 1,5 mL, um sem e outro com 5 µL de EDTA 10% (p/v). Em cada animal, foi feita uma incisão longitudinal na cavidade abdominal para coleta do líquido ascítico com auxílio de uma pipeta de Pasteur. O líquido ascítico contendo as células tumorais foi analisado quanto ao seu aspecto, sendo classificado com ausente, seroso, sero-sanguinolento e sanguinolento. Após esta etapa o volume da ascite foi medido em tubos falcon estéreis. Nos casos em que não havia líquido ascítico, foi feita lavagem da cavidade abdominal, utilizando 1 mL de solução de NaCl 0,9% (p/v), estéril, para se recuperar as células tumorais.

AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Os perfis hematológicos foram determinados por meio da realização de hemogramas no Laboratório Simetra. As determinações foram realizadas em contador hematológico de células semi-automático do tipo POKET/ Roche, apropriado para mensuração de parâmetros hematológicos veterinários. O volume total de sangue coletado de cada animal foi de aproximadamente 50µL, acondicionados em eppendorfs de 1,5mL, previamente identificados, contendo 5µL de EDTA (Etilenodiaminotetracético) como anticoagulante. Os parâmetros avaliados foram: concentração de hemoglobina, hematócrito, hemácia, leucócitos, e número de plaquetas.

REMOÇÃO DO BAÇO DOS ANIMAIS E CULTURA DE ESPLÊNOCITOS

O baço foi removido com auxílio de uma pinça, sendo em seguida lavado em solução salina estéril e transferido para um tubo contendo 9mL de meio RPMI-1640 (Cultilab). A seguir o baço dos animais foi macerado com 3mL de PBS em Tamis com o êmbolo de seringa de 5mL, refrigerado a uma temperatura de 4°C. Retirou-se 90µL da solução, após a trituração do baço 10µL de cristal violeta para a contagem total de células. O número de células na suspensão foi contado em câmara hemacitométrica após diluição (1:1) das células em azul de tripan 1% para a contagem de células viáveis para o ajuste de concentração de plaqueamento 2×10^6 células/mL em meio de RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino no volume de 100µL por poço. Após 48 horas de incubação em estufa de CO₂ (5%) o sobrenadante foi retirado e armazenado para dosagem de citocinas.

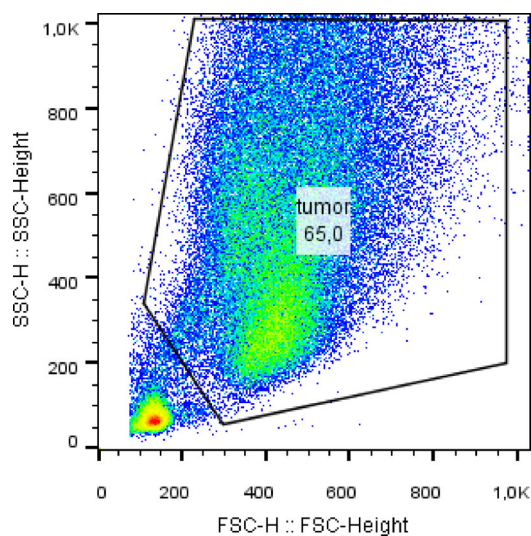
QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS Th-1, Th-2 e Th17

A dosagem de citocinas foi realizada utilizando-se o Kit Mouse Inflammation Kit Cytometric Bead Array (CBA), (BD Pharmingen, CA, USA), no qual foram dosadas as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-γ, TNF-α E IL-17a. A técnica será realizada conforme orientação do fabricante (Anexo II).

ANEXINA V E IODETO DE PROPÍDIO

Para determinar o perfil de distribuição das células do TAE foi necessário primeiramente realizar a seleção da população de interesse contida no líquido ascítico. Após coleta do líquido ascítico de camundongos transplantados com TAE as células foram lavadas com PBS 1x e quantificadas. 5×10^5 células foram ressuspensas em 500 μ L de PBS 1x para seleção da população celular de interesse por meio de análises de gráficos de densidade de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) em citômetro de fluxo (FACSCalibur™, BD Biosciences) (Figura 1).

Figura 1: Representativo de densidade de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) obtido após seleção da população de interesse por citometria de fluxo

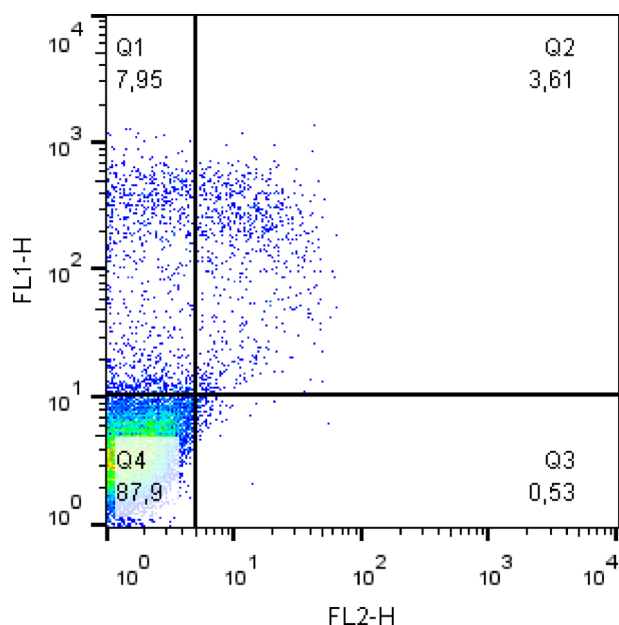


Após a seleção da população de TAE, da cavidade intraperitoneal, a frequência das subpopulações celulares foi obtida em gráficos bidimensionais de densidade de fluorescência de FL1/Anexina V-FITC versus FL2/PI. A detecção de células do TAE viáveis e mortas por apoptose ou necrose foi realizada utilizando o Kit de detecção de apoptose Anexina V-FITC/Iodeto de Propílo (PI) (BD Bioscience) de acordo com as instruções do próprio fabricante. O procedimento de marcação por Anexina V-FITC/PI consiste na ligação da anexina V-FITC à fosfatidilserina, na membrana das células que

estão iniciando o processo apoptótico, e na ligação do iodeto de propídio ao DNA das células no processo final da apoptose (HENRY et al., 2013).

Após quantificação, 5×10^5 células de TAE foram ressuspensas em 500 μL de tampão de ligação. Em seguida, 2,5 μL de anexina V-FITC e 3 μL de PI foram adicionados. A análise pela citometria de fluxo foi realizada após 15 minutos de coloração. A aquisição de dados e análise foram feitas no citômetro de fluxo (FACSCalibur™, BD Biosciences) adquirindo 10.000 eventos/amostra, utilizando o software CellQuest. Os critérios de classificação das células em: viáveis, apoptose inicial, apoptose tardia e necrose; consistem na positividade dos corantes anexina V/FITC e PI: células viáveis não apresentam marcação (An-)/(PI-), células em apoptose inicial apresentam marcação positiva somente para Anexina-V (An+)/(PI-), células em apoptose tardia apresentam dupla marcação de Anexina V e PI (An+)/(PI+) e células em necrose apresentam marcação positiva somente para PI (An-)/(PI+).

Figura 2: representativo bidimensional de densidade de FL1/Anexina V/FITC versus FL2/PI utilizado para quantificar o percentual de células viáveis, apoptóticas e necróticas.



Os quatro quadrantes representam o perfil de distribuição das células de acordo com a positividade dos corantes: Q1 representa células viáveis, Q2

representa células em apoptose inicial, Q3 representa células em apoptose tardia e Q4 representa células em necrose

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados empregando-se o software GraphPad Prism 6. Para dados apresentando uma distribuição paramétrica foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida pelo Teste de Tukey.

6.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato hidroalcoólico de frutos de *M. citrifolia* nas concentrações de 125, 250 e 500 mg/Kg/ SID e associações com quimioterápico ciclofosfamida não apresentaram efeito antineoplásico. Dados da literatura revelam que extratos obtidos dessa planta medicinal possuem diversas atividades biológicas, como anti-inflamatórias, antivirais, antioxidante e anticancerígenas, sendo assim, conhecida como uma planta usadas para o tratamento de diversas doenças (Torres et al., 2017). A Figura 3 mostra que não houve diferença entre os grupos quanto ao consumo de ração e água.

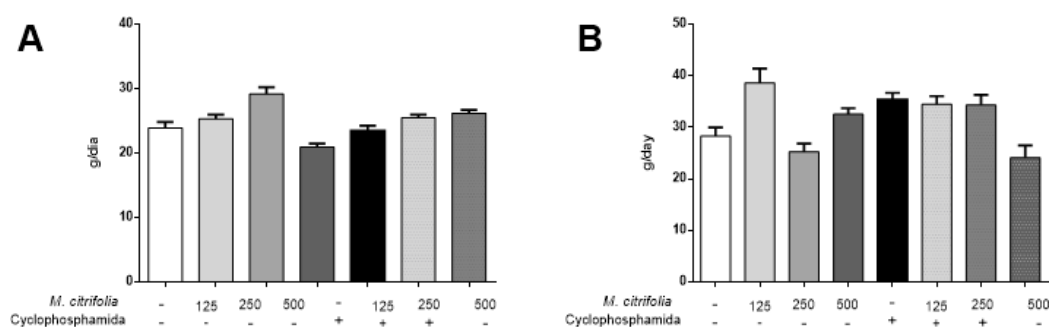


Figura 3 – Consumo de ração (A) e água (B) dos animais tratados com o extrato hidroalcoólico do fruto de *M. citrifolia*, ciclofosfamida e associações após 7 dias de tratamento.

Os animais tratados com extrato hidroalcoólico do fruto de *M. citrifolia* associado a ciclofosfamida mantiveram o consumo de ração e água normais, além disso, não apresentaram efeitos adversos, o que pode ser um aliado ao tratamento quimioterápico evitando que o paciente desenvolva um quadro de caquexia, a qual sempre está relacionada com prognóstico ruim. As células neoplásicas modificam o seu metabolismo com vistas a preservar a sinalização proliferativa ao mesmo tempo em que inibem a supressão imunológica e morte celular (CABRERA et al. 2016). Além disso, há desregulação anabólica e catabólica que culmina em desequilíbrio bioquímico, perda de tecido, anorexia e perda de peso devido ao estresse metabólico associado ao tumor, levando a um quadro de caquexia (OLIVEIRA et. al. 2016).

Outro fato interessante que pode referendar o uso do noni associado a quimioterapia é o relato de Muto et al. (2010), que descrevem a melhora da função cognitiva de camundongos submetidos a estresse e tratados com o suco de *M. citrifolia*. Há relatos que a quimioterapia prejudica a função cognitiva dos pacientes com câncer de mama (LIM et al, 2016).

O extrato hidroalcoólico de *M. citrifolia* e ciclofosfamida (Figura 4) não promoveu diminuição nos índices de desenvolvimento tumoral, quando comparado ao grupo controle. A circunferência abdominal (Figura 4 A), volume ascítico (Figura 4B), quantidade de células totais (Figura 4C) e tumorais do conteúdo ascítico (Figura 4D) tiveram valores iguais ao grupo controle negativo. Porém, todos os grupos tratados com ciclofosfamida e associações e ciclofosfamida, apresentaram diferença estatística quando comparados ao grupo controle negativo.

Embora não foi observado atividade antitumoral, este estudo não exclui a presença de metabólitos secundários presentes na planta que possuem atividade antitumoral. Uma diminuição no nível de peroxidação lipídica e um aumento na atividade da catalase foram observados com noni por si só e o efeito melhorou as alterações observadas com a cisplatina quando administrado em linhas celulares de câncer cervical HeLa e SiHa (Gupta e Singh, 2013). O composto principal com atividade antitumoral presente no noni, damnacanthal, induz a apoptose mediada por p53 através da ativação de p21 e caspase-7 (Aziz et al., 2014) e, por isso, investigamos o mecanismo de morte celular de células tumorais de Erlich de animais tratados com o extrato hidroalcoólico do fruto de *M. citrifolia*, no entanto, observou-se qualquer mecanismo de morte celular. Inesperadamente, o tratamento com ciclofosfamida mostrou um aumento do número de células em necrose.

Alguns trabalhos citam que o suco *M. citrifolia* tem efeito preventivo, como relatam Contreras e Sancez (2014), onde 4mL/kg/ SID do suco apresentou um efeito preventivo na carcinogênese em ratos com tumor de mama induzido por carcinógeno (DMBA). Camundongos BALB/c com tumor de Ehrlich tratados com suco do fruto de *M. citrifolia* e associações com doxorrubicina por 14 dias de tratamento apresentaram diminuição no volume do tumor e ativação da taxa de apoptose e proliferação celular reduzida, o que

sugere que o suco de *M. citrifolia* pode ser útil no tratamento de câncer da mama por si só ou em combinação com doxorrubicina (Taskin et al., 2009). O suco também foi usado em associação com a cisplatina, o qual aumentou tanto a atividade antineoplásica quanto o índice de apoptose em neoplasias do colo uterino nas linhagens de adenocarcinoma humano, câncer do colo do útero (HeLa) e adenocarcinoma humano de câncer do colo do útero (SiHa) (GRUPTA, et al., 2013)

Por outro lado, Furusawa et al., (2003) relatam que a associação do noni-ppt, um polissacarídeo sintetizado do fruto de *M. citrifolia*, com as drogas paclitaxel, citosina arabinósido e as imunossupressoras ciclofosfamida, metotrexato ou 6-tioguanina, não tiveram efeitos benéficos no organismo. No entanto, os resultados desses estudos não inviabilizam novos experimentos com vistas a testar a atividade imunomoduladora ou efeito antitumoral aditivo.

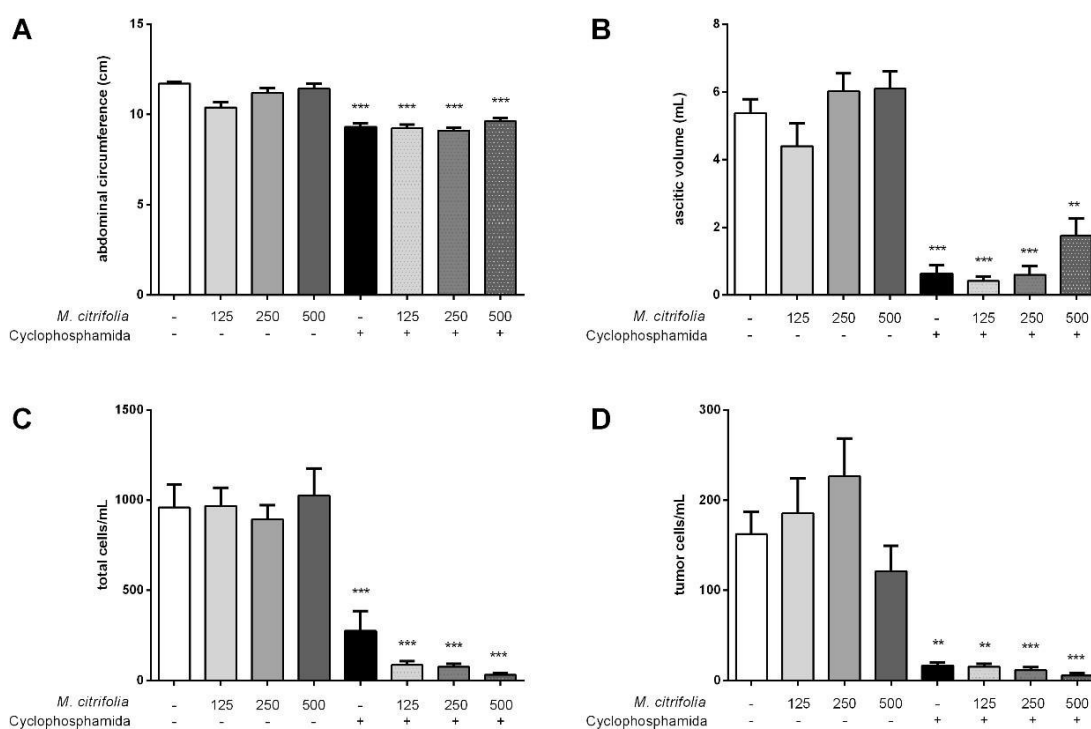


Figura 4 - Efeito do extrato hidroalcoólico de frutos de *M. citrifolia* no tumor de Ehrlich ascítico. Circunferência abdominal (A), volume ascítico (B), total (C) e células tumorais (D) do Tumor de Ehrlich ascítica em camundongos swiss após 7 dias de tratamento com extrato hidroalcoólico de fruta de *M. citrifolia*,

ciclofosfamida e sua associação. Os dados representativos significam \pm SEM (n = 5) de duas experiências independentes. ** p <0,01; *** p <0,001 quando comparado com o grupo não tratado por teste de Tukey

Quanto ao aspecto da ascite observou-se que os grupos tratados com *M. citrifolia* apresentaram líquido ascítico serosanguinolento e sanguinolento, fato esse não observado nos demais grupos. Ao que tudo indica há uma correlação da sobrevida de animais e o aspecto da ascite. Haveit (1965) relata que animais com líquido ascítico mais hemorrágico tinham uma sobrevida menor quando comparados aos animais que apresentavam apenas líquido seroso. O autor explica que os animais que apresentavam líquido hemorrágico morriam em consequência de uma hemorragia intensa. O aumento da permeabilidade vascular leva à ascite, fator essencial para o crescimento tumoral, uma vez que constitui uma fonte nutricional direta para as células tumorais (HALDAR et al., 2010; DOLAI et al., 2012). Supomos que a pressão mecânica exercida pelo líquido ascítico no grupo tratado somente com o extrato hidroalcoólico de *M. citrifolia* foi um dos fatores que contribuíram para este aspecto hemorrágico.

A análise dos parâmetros hematológicos mostrou que os animais tratados com ciclofosfamida sozinha e associações com extrato hidroalcoólico de *M. citrifolia* apresentaram trombocitopenia e leucopenia. No grupo tratado com a ciclofosfamida sozinha a leucopenia foi mais evidente quando comprado ao grupo controle (Figura 5). Sabe-se que a ciclofosfamida é um agente quimioterápico que causa uma leucopenia acentuada quando usada em monoquimioterapia, sem o uso concomitante de algum estimulador de colônias granulocíticas, o que reforça a mielotoxicidade deste fármaco (MARONI et al., 2012).

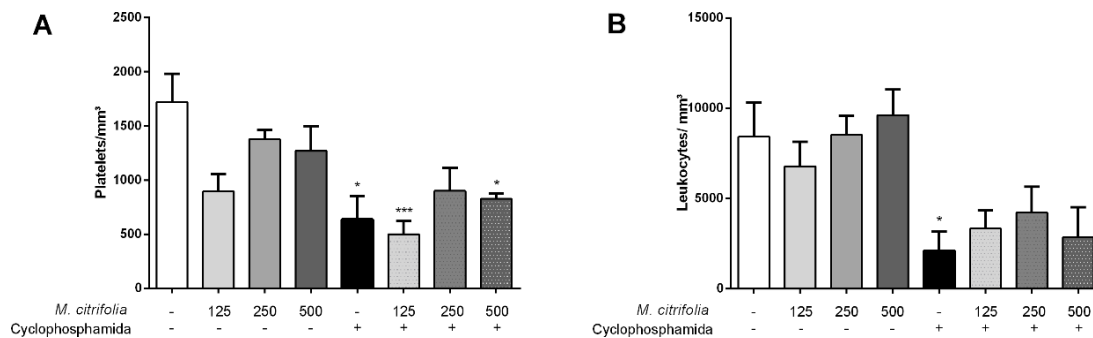


Figura 5 - Efeito do extrato hidroalcoólico de frutos de *M. citrifolia* no tumor de Ehrlich ascítico. Plaquetas (A) e Leucócitos (B) do tumor de Ehrlich ascítico em camundongos swiss após 7 dias de tratamento com extrato hidroalcoólico de fruta de *M. citrifolia*, ciclofosfamida e sua associação. Os dados representativos significam \pm SEM (n = 5) de duas experiências independentes. ** p < 0,01; *** p < 0,001 quando comparado com o grupo não tratado por teste de Tukey

A análise por citometria de fluxo com marcação por Anexina V e iodeto de propídio evidenciou ausência de morte celular causada pelo tratamento com extrato hidroalcoólico do fruto de *M. citrifolia* (Figura 5A). Não foi observado indução de apoptose inicial em nenhum dos tratamentos (Figura 5B). O tratamento com ciclofosfamida induziu morte celular por necrose (Figura 5C), enquanto a associação com *M. citrifolia*, 125mg, apresentou indução de apoptose tardia (Figura 5D). Taskin et al. (2009), em estudo com o modelo murino do Tumor Ascítico de Ehrlich, verificou um aumento de células em apoptose nos animais tratados com doxorubicina e suco do fruto de *M. citrifolia*.

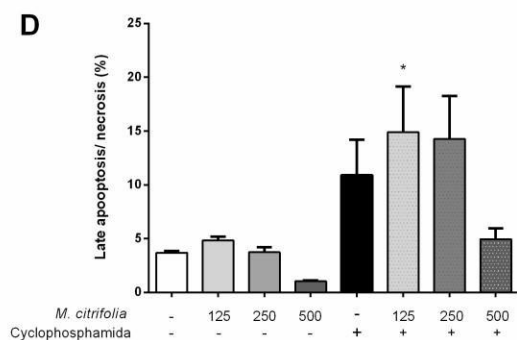
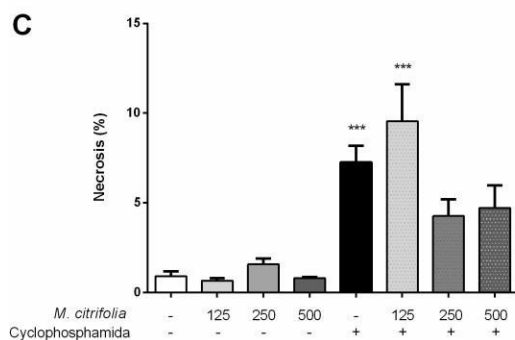
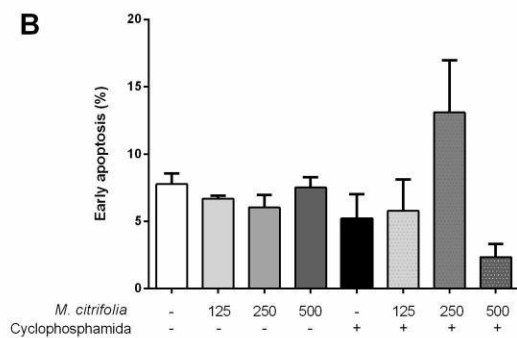
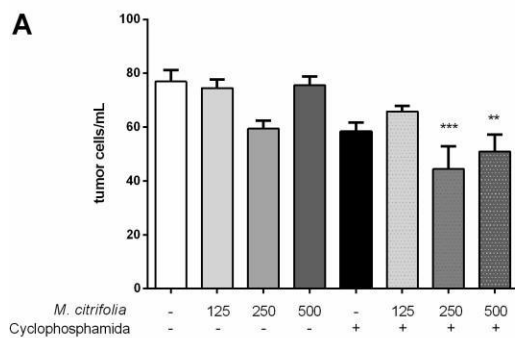
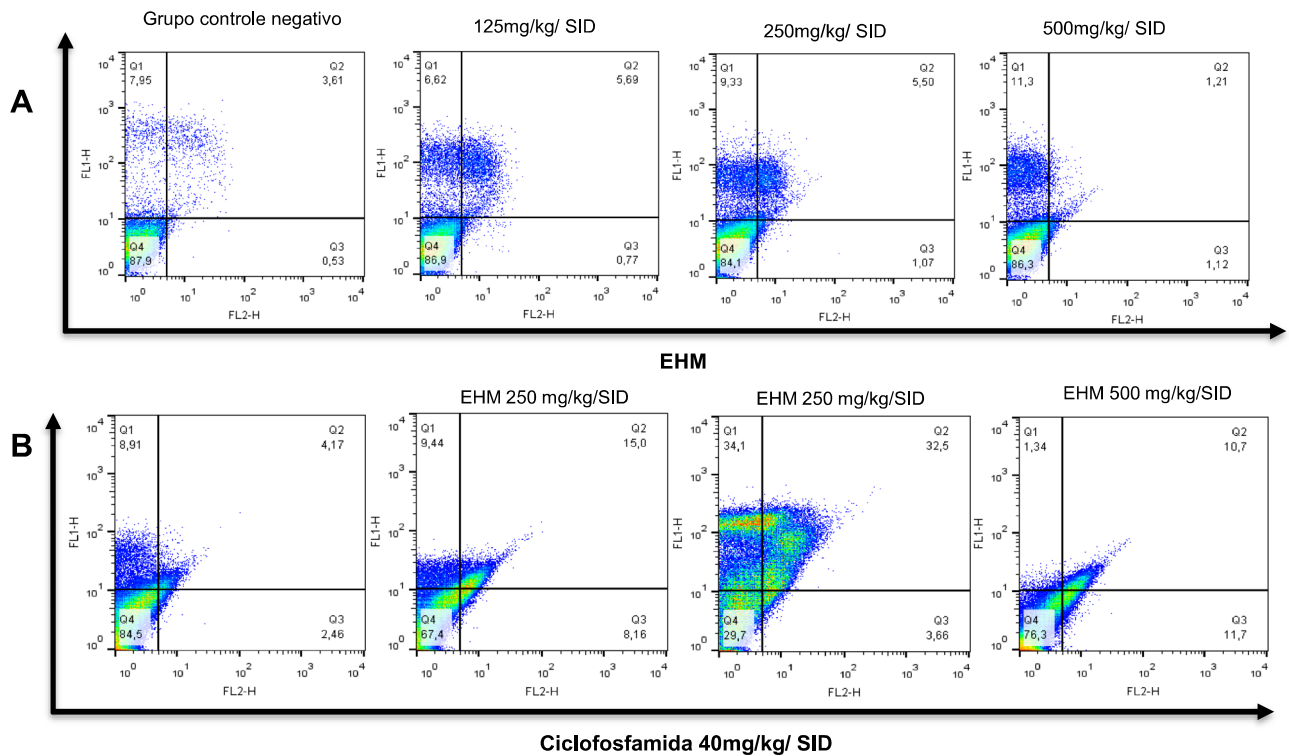


Figura 6 - Efeito do extrato hidroalcoólico de frutos *Morinda citrifolia* na morte de células tumorais de Ehrlich ascitc. Contagem de células tumorais (A), apoptose precoce (B), necrose (C) e apoptose / necrose tardia (D) de células tumorais de Ehrlich ascitico de camundongos suíços após 7 dias de tratamento com extrato hidroalcoólico de fruta de *M. citrifolia*, ciclofosfamida e sua associação. Os dados representativos significam \pm SEM (n = 5) de duas experiências independentes. * P <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001 quando comparado com o grupo não tratado por teste de Tukey.

O tratamento com extrato hidroalcoólico do fruto de *M. citrifolia* levou a uma diminuição nos níveis de TNF- α no tratamento de 500mg dos animais com tumor ascítico de Ehrlich quando comparado com o grupo não tratado. Os grupos das associações do extrato hidroalcoólico do fruto de *M. citrifolia* e ciclofosfamida apresentaram diferença estatística quando comparados ao grupo não tratado (Figura 7A). IFN- γ teve sua níveis diminuídos no grupo tratado com ciclofosfamida e nos grupos de tratamento associado da ciclofosfamida com o extrato hidroalcoólico do fruto de *M. citrifolia* nas concentrações de 250 3 500 mg/kg/dia (Figura 6B).

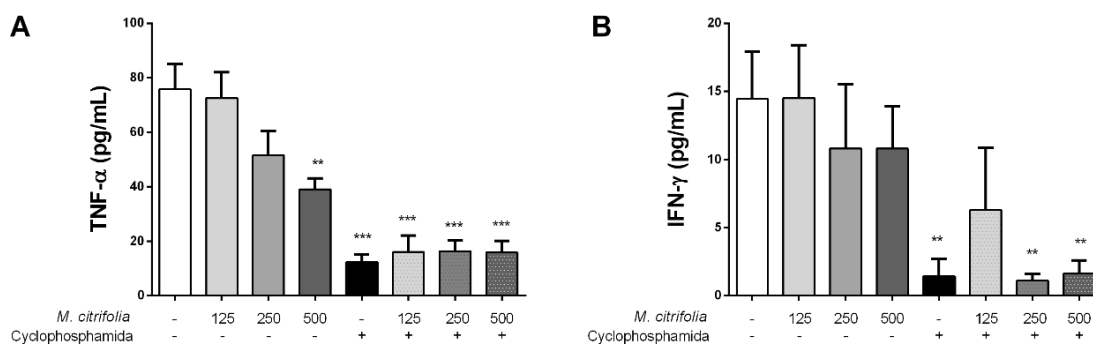


Figura 7 - Efeito do extrato hidroalcoólico de frutos de *Morinda citrifolia* em níveis séricos de citocinas de camundongos suíços com tumor de Ehrlich ascític. TNF- α (A) e IFN- γ (B) depois de 7 dias de tratamento com extrato hidroalcoólico de fruta de *M. citrifolia*, ciclofosfamida e sua associação. Os dados representativos significam \pm SEM ($n = 5$) de duas experiências independentes. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo não tratado por teste de Tukey.

Na contagem geral de esplenócitos, não encontramos diferenças entre os grupos. A reação inflamatória induzida pelo tumor de Ehrlich levou a uma maior produção de citocinas e mediadores químicos que contribuíram para o aumento da permeabilidade vascular peritoneal (Fernandes et al., 2015). Corroborando com a ausência de atividade antitumoral observada, o tratamento com extrato hidroalcoólico de fruta de *M. citrifolia* não alterou o perfil de citocinas na cultura de esplenócitos in vitro, bem como os níveis de citocinas no soro dos animais com Tumor Ascítico de Ehrlich. A ciclofosfamida diminuiu

os níveis de IFN- γ e TNF- α in vivo, e a associação extrato hidroalcoólico de frutos de *Morinda citrifolia* não alterou sua ação.

A atividade imunomoduladora de *M. citrifolia* é bem descrita (Palu et al., 2008) e observada em vários modelos, como anti-inflamatórios (Basar et al., 2010; Dussossoy et al., 2011; Yilmazer et al., 2016), em infecção parasitária (Almeida-Souza, Cardoso, et al., 2016; Almeida-Souza, De Souza, et al., 2016) e atividade antitumoral (Hirazumi e Furusawa, 1999; Lim et al., 2016). A ausência de alterações em outras citocinas analisadas pode ser devido ao comportamento rápido e agressivo da Tumor Ascítico de Ehrlich , onde o perfil de citocinas tende a ser maior nas primeiras horas (Hamsa e Kuttan, 2011).

7.0 CONCLUSÕES

O extrato hidroalcolico do fruto de *Morinda citrifolia* não apresentou remissão do tumor e ainda induziu ao aspecto hemorrágico do líquido ascítico;

A atividade antitumoral da associação do extrato hidroalcolico do fruto de *M. citrifolia* com ciclofosfamida está relacionada apenas à ciclofosfamida;

Não houve indução de morte celular por apoptose ou necrose nas células do tumor de Ehrlich de animais tratados com extrato hidroalcolico do fruto de *M. citrifolia* e sua associação com ciclofosfamida;

O tratamento com o extrato hidroalcolico do fruto de *Morinda citrifolia* e associação com ciclofosfamida não alterou os níveis de citocinas in vitro ou in vivo em animais inoculados com tumor de Ehrlich.

REFERÊNCIAS

ABREU, R.R.; ABREU, L.A. Inhibitory effect of cyclophosphamide on the biosynthesis of a perchloro-soluble protein fraction of ehrlich ascites carcinoma cells. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 71 (4), 1973.

ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.D.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo celular não-específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, 28 (1),118-29, 2005.

ANVISA. RDC nº 48/04, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o o registro de medicamentos fitoterápicos. Brasília: Diário Oficial da União, **2004**.

ARPOMSUWANL, T.; PUNJANONZ, T. Tumor cell-selective antiproliferative effect of the extract from *Morinda citrifolia* fruits. **Phytother Res**, v. 20, n. 6, p. 515-517, 2006.

ARPONSUWAN, T.; PUNJANON, T. Tumor cell-selective antiproliferative effect of the extract from *Morinda citrifolia* fruits. **Phytotherapy Res**, v. 20, p. 515-7, 2006.

ASSI, R. A. et al. *Morinda citrifolia* (Noni): A comprehensive review on its industrial uses, pharmacological activities, and clinical trials. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. 691–707, 2017.

ASSI, R. A. et al. *Morinda citrifolia* (Noni): A comprehensive review on its industrial uses, pharmacological activities, and clinical trials. **Arabian Journal of Chemistry**, 2015

AZIZ, A., YUSRAN, M., OMAR, A. R., SUBRAMANI, T., YEAP, S. K., HO, W. Y., ALITHEEN, N. B.. Damnacanthal is a potent inducer of apoptosis with anticancer activity by stimulating p53 and p21 genes in MCF-7 breast cancer cells. **Oncology letters**, v. 7, n. 5, p. 1479-1484, 2014.

BASAR, S., UHLENHUT, K., HÖGGER, P., SCHÖNE, F., WESTENDORF, J.. Analgesic and antiinflammatory activity of *Morinda citrifolia* L.(Noni) fruit. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 1, p. 38-42, 2010.

BHATTACHARYA, S.; PRASANNA, A.; MAJUMDAR, P.; HALDAR, P. K. . Antitumor efficacy and amelioration of oxidative stress by *Trichosanthes dioica* root against Ehrlich ascites carcinoma in mice. **Pharmaceutical biology**, v. 49, n. 9, p. 927-935, 2011.

BRANDÃO, H. N., DAVID, J. P., COUTO, R. D., NASCIMENTO, J. A., DAVID, J. M.. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. 2010.

BUSHNELL, A. O.; FUKUDA, M.; MAKINODIAN, T. The antibacterial properties of some plants found in Hawaii. **Pacific Science**, v. 4, p. 167-183, 1950.

CANDIDA, T., FRANÇA, J. P. D., CHAVES, A. L. F., LOPES, F. A. R., GAIBA, S., SACRAMENTO, C. K. D., FRANÇA, L. P. D.. Evaluation of antitumoral and antimicrobial activity of *Morinda citrifolia* L. grown in Southeast Brazil. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 29, p. 10-14, 2014.

CHAN-BLANCO, Y et al. The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6, p. 645-654, 2006.

CLAFSHENKEL, W. P. et al. *Morinda citrifolia* (Noni) juice augments mammary gland differentiation and reduces mammary tumor growth in mice expressing the unactivated c-erbB2 transgene. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 15, 2012.

CLAFSHENKEL, William P. et al. *Morinda citrifolia* (Noni) juice augments mammary gland differentiation and reduces mammary tumor growth in mice expressing the unactivated c-erbB2 transgene. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

CONTRERAS, A. M.; SÁNCHEZ, F. H. S. Efectos quimiopreventivos del jugo de *Morindia citrifolia* (noni) sobre cáncer mamario experimental en ratas: estudio preliminar. **Revista de Medicina Veterinaria**, n. 27, p. 41-57, 2014.

CROMAR, B.W.; COLVIN, M.; CASALE, T.B. Validity of skin tests to cyclophosphamide and metabolites. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 88, 965-967, 1991.

DAGLI M.L.Z. Agentes antineoplásicos. In: Spinosa HS, Gorniak SL, Bernardi MM. Farmacologia aplicada a medicina veterinária. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**; 2002. 581-94.

DENG, S. et al. Lipoxygenase inhibitory constituents of the fruits of noni (*Morinda citrifolia*) collected in Tahiti. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 5, p. 859–862, 2007b.

DITTMAR, A. *Morinda citrifolia* L. **Journal of Herbs Spices & Medicinal Plants**, v. 1, n. 3, p. 77–92, 1993.

DOBSON, J. M., LASCELLES, B. D. X. BSAVA manual of canine and feline oncology. **British Small Animal Veterinary Association**, 2011.

DOLAI, N., KARMAKAR, I., KUMAR, R. S., KAR, B., BALA, A., HALDAR, P. K. Evaluation of antitumor activity and in vivo antioxidant status of *Anthocephalus cadamba* on Ehrlich ascites carcinoma treated mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 142, n. 3, p. 865-870, 2012.

DOS SANTOS, B. A.; LATTARO, R. C. C.; DE ALMEIDA, D. A. Cuidados paliativos de enfermagem ao paciente oncológico terminal: revisão da literatura. **Revista de Iniciação Científica da Libertas**, v. 1, n. 1, 2016.

DOS SANTOS, O. J. et al. Use of raw *Euphorbia tirucalli* extract for inhibition of ascitic Ehrlich tumor. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 43, n. 1, p. 018-021, 2016.

EHRlich, P. **Collected studies on immunity**. Wiley, 1906.

EHRlich, P.; APOLANT, H. Beobachtungen über maligne Mäusetumoren. L. Schumacher, 1905.

ELKINS, R. **Hawaiian Noni (*Morinda citrifolia*): Prize Herb of Hawaii and the South Pacific**. Woodland Publishing, Utah, 1998.

ELSHERBINY, Nehal M.; AL-GAYYAR, Mohammed MH. Anti-tumor activity of arjunolic acid against Ehrlich Ascites Carcinoma cells in vivo and in vitro through blocking TGF- β type 1 receptor. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 82, p. 28-34, 2016.

FURUSAWA, E. et al. Antitumor potential of a polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni) on sarcoma180 ascites tumour in mice. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 1158–1164, 2003.

GARCIA, A., MESQUITA, J., NÓBREGA, C., VALA, H. Cuidados paliativos em oncologia veterinária. **Millenium**, 2009.

GARCIA, M.; SERTÓRIO, S.P.; ALVES, G.J.; CHATE, S.C.; CARNEIRO, R.; LALLO, M.A. Uso da ciclofosfamida em modelo de imunodepressão experimental em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 24(3), 115-119, 2004.

GUPTA, M., MAZUMDER, U. K., KUMAR, R. S., SIVAKUMAR, T., e VAMSI, M. L. M.. Antitumor activity and antioxidant status of *Caesalpinia bonducella* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **Journal of pharmacological sciences**, v. 94, n. 2, p. 177-184, 2004.

GUPTA, R. K. et al. 2013. Induction of mitochondrial-mediated apoptosis by *Morinda citrifolia* (noni) in human cervical cancer cells. **Asian Pacific journal of cancer prevention**, v. 14, n. 1, p. 237–242, 2013.

HALDAR, P. K. et al. Antitumor activity of *Sansevieria roxburghiana* rhizome against Ehrlich ascites carcinoma in mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 12, p. 1337-1343, 2010.

HALDAR, S., KARMAKAR, I., CHAKRABORTY, M., AHMAD, D., HALDAR, P.. Antitumor Potential of *Thevetia peruviana* on Ehrlich's Ascites Carcinoma-Bearing Mice. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 34, n. 2, 2015.

HANSEN, K.; KHANNA, C. Spontaneous and genetically engineered animal models: use in preclinical cancer drug development. **European Journal of Cancer**, v. 40, n. 6, p. 858-880, 2004.

HASSAN, I. A.; ABDEL-GAWAD, I. E. Effect of Zizyphus leaves extract on mice suffering from ehrlich ascites carcinoma. **Natural and Science**, v. 8, n. 11, p. 234-244, 2010.

HENRY, C. M.; HOLLVILLE, E.; MARTIN, S. J. Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. **Methods**, v. 61, n. 2, p. 90-97, 2013.

HIRAMATSU, T. et al. Induction of normal phenotypes in ras-transformed cells by damnacanthol from *Morinda citrifolia*. **Cancer letters**, v. 73, n. 2-3, p. 161-166, 1993.

HIRAZUMI A. & FURUSAWA E. An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni) with antitumor activity. **Phytotherapy Research**. 13(5): 380-387. 1999.

HIRAZUMI A., et al. Anticancer activity of *Morinda citrifolia* (noni) on intraperitoneally implanted lewis lung carcinoma in syngeneic mice. **Proceedings of the western pharmacologic society**. 37:145-146. 1994.

HIRAZUMI, A.; FURUSAWA, E. An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni) with antitumour activity. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 5, p. 380-7, 1999.

HONG-CAI, Z. et al. Two new saccharide fatty acid esters from the fruit of *Morinda citrifolia* L. and their ABTS radical scavenging activities. **Records of Natural Products**, v. 8, n. 1, p. 25, 2014.

HUANG, Y.; EREZYILMAZ, D. The genetics of resistance to *Morinda* fruit toxin during the postembryonic stages in *Drosophila sechellia*. **G3: Genes| Genomes| Genetics**, v. 5, n. 10, p. 1973-1981, 2015.

HURLEY, L.H. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**. 2(3), 188-200, 2002.

INBIO. INSTITUTO NACIONAL DE BIODIVERSIDADE. COSTA RICA 1997. CONSULTADO EM 22 DE SETEMBRO DE 2014. DISPONÍVEL EM: <http://www.inbio.ac.cr/bims/k03/p13/c045/o0142/f01359/g008903/s028172.htm>.

INOUE, K. et al. Anthraquinones in cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 7, p. 1693-1700, 1981.

ISLAM, F. et al. Cancer stem cell: Fundamental experimental pathological concepts and updates. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 98, p. 184–191, 2015.

ISSELL, B. F. et al. Using quality of life measures in a phase i clinical trial of noni in patients with advanced cancer to select a phase II dose. **Journal of dietary supplements**, v. 6, n. 4, p. 347-359, 2009.

JANG, Byeong-Churl. The fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni) downregulates HIF-1 α protein expression through inhibition of PKB, ERK-1/2, JNK-1 and S6 in manganese-stimulated A549 human lung cancer cells. *International journal of molecular medicine*, v. 29, n. 3, p. 499-504, 2012.

JAYARAMAN, S.K.; MANOHARAN, M. S.; ILLANCHEZIAN, S. Antibacterial, antifungal and tumor cell suppression potential of *Morinda citrifolia* fruit extracts. **International journal of integrative biology**, v. 3, n. 1, p. 44-49, 2008.

Jensen, C.J., Palu, A.K., Story, S.P., Su, C.X., Wang, M.Y., West, B.J., Westendorf, J.J., 2005. Selectively inhibiting estrogen production and providing estrogenic effects in the human body. Google Patents.

JONES, D., GARSKY, V. M., WONG, B. K., FENG, D. M., BOLYAR, T., HASKELL, K., WAI, J.. A peptide–doxorubicin'prodrug'activated by prostate-specific antigen selectively kills prostate tumor cells positive for prostate-specific antigen in vivo. **Nature Medicine**, v. 6, n. 11, p. 1248-1252, 2000.

KAMATA, Masakazu et al. Cell-based chemical genetic screen identifies damnacanthal as an inhibitor of HIV-1 Vpr induced cell death. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 348, n. 3, p. 1101-1106, 2006.

KAMIYA, K. et al. Inhibitory effect of anthraquinones isolated from the Noni (*Morinda citrifolia*) root on animal A-, B-and Y-families of DNA polymerases and human cancer cell proliferation. *Food Chemistry*, v. 118, n. 3, p. 725-730, 2010.

KHARIS, Z.; AZIMAHTOL HAWARIAH, L. P. Pengaruh apoptosis di dalam kanser paru-paru NCI-H23 oleh fraksi kloroform buah *Morinda citrifolia*.

Prosiding kolokium siswazah keempat, p. 5-8, 2004.

KIM, H.C.; KESARWALA, H.H.; COLVIN, M.; SAIDI, P. Hypersensitivity reaction to a metabolite of cyclophosphamide. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 76, 591-594, 1985.

KNYSAK, D.J.; MCLEAN, J.A.; SOLOMOM, W.R.; FOX, D.A.; MCCLUNE, W.J. Immediate hypersensitivity reaction to cyclophosphamide. **Arthritis & Rheumatology**, 37, 1101-1104, 1994.

KOVENDAN, K. et al. Evaluation of larvicidal and pupicidal activity of *Morinda citrifolia* L.(Noni)(Family: Rubiaceae) against three mosquito vectors. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, p. S362-S369, 2012.

KOVENDAN, K. et al. Larvicidal activity of *Morinda citrifolia* L.(Noni)(Family: Rubiaceae) leaf extract against *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus*, and *Aedes aegypti*. **Parasitology research**, v. 111, n. 4, p. 1481-1490, 2012.

KOVENDAN, K. et al. Mosquitocidal properties of *Morinda citrifolia* L.(Noni)(Family: Rubiaceae) leaf extract and *Metarhizium anisopliae* against malaria vector, *Anopheles stephensi* Liston.(Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, p. S173-S180, 2014.

KRITHARIDES, L.; LAWRIE, K.; VARIGOS, G.A. Cyclophosphamide hypersensitivity and cross-reactivity with chlorambucil. **Cancer Treatment Reports** 71, 1323-4, 1987.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. Robbins basic pathology. **Elsevier Health Sciences**, 2012.

KUTTAN, G.; DAVIS, L. Spressive effect of cyclophosphamide- induce toxicity by *Withania somnifera* extract in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, 62, 209-214, 1998.

LIM, I., JOUNG, H. Y., YU, A. R., SHIM, I., KIM, J. S. PET Evidence of the Effect of Donepezil on Cognitive Performance in an Animal Model of Chemobrain. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

LIN, Yi-Ling et al. Beneficial effects of noni (*Morinda citrifolia* L.) juice on livers of high-fat dietary hamsters. **Food chemistry**, v. 140, n. 1, p. 31-38, 2013.

LIU, Guangming 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. **Cancer Research**, v. 61, n. 15, p. 5749-5756, 2001.

MANDUKHAIL, Saf-ur Rehman; AZIZ, Nauman; GILANI, Anwarul-Hassan. Studies on antidyslipidemic effects of *Morinda citrifolia* (Noni) fruit, leaves and root extracts. **Lipids in health and disease**, v. 9, n. 1, p. 88, 2010.

MIRANDA, R. R.; FREITAS, J. J. S. The anti-proliferative effects of the ethanolic extract of *Uncaria tomentosa* in Ehrlich ascitic carcinoma. **Rev. para. med**, v. 22, n. 2, p. 17-22, 2008.

MOHD ZIN, Z. et al. Isolation and identification of antioxidative compound from fruit of mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). **International Journal of Food Properties**, v. 10, n. 2, p. 363-373, 2007.

MOMESSO, L. S.; MOURA, Rute Mendonça Xavier de; CONSTANTINO, Dulce Helena Jardim. Antitumoral activity of the *Ageratum conyzoides* L.(Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 660-663, 2009.

MORTON, Julia F. The ocean-going noni, or Indian Mulberry (*Morinda citrifolia*, Rubiaceae) and some of its "colorful" relatives. **Economic Botany**, v. 46, n. 3, p. 241-256, 1992

NASCIMENTO, F. R., CRUZ, G. V., PEREIRA, P. V. S., MACIEL, M. C., SILVA, L. A., AZEVEDO, A. P. S., GUERRA, R. N.. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. **Life Sciences**, v. 78, n. 22, p. 2650-2653, 2006.

NELSON, R.W., COUTO C.G. Distúrbios da glândulas mamárias. In: Medicina interna de pequenos animais. 2ª ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**; 2001. 686-908.

NELSON, Scot C. *Morinda citrifolia* (noni). **Species profiles for Pacific Island forestry. Permanent Agricultural Resources, Holualoa, Hawaii, USA**, p. 1-13, 2006.

NERY, L. H. R.. Eficácia da dexametasona e da doxorubicina no tumor de Ehrlich transplantado em camundongos BALB/c. 2004.

NUALSANIT, Thararat et al. Damnacanthal, a noni component, exhibits antitumorogenic activity in human colorectal cancer cells. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 23, n. 8, p. 915-923, 2012.

O'KEEFE, D. A., HARRIS, C. L. Toxicology of oncologic drugs. **Veterinary clinics of north america: small animal practice**. v. 20, n.2, p. 483-504, 1990.

OLIVEIRA, André G.; GOMES-MARCONDES, Maria Cristina C. Metformin treatment modulates the tumour-induced wasting effects in muscle protein metabolism minimising the cachexia in tumour-bearing rats. **BMC cancer**, v. 16, n. 1, p. 418, 2016.

OZASLAN, M., KARAGOZ, I. D., KILIC, I. H., & GULDUR, M. E.. Ehrlich ascites carcinoma. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 13, p. 2375-2378, 2011.

PAWLUS, Alison D.; KINGHORN, A. Douglas. Review of the ethnobotany, chemistry, biological activity and safety of the botanical dietary supplement *Morinda citrifolia* (noni). **Journal of Pharmacy and pharmacology**, v. 59, n. 12, p. 1587-1609, 2007.

POPESCU, N.A.; SHEEHAN, M.G.; KOUIDES, P.A.; LOUGHNER, J.E.; CONDEMI, J.J.; LOONEY, R.J.; LEDDY, J.P. Allergic reactions to cyclophosphamide: Delayed clinical expression associated with positive immediate skin tests to drug metabolites in five patients. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 97, 36-33, 1996.

PORTUGAL, L. M. **Avaliação da eficácia antitumoral e toxicidade de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo cisplatina no tratamento de camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich**. 2012. Tese de Doutorado.

PRASAD, PROSANTO PAL1 ARTI KUMARI et al. EVALUATION OF ANTI CANCER POTENTIAL OF METHANOL EXTRACT OF CURCUMA ZEDOARIA. **Asian J Pharm Clin Res**, v. 7, n. 5, p. 309-313, 2015.

QUILLES, M. B. Atividade anti-tumoral e imunomodulatória de complexos de paládio (II) utilizando modelo experimental de Ehrlich. 2010.

RAZAFIMANDIMBISON S.G., McDOWELL T.D., HALFORD D.A., BREMER B. Molecular phylogenetics and generic assessment in the tribe morindeae (Rubiaceae-Rubioideae): how to circumscribe *Morinda* L. to be monophyletic? **Molecular phylogenetics and evolution**. 2010; 52: 879-886.

ROSENTHAL R.C. Segredos em oncologia veterinária. Porto Alegre: **Artmed**; 2004. 99-199.

SANG, Shengmin et al. Chemical components in noni fruits and leaves (*Morinda citrifolia* L.). 2002. 134-150.

SHARMA, B.; DHAMIJA, I.; KUMAR, S.; CHAUDHARY, H. *In vitro* and *in vivo* evaluation of antitumor activity of methanolic extract of *Argyreia nervosa* leaves on Ehrlich ascites carcinoma. **Bangladesh J Pharmacol.** v. 10, n.2, p. 399-408, 2015.

SHARMA, K. et al. Anticancer effects of extracts from the fruit of *Morinda Citrifolia* (Noni) in breast cancer cell lines. **Drug research**, v. 66, n. 03, p. 141-147, 2016.

SHOVIC, A. C.; WHISTLER, W. A. Food sources of provitamin A and vitamin C in the American Pacific. **Tropical Science**, v. 41, n. 4, p. 199-202, 2001.

SHOVIC, A. C.; WHISTLER, W. Art. Food sources of provitamin A and vitamin C in the American Pacific. **Trop. Sci**, v. 41, p. 199-202, 2001.

SHOVIC, Anne Caprio; WHISTLER, W. Art. Food sources of provitamin A and vitamin C in the American Pacific. **Trop. Sci**, v. 41, p. 199-202, 2001.

SILVA M.M. Efeito da verminose na resposta imune humoral em caprinos. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)**, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Paulista, 2000.

SILVA, A. E.; SANTOS, F. G.; CASSALI, G. D. Marcadores de proliferação celular na avaliação do crescimento do tumor sólido e ascítico de Ehrlich. **Arq. bras. med. vet. zootec**, v. 58, n. 4, p. 658-661, 2006.

SOLOMON, N. **The Noni Phenomenon**. Direct Source, 1999.

SONRENMO, K. Veterinary Clinics of North America: **Small Animal Practice**, 33(3), 573-96, 2003.

SU, Bao-Ning et al. Chemical Constituents of the Fruits of *Morinda citrifolia* (Noni) and Their Antioxidant Activity. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 4, p. 592-595, 2005.

SUKAMPORN, P., ROJANAPANTHU, P., SILVA, G., ZHANG, X., GRITSANAPAN, W., & BAEK, S. J. Damnacanthal and its nanoformulation exhibit anti-cancer activity via cyclin D1 down-regulation. **Life sciences**, v. 152, p. 60-66, 2016.

TAŞKIN, E. İ., AKGÜN-DAR, K., KAPUCU, A., OSANÇ, E., DOĞRUMAN, H., ERALTAN, H., ULUKAYA, E.. Apoptosis-inducing effects of *Morinda citrifolia* L. and doxorubicin on the Ehrlich ascites tumor in Balb-c mice. **Cell biochemistry and function**, v. 27, n. 8, p. 542-546, 2009.

THANI, W. et al. Anti-proliferative and antioxidative activities of thai noni/yor (Morinda citrifolia linn.) leaf extract. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v.41, n.2, p.482-489, 2010

THONG, B.Y.H.; LEONG, K.P.; THUMBOO, J.; KOH, E.T.; TANG, C.Y. Cyclophosphamide type I hypersensitivity in systemic lupus erythematosus. **Lupus** 11,127-129, 2002.

TORRES, Mylena Andréa Oliveira et al. One Plant, Many Uses: A Review of the Pharmacological Applications of Morinda citrifolia. **Phytotherapy Research**, 2017.

URANO, M.; TANAKA, N.; SHIRAKURA, I. Unexpected sensitivity of tumor cells to cyclophosphamide in one-day-old solid Ehrlich ascites tumors. **Gann**, 61, 353-358, 1970.

VERÇOSA JÚNIOR, D. et al. Efeito do miriadenolídeo isolado de Alomia myriadenia(Asteraceae) sobre o tumor de Erlich ascítico no camundongo. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58, n.5, p.788-798, 2006.

VERLENGIA, R. Estudo do perfil de eletroforese e imunoeletroforese em camundongos portadores do tumor de Ehrlich. 1994.

WANG, M. et al. Novel trisaccharide fatty acid ester identified from the fruits of Morinda citrifolia (Noni). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 47, n. 12, p. 4880-4882, 1999.

WANG, M. Y.; SU, C. Cancer preventive effect of Morinda citrifolia (Noni). **Ann New York Acad Sci**, v. 952, p. 161-8, 2001.

WANG, Mian Ying et al. **Selectively inhibiting estrogen production and providing estrogenic effects in the human body**. U.S. Patent n. 8,501,245, 6 ago. 2013.

WANG, X. W., HUSSAIN, S. P., HUO, T. I., WU, C. G., FORGUES, M., HOFSETH, L. J., HARRIS, C. C.. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. **Toxicology**, v. 181, p. 43-47, 2002.

WEST, B. J. et al. Antimicrobial Activity of an Iridoid Rich Extract from " Morinda citrifolia" Fruit. **Current Research Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 1, p. 52-54, 2012.

WEST, B. J.; DENG, S.; JENSEN, C. J. Nutrient and phytochemical analyses of processed noni puree. **Food Research International**, v. 44, p. 2295-2301, 2011.

WILLBANKS, AMBER ET al. The Evolution of Epigenetics: From Prokaryotes to Humans and Its Biological Consequences. **Genetics & Epigenetics**, v. 8, p. 25, 2016.

WITHROW, S. J.; PAGE, R.; VAIL, D. M. Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology. **Elsevier Health Sciences**, 2013.

YU, H. **Anti-inflammatory constituents in Noni (*Morinda citrifolia*) fruits, sweet orange (*Citrus sinensis*) peel, and biotransformation pathway of nobiletin.** 2004.

ZIN, Z. M.; ABDUL-HAMID, A.; OSMAN, A.. Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. **Food Chemistry**, v. 78, n. 2, p. 227-231, 2002.

APENDICE 1

REVIEW

One Plant, Many Uses: A Review of the Pharmacological Applications of *Morinda citrifolia*

Mylene Andréa Oliveira Torres,¹ Isadora de Fátima Braga Magalhães,² Renata Mondêgo-Oliveira,³ Joicy Cortez de Sá,³ Alessandra Lima Rocha² and Ana Lucia Abreu-Silva^{4*}

¹Rede Nordeste de Biotecnologia—RENORBIO, Ponto focal Maranhão, São Luís, Brazil

²Master's Degree in Animal Science, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, Brazil

³Universidade Ceuma, São Luís, Brazil

⁴Department of Pathology, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, Brazil

Morinda citrifolia, also known as noni, is commonly used in popular medicine in Brazil. Many parts of the noni tree are utilized in such practices, including the roots, leaves and seeds. Through a search of online databases, the present article reviews 92 research studies on the biological actions of *M. citrifolia*. The paper will discuss the therapeutic effects of noni and its compounds in a variety of forms of presentation, focusing on studies that support its traditional use. A large and diverse number of properties were identified, which were divided into immunostimulatory, antitumor, antidiabetic, anti-obesity, antibacterial and anti-septic, antifungal, antiviral, leishmanicidal, antiinflammatory, antinociceptive and analgesic, antioxidant, neuroprotective, wound healing, antiallergic, antiangiogenic, antiemetic and anti-nausea, anti-gastric ulcer and oesophagitis, anthelmintic, antimutagenic, antipsychotic, anxiolytic, photoprotective, anti-wrinkle and periodontal tissue regeneration activities. While it was concluded that although *M. citrifolia* is widely and successfully used for the treatment or prevention of various diseases, it should be consumed carefully, and only after exhaustive studies into its chemical constituents and mechanisms of action, both in *in vitro* and *in vivo* models, as well as clinical trials. Copyright © 2017 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: biological activity; noni; phytotherapy.

INTRODUCTION

Morinda citrifolia, or noni, is a plant native to Southeast Asia. The tree can grow as tall as 6 m and has bright green, oval-shaped leaves, which measure from 10 to 30 cm. Its fruit is ovoid in shape and when mature has an unpleasant butyric acid odor and astringent taste. Its seeds have an air sac at one end which allows them to float, partly explaining the wide distribution of noni trees in the Indo-Pacific islands (Potterat and Hamburger, 2007). Each part of the plant, from its roots to its seeds, is widely used in folk medicine, and several therapeutic effects have already been reported (Wang *et al.*, 2002). Several *in vitro* and *in vivo* studies have been performed in recent years, seeking to demonstrate the biological potential of *M. citrifolia* and/or its isolated compounds, and the results have been promising. In a search of several databases, including PubMed, SciELO and Periódicos CAPES (CAPES Journals), conducted from April 2016 to May 2016, 505 results were found for *M. citrifolia*, 92 of which were

related to its biological actions. Of these, 35 were *in vitro* studies, 51 were *in vivo* studies, 2 were *ex vivo* studies and 5 were clinical

* Correspondence to: Ana Lucia Abreu Silva, Department of Pathology, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, Brazil.
E-mail: abreusilva.ana@gmail.com

Copyright © 2017 John Wiley & Sons, Ltd.

trials involving humans. These studies highlighted the following biological actions of *M. citrifolia*: immunostimulatory, antitumor, antidiabetic, anti-obesity, antibacterial and anti-septic, antifungal, antiviral, leishmanicidal, antiinflammatory, antinociceptive and analgesic, antioxidant, neuroprotective, wound healing, antiallergic, antiangiogenic, antiemetic and anti-nausea, anti-gastric ulcer and oesophagitis, anthelmintic, antimutagenic, antipsychotic, anxiolytic, photoprotective, anti-wrinkle and periodontal tissue regeneration activities, which are described in this review.

IMMUNOSTIMULATORY ACTIVITY

Some plants have compounds that present immunomodulatory activity, or in other words, contain substances that can promote or suppress the immunological responses of the body, such as cytokine production. *M. citrifolia* stands out among plants for its immunomodulatory activities, which are related to both cellular and humoral responses.

According to Hirazumi and Furusawa (1999), the coadministration of noni juice and immunosuppressant drugs reduced the immunostimulatory effect in mice, which confirms the action of noni as an immunomodulating agent which can interfere in

Received 16 January 2017
Revised 20 March 2017
Accepted 26 March 2017

immune response under different pathological conditions.

Both the hydroalcoholic and aqueous extract of noni fruit increased *in vitro* splenocyte proliferation and stimulated B and T lymphocyte activity (Nayak and Mengi, 2010). In splenocytes isolated from middle-aged F344 inbred rats treated with aqueous extracts, there was a decrease in *in vitro* INF- γ and IL-2 production and a reduction in lymphoproliferative activity. However, juice with seeds had the opposite effect, increasing lymphocyte proliferation in young and old mice and augmenting the production of cytokines (Pratap *et al.*, 2016).

Palu *et al.* (2008) performed an *in vitro* study, which showed that commercial Tahitian Noni juice (TNJ®) and concentrated fruit juice (concentration unknown) displayed an immunomodulatory effect, once these derivate of *M. citrifolia* activated the cannabinoid receptor 2 (CB2), and inhibited the cannabinoid receptor 1 (CB1) in a dose-dependent manner. Additionally, *in vivo* studies showed that mice that received TNJ® orally for 16 days presented decreased level of IL-4 and increased INF- γ . These results suggest that noni can modulate the immune system by exerting beneficial effects. This may be useful in some infectious diseases, such as leishmaniasis, where the control of the infection depends on strong Th1 response and moderate Th2 response.

The combination noni-ppt, an isolated compound from the fruit extract, and IFN- γ , a Th1 cytokine, leads a beneficial effect in mice that became resistant to the S180 tumor invasion. On the other hand, when this isolate was used combined with IL-4 and IL-10, the antitumoral effect was suppressed. These findings evidence the immunomodulatory effect of *M. citrifolia*, as well as noni-ppt (Furusawa *et al.*, 2003).

In animals with Lewis tumors treated with noni precipitate (noni-ppt), it was found that noni stimulated the release of several cytokines, including TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-12 and IFN- γ , as well as nitric oxide. However, it decreased IL-4 release and had no effect on IL-2 production (Hirazumi and Furusawa, 1999).

In folk medicine, *M. citrifolia* is used as a food supplement in patients with different types of cancer. In murine model, it was demonstrated that ethanolic extract of noni leaves acts on tumor cells and on the pathways involved in immunological response through cyclooxygenase 2 (COX2) suppression, an important inflammatory marker, and the increase of the tumor suppressor gene (Lim *et al.*, 2016). The administration of 10% TNJ® in laboratory animals also extends to the inhibition of gene mutations: carcinogenic compounds bind covalently to the DNA, forming structures known as adducts that, if not repaired, cause mutations. Noni may be used to prevent the formation of these structures (Wang and Su, 2001).

The antiproliferative effect of the methanolic extract of noni fruit has been described in a number of cell lines, such as baby hamster kidney cells (BHK), African green monkey kidney cells (Vero), human epithelial type 2 cells (Hep2), human breast adenocarcinoma cells

ANTITUMOR ACTIVITY

(MCF7) and neuroblastoma. The ethanolic extract was tested in B16-F10 melanoma cells (LAN5) and also exhibited antiproliferative action (Arpornsuwan and Punjanon, 2006; Candida *et al.*, 2014).

Commercial fruit juice containing an unknown concentration of noni juice markedly down-regulates the expression of HIF-1 α protein induced by manganese *in vitro*, in the A549 cell line of human lung cancer. This suggests that it has potential beneficial effects on lung cancers in which manganese and the overexpression of HIF-1 α play key roles, as manganese exposure is a risk factor for many pulmonary diseases (Jang, 2012).

The ethanolic extract of noni leaves also reduced the expression of epidermal growth factor receptor (EGFR), a lung adenocarcinoma biomarker, in mice (Lim *et al.*, 2016), as well as acting on Lewis lung carcinoma in syngeneic mice (Hirazumi *et al.*, 1994). The chemical composition of the juice shows the presence of noni-ppt, a substance rich in polysaccharides, which has exhibited antitumor activity against Lewis lung peritoneal carcinomatous is (CLL). The therapeutic administration of noni-ppt significantly increased the survival of tumor-bearing mice (Hirazumi and Furusawa, 1999).

M. citrifolia fresh leaf extract exhibited an *in vitro* inhibitory effect on the lineage cells of human epidermoid carcinoma (KB), human cervical carcinoma (HeLa), MCF-7, human hepatocellular carcinoma (HepG2) and Vero cells and can act as a food supplement in the chemoprevention of cervical and epidermoid cancer (Thani *et al.*, 2010). Its ethyl acetate fraction extract inhibited MCF-7 and MDA-MB-23 cell proliferation, both of which are associated with mammary adenocarcinoma (Sharma *et al.*, 2016).

In human colon adenocarcinoma cell (Caco-2) culture, the ethanolic extract of noni fruit and its fractions reduced intracellular oxidation and inflammation through the reduction of reactive oxygen species, and decreased COX-2, IL-8 and PGE2 production *in vitro* (Huang *et al.*, 2015). TNJ® significantly reduced the tumor weight and volume of HER2-positive breast cancer in MMTV-neu transgenic mice. However, tumor latency and metastasis incidence were not affected by the treatment

(Clafshenkel *et al.*, 2012).

A commercial noni juice (Alnoni®) with an unknown percentage of noni juice exhibited cytotoxic potential on Ehrlich tumor cells in BALB/c mice, proving to be useful in the treatment of breast carcinoma, whether alone or in combination with doxorubicin, a potent anticancer agent. The effects of noni are through apoptosis induction (Taskin *et al.*, 2009).

When used in the treatment of sarcoma 180 (S-180) or Crocker tumor in allogeneic mice, noni-ppt, isolated from ripe noni juice, demonstrated antitumor activity, with a remission rate of 25 to 45% and a synergistic or additive effect when combined with a broad spectrum of chemotherapeutic drugs (Furusawa *et al.*, 2003).

In *in vitro* studies, damnacanthal, a bioactive compound isolated from the chloroform fraction of *M. citrifolia* root extract, significantly inhibits the reproduction of RAS cells, precursors of many malignant tumors (Hiramatsu *et al.*, 1993). In MCF-7 cells, this compound exhibited antiproliferative activity after 72 h of treatment, at a concentration of 8.2 $\mu\text{g/mL}$, and induced cell cycle arrest and apoptosis in the G1 phase, through the activation of the p21 gene and caspase-7

(Aziz *et al.*, 2014). It also inhibited the growth of several cancer cell lines: colorectal cancer (HCT-116), human colon adenocarcinoma (HT-29), MCF-7 and prostate cancer (PC-3), in a dosage and type-dependent form (Nualsanit *et al.*, 2012; Sukamporn *et al.*, 2016).

A phase I clinical trial aimed to evaluate the effect of the ingestion of the dry fruit extract on patients with stage 4 cancer. The maximum daily dose tolerated by

patients was 3 g (six capsules, each of which contained 500 mg of the dry fruit extract, four times a day). The ingestion of three or four capsules four times a day is recommended to prevent fatigue and pain and to maintain physical functioning. However, some patients demonstrated side effects associated with the ingestion of noni capsules, such as nausea and abdominal discomfort (Issell *et al.*, 2009). This demonstrates the need for further studies to evaluate the toxicity of the extract to ensure the safety of those who use it. This study is of great importance; however, it is one of very few human clinical trials.

The role of the fungi found in noni leaves and fruit in inhibiting tumor cells *in vitro* was studied by Wu *et al.* (2015), who demonstrated that the endophytes present in *M. citrifolia* leaves inhibited the growth of human cancer cell lines.

ANTIDIABETIC ACTIVITY

The increasing number of diabetic patients who support integrative or functional medicine has encouraged a growing number of studies. Nerurkar *et al.* (2012) investigated the antidiabetic effects of *M. citrifolia* in C57BL/6 mice with a high-fat diet, who were submitted to treatment with fermented noni juice. The improvement of the glucose metabolism, via phosphorylation of the transcription factor FOXO1, was observed. Similarly, Horsfall *et al.* (2008) observed that the use of noni juice on the treatment of induced diabetes in rats led to reduced blood glucose levels, and that noni possesses a synergistic action when used in combined therapy with insulin.

The hypoglycemic effects of the chemical constituents of *M. citrifolia* roots were evaluated in streptozotocin-induced diabetes

in rats. The butanol fraction of the root methanolic extract reduced blood glucose levels, with this effect attributed to the compounds damnacanthal-3-O-beta-D-lucidinprimeveroside and 3-O-beta-D-primeveroside (Kamiya *et al.*, 2008). A similar effect was attributed to fermented fruit juice, which showed, in addition to hypoglycemic properties, a hepatoprotective effect on diabetic rats (Nayak *et al.*, 2011).

ANTI-OBESITY ACTIVITY

An *in vitro* study demonstrated that the ethanolic extract of noni leaves and fruit may be used as body weight control agents, as both inhibit lipoprotein lipase (Pak-Dek *et al.*, 2008).

The effect of the ethanolic extract of noni leaves on the treatment of obesity induced by a high-fat diet in the Sprague–Dawley rat strain was also assessed. After 9 weeks, positive effects were observed on body fat, fat

content, triglyceride, insulin and leptin serum levels, which demonstrate that noni significantly improved related parameters caused by obesity (Gooda Sahib Jambocus *et al.*, 2016).

In another study, the administration of leaf, root and fruit hydro alcoholic extracts (1000 or 500 mg/kg) in rats with Triton-induced or high-fat diet hyperlipidemia caused a reduction in total cholesterol and triglyceride levels. This data indicates that the anti-dyslipidemic effect of the extracts was mediated through the inhibition of the biosynthesis, secretion and absorption of lipids. This may be due to the presence of antioxidant constituents in the plant (Mandukhail *et al.*, 2010). Noni seed oil also reduced total cholesterol and triglycerides in hyperlipidemic and normolipidemic mice (Pazos *et al.*, 2011).

In hamsters submitted to a high-fat and cholesterol diet, the ingestion of noni juice decreased triacylglycerol and cholesterol serum levels, lipid deposition in liver and the atherogenic index (Lin *et al.*, 2012). In adult smokers, the consumption of noni juice reduces cholesterol levels, by decreasing LDL, triglycerides and high sensitivity C-reactive protein (hsPCR) plasma levels, the last of which is an important parameter for cardiac risk evaluation. The juice was therefore able to soften smoking-induced hyperlipidemia (Wang *et al.*, 2012).

In animal production, the antibacterial effect of noni leaf extract on *Salmonella typhimurium* was evaluated in Japanese quail breeding. Its action against this pathogen resulted in reduced quail mortality and increased egg production (Retnani *et al.*, 2014).

In newborn calves fed with noni fruit puree, antibacterial activity against *Escherichia coli* was observed. This reveals the usefulness of the fruit in production systems where antibiotic use is restricted (Schäfer *et al.*, 2008). The ethanolic fruit extract also acts against *E. coli* and inhibits *Staphylococcus aureus* growth *in vitro* (Candida *et al.*, 2014).

In vitro studies have demonstrated the antimicrobial activity of *M. citrifolia* against both *S. aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (Zaidan *et al.*, 2005). The aqueous extract of leaves exhibited moderate antibacterial activity *in vitro* and *in vivo* (Serafini *et al.*, 2011), while ethanolic crude extract of noni and its hexane fraction demonstrated antituberculosis activity *in vitro* (Saludes *et al.*, 2002).

ANTIBACTERIAL AND ANTI-SEPTIC ACTIVITIES

Irreversible hydrocolloids are used in dentistry as a molding material in the confection of dental restorations. The use of *M. citrifolia* extract with hydrocolloid powder in the preparation of dental impressions decreased contamination by microorganisms, without harming the quality of the material (Ahmed *et al.* 2015).

In fruit farming, it was observed that the immersion of mango cubes in noni juice had an antimicrobial effect on mesophilic bacteria, molds and yeasts, demonstrating that this can be a potentially valuable technology for the decontamination of sliced fresh fruit surfaces (Ulloa *et al.*,

ANTIFUNGAL ACTIVITY

Lyophilized fruit extract of *M. citrifolia* demonstrated an inhibitory effect against *Candida albicans in vitro*, which varied according to concentration and contact time (Jainkittivong *et al.*, 2009).

ANTIVIRAL ACTIVITY

This remains a major need for the development of complementary medicines for the treatment of diseases caused by viruses. Therefore, the presence of compounds with antiviral activity in medicinal plants constitutes a potential therapeutic target. In a study involving hepatitis C cell culture, it was shown that the methanol extract of leaves and its hexane and ethyl acetate fractions possess antiviral activity (Ratnoglik *et al.*, 2014).

Isolated compounds from the fruit methanol extract exhibited moderate inhibitory effects against Epstein–Barr virus *in vitro* (Akihisa *et al.*, 2007). However, *in vitro* anti-HIV activity was not found in HIV-1-infected MT-4 cells treated with *M. citrifolia* fruit (juice and dry extract) methanolic and ethanolic extracts (Selvam *et al.*, 2009).

LEISHMANICIDAL ACTIVITY

The search for new drugs to treat leishmaniasis has increased due to the elevated frequency of drug resistance cases in endemic areas, in addition to the side effects and treatment complications of the disease (Sereno *et al.*, 2007).

Several *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated the leishmanicidal effect of *M. citrifolia*. Almeida-Souza *et al.* (2016) evaluated the action of noni fruit extract on *Leishmania infantum* promastigotes and found that the extract was not toxic at concentrations of up to 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, with an IC_{50} of 260.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Moreover, it was shown that administration of the extract led to intense ultrastructural changes in promastigotes, resulting in parasite destruction.

The leishmanicidal potential of noni has also been evaluated in experimental infection in mice. In BALB/c mice infected with *L. amazonensis* and treated with

crude noni fruit extract, intense extracellular matrix production was observed at the lesion site, characterized by the predominance of mature collagen and the absence of significant histological alterations in other analyzed organs. In contrast, infected and untreated animals exhibited extracellular matrix destruction, hyperplasia of the white pulp of the spleen and inflammatory infiltrates in the liver. Results show that *M. citrifolia* provides effective control of lesions caused by infection (Mondego-Oliveira *et al.*, 2015).

Two clinical trials in human patients with cutaneous leishmaniasis were performed to evaluate the efficacy of *M. citrifolia* stem, leaf and fruit methanolic extracts. A 1% topical preparation was prepared and applied to the skin lesions. A marked improvement and regression of lesions was observed in 50% of patients, while there

was a moderate improvement in 30% of patients and a significant improvement in 20%. The leaf and fruit extracts have been found not to be very effective in treatment (Sattar *et al.*, 2012; Siddiqui *et al.*, 2014).

ANTIINFLAMMATORY ACTIVITY

The antiinflammatory action of *M. citrifolia* has been demonstrated in *in vitro* and *in vivo* models in a number of pathological conditions associated with inflammation. The antiinflammatory effects of noni juice were investigated *in vitro* by measuring the production of nitric oxide and prostaglandin E2 in activated macrophages, and the inhibition of COX 1 and 2, and *in vivo* on carrageenan-induced paw edema in rats. The juice reduced paw edema, directly inhibited the action of COX 1 and 2 and reduced nitric oxide and prostaglandin E2 production in J774.G8 cells, in a dose-dependent manner, demonstrating the antiinflammatory action of noni, which is also enhanced by its antioxidant effect (Dussossoy *et al.*, 2011).

Nualsanit *et al.* (2011) also demonstrated the *in vitro* and *in vivo* antiinflammatory effects of noni extract and its isolated compound, damnacanthal, which reduced paw edema in rats and mice and down-regulated nuclear factor kappa B (NF- κ B) activity induced by lipopolysaccharides. The production of proinflammatory cytokines, COX2 and inducible nitric oxide synthase was also suppressed by damnacanthal.

The aqueous extract of noni leaves has anti-inflammatory potential, significantly reducing leukocyte migration, and can be used as an alternative to pain and inflammatory situations, including those related to oxidation (Serafini *et al.*, 2011). The ethanolic extract of noni fruit inhibits the production of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) by human monocytes after stimulation with LPS *in vitro*, with a similar effect to hydrocortisone, a drug used for the treatment of arthritis. This result shows the effectiveness of noni in reducing inflammation in arthritis (Basar *et al.*, 2010).

The ethanol and ethyl acetate fractions of noni fruit extract negatively regulated inflammatory responses during *Helicobacter pylori* infection *in vitro* (Huang *et al.*, 2014).

The chloroform fraction of the root extract has an antiinflammatory effect, significantly reducing histamine-induced paw edema at a concentration of 3 g/kg. Damnacanthal, used alone, meanwhile, reduces edema at concentrations of 10–100 mg/kg (Okusada *et al.*, 2011). Likewise, other anthraquinones isolated from the

methanolic fraction of noni fruit extract exhibited potent antiinflammatory activity in an induced inflammation model in mice (Akihisa *et al.*, 2007).

ANTINOCICEPTIVE AND ANALGESIC ACTIVITY

The lyophilized aqueous extract of *M. citrifolia* roots demonstrated significant and dose-dependent analgesic effects and behavioral changes in mice (Younos *et al.*, 1990). Noni leaf aqueous extract exhibited

antinociceptive action in a writhing test induced by acetic acid (Serafini *et al.*, 2011).

The chloroform fraction of the root extract and damnacanthol isolated from the root has antinociceptive effects, reducing the pain related to formalin test behavior.

Its effects are mediated in part by

interference with histamine receptors in mice (Okusada *et al.*, 2011). A 10% solution of concentrated noni fruit puree added to the drinking water of mice with arthritis reduced sensitivity to pain in comparison with tramadol, a central analgesic drug, showing that noni puree is effective at reducing the pain caused by arthritis (Basar *et al.*, 2010).

ANTIOXIDANT ACTIVITY

Noni can be used as a valuable source of natural antioxidants (Thoo *et al.* 2013). Noni fruit juice, with or without seeds, is capable of modulating cell-mediated immune response and antioxidant enzyme activity *in vitro* (Pratap *et al.*, 2016). In a *Drosophila melanogaster* somatic cell model, the protective effects of TNJ® depended on its concentration, indicating a dose–response correlation, which can be attributed to either a powerful antioxidant action or the ability to capture free radicals (Franchi *et al.*, 2013).

M. citrifolia hydroalcoholic extract exhibited antioxidant activity, with significant elimination of oxygen superoxide *in vitro* (Calzuola *et al.*, 2006). Oral treatment for 14 days with 50 mg/kg of noni leaf ethanol extract increased the activity of antioxidant enzymes such as catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase on mice with lymphoma (Anitha and Mohandass, 2006).

The antioxidant properties of noni fruit juice in humans involve decreased tissue acidosis, acid–basic balance, improvement of mitochondrial redox activity, increased tissue oxygenation and improvement of the body metabolism as a whole (Caramel *et al.*, 2015). In smokers, TNJ® ingestion had antioxidant effects, reducing the plasma levels of superoxide anion (SAR) and lipid hydroperoxide (LOOH). Superoxide anion is a reactive oxygen species capable of damaging cell structure, as LOOH is associated with lipid peroxidation (Wang *et*

al., 2009). Despite the fact that the antioxidant potential of noni has been reported, in some studies, such as that by Thani *et al.* (2010), this effect was not observed. In this case, the dichloromethane extract of the fresh leaves did not present antioxidant activity *in vitro*.

NEUROPROTECTIVE ACTIVITY

The neuroprotective action of a 100% concentrated noni juice (Tahitian Noni Original Concentrate) was tested in rabbits using a hydrocephalus-induced degenerative disorder model, and its effect was compared with that of memantine. To detect apoptosis and neuronal degeneration in the periventricular tissue of the fourth ventricle of rabbits, microtubule-associated protein-2 and caspase-3 immunohistochemistry were performed. The intensity of immunohistochemical

staining was observed to be significantly higher in the noni group, and the treatment reduced the number of caspase-3-positive cells, while the memantine had no effect. These findings suggest that noni has more obvious inhibitory effects on hydrocephalus-induced degenerative disorders than memantine (Köktürk *et al.*, 2013).

The effects of noni neuronal protection against ischemic stress were evaluated in two experiments. In the first, noni juice (Okinawa Noni juice) had a preventive effect against cerebral ischemic stress, demonstrated by a reduction of the infarcted area and fewer neurological deficits in mice (Harada *et al.*, 2009). In the second experiment, the treatment increased insulin serum levels *in vitro*, favoring secretion after ischemic stress and possibly attenuating the development of glucose intolerance (Harada *et al.*, 2010).

The neuroprotective effect of the noni fruit ethyl acetate fraction was also observed. Its administration in mice with beta-amyloid induced cognitive dysfunction, at a dose of 400 mg/kg, and increased serotonin, dopamine and antioxidant enzyme serum levels (Muralidharan *et al.*, 2010).

The administration of noni fruit ethanol extract and its chloroform and ethyl acetate fractions improve memory and brain blood flow and attenuate oxidative stress and acetylcholinesterase activity after scopolamine stimuli, demonstrating the usefulness of noni in the treatment of memory loss problems in mice (Pachauri *et al.*, 2012). In mice with streptozotocin-induced Alzheimer's disease, the ethyl acetate fraction prevented memory loss, improved energy metabolism in the brain and cholinergic neurotransmission, and exhibited antioxidant action (Pachauri *et al.*, 2013).

The ingestion of noni juice has a protective action on mice brains, acting against the decline of stress-induced cognitive dysfunction, mainly due to its influence on hippocampus dentate gyrus, improving the reduction of blood vessel density caused by stress (Muto *et al.*, 2010).

Recently, several studies have been carried out to evaluate the effects of *M. citrifolia* on the nervous system. Most of

them evaluated rats or mice behavior in conditioned place preference tests, induced by the administration of drugs such as alcohol and heroin. In both cases, it was demonstrated that the administration of the methanolic extract of *M. citrifolia* fruits decreased the effects of heroin and alcohol dependence (Khan and Pandey, 2016; Narasingam *et al.*, 2016, Pandey and Khan, 2016).

The antipsychotic effect of the methanolic extract of *M. citrifolia* (MMC) fruits and the effect of the commercial TNJ® on induced behavior models in mice were also tested, and the results obtained demonstrated the antidopaminergic effect of *M. citrifolia* (Pandey *et al.*, 2012).

In addition, Pandey *et al.* (2014) evaluated the effect of the methanolic extract of *M. citrifolia* unripe fruits and the isolated compounds rutin and scopoletin on dopamine or noradrenaline-invoked contractile response in vas deferens isolated from rats. The authors verified that the methanolic extract presented a biphasic effect on dopaminergic system, i.e. an antidopaminergic effect at the lower doses and a dopaminergic action at the higher dose. Rutin and scopoletin, on the other hand, presented an antidopaminergic effect only.

WOUND HEALING ACTIVITY

The healing activity of *M. citrifolia* was evaluated with topical ointments based on noni leaf extract and through the oral administration of leaf ethanol extract and fruit juice. In all cases, evidence of a faster healing process was observed, such as decreased wound contraction and reduced re-epithelialization time, demonstrating the therapeutic effects of noni on healing (Nayak *et al.*, 2007; Nayak *et al.*, 2009; Palu *et al.*, 2010).

ANTIALLERGIC ACTIVITY

The anti-allergic potential of *M. citrifolia* in mice was evaluated by the inoculation of allergens (dinitrofluorobenzene and picryl chloride) in the ears of animals. The effect of the leaf and fruit ethanol extracts, administered orally, was evaluated in immediate and late-phase hypersensitivity reactions. A reduction of edema caused by foreign substances was observed in animals treated with noni, both immediately after the stimulus and in the delayed phase, indicating that the extract reduces mast cell degranulation and the release of histamine and other inflammatory substances. Noni may be a potential antiallergic against delayed hypersensitivity reactions or atopic dermatitis (Murata *et al.*, 2014).

ANTIANGIOGENIC ACTIVITY

One factor that determines the action of noni extracts on cancer is its anti-angiogenic potential. *M. citrifolia* leaf and fruit methanol extract, as well as the chloro- form fraction of fruit extract, exhibit anti-angiogenic activity *in vivo*, and this effect is in part attributed to scopoletin, a chemical compound found in the plant (Beh *et al.*, 2012).

Hornick *et al.* (2003), in a three-dimensional fibrin clot matrix model using human placental vein and breast tumor explants as sources for vessel development, evaluated the antiangiogenic potential of noni juice, which inhibited early angiogenesis and led to the rupture of newly formed vascular

networks. Piaru *et al.* (2012), however, observed low antiangiogenic activity *in vitro* on a rat aortic ring assay, with different concentrations of *M. citrifolia* essential oil.

ANTIEMETIC AND ANTINAUSEA ACTIVITY

The effectiveness of noni in the prevention of nausea and vomiting was demonstrated in patients with a high risk of developing these symptoms after different types of surgery. Noni extract at a concentration of 600 mg had prophylactic antiemetic action, reducing the incidence of nausea in the immediate postoperative period (Prapaitrakool and Itharat, 2010).

ANTI-GASTRIC ULCER AND OESOPHAGITIS

Mahattanadul *et al.* (2011) evaluated the effect of noni fruit aqueous extract and its isolated compound, scopoletin, in models of gastro-esophageal inflammation in rats (acid reflux esophagitis, acute gastritis induced by ethanol and serotonin and chronic gastric ulcer induced by acetic acid). Extract concentrations from 0.63 to 2.50 g/kg significantly inhibited acid reflux esophagitis, reduced the formation of gastric lesions induced by alcohol and serotonin and accelerated the healing of gastric ulcers induced by acetic acid, similar to conventional drugs (ranitidine and lansoprazole). Scopoletin also produced similar results, demonstrating that both the extract and the isolated substance may be beneficial as a potential preventive and therapeutic agent for gastro-esophageal inflammatory diseases.

In vitro studies performed by Deng *et al.* (2007) showed that crude noni fruit methanol extract had significant affinity for gamma-aminobutyric acid A (GABA-A) receptors. The results demonstrate the presence of a competitive binder, which can bind to GabaA receptor as an agonist. While this may exert anxiolytic and sedative effects *in vivo*, there is a need to prove this finding in the murine model and in clinical trials with human patients.

The fruit extract can be seen as a target for anxiety disorders, as it has a reported effect when provided as a food supplement in an animal model (Kannan *et al.*, 2014). But the need to also consider the toxic effects that the fruit may have in the body should be noted (Tin and Wiwanitkit, 2014).

ANTIHELMINTIC ACTIVITY

The aqueous and ethanolic extracts of *M. citrifolia* were effective in controlling *Ascaridia galli in vitro* and in naturally infected chickens (Brito *et al.*, 2009).

ANTIMUTAGENIC ACTIVITY

The antimutagenic and anti-recombinogenic action of TNJ® in *D. melanogaster* somatic cells has been verified (Franchi *et al.*, 2013).

ANTIPSYCHOTIC ACTIVITY

Pandy *et al.* (2012) demonstrated the antidopaminergic effect of noni fruit methanol extract in Swiss mice. The extract was administered orally for 21 days along with apomorphine and methamphetamine, suggesting that noni extract has antipsychotic activity. The same extract also inhibits the heroin compensatory effect (Narasingam *et al.*, 2016).

ANXIOLYTIC ACTIVITY

PHOTOPROTECTIVE ACTIVITY

Exposure to sunlight, particularly ultraviolet radiation (UV), has a variety of adverse effects on human health. Therefore, the photoprotective effect of noni has also become a research target. Iridoid compounds isolated from the ethanolic extract of noni leaves exhibited an inhibitory action on the AP-1 protein, induced by UVB radiation (Sang *et al.*, 2003). This protein, when activated, stimulates the transcription of disintegrative matrix enzymes genes, such as metalloproteins, which degrade structures such as collagen (Angel *et al.*, 2001). The photoprotective effect of topical formulations with *M. citrifolia* lyophilized aqueous extract was evaluated by Serafini *et al.* (2014) in rats exposed to UVA–UVB light. Seven days after treatment, and 20 h after exposure to UV light, the damage to the skin barrier, formation of erythema and histological alterations were evaluated. The results showed that the formulations containing the extract protected the animal skin from damage induced by UV radiation.

In a clinical trial with 25 volunteers submitted to erythema induction by UVB radiation and treated with topical formulation containing noni leaf ethanolic extract, a protective effect against injuries caused by radiation in the skin was observed (West *et al.*, 2009).

ANTI-WRINKLE ACTIVITY

The anthraquinone-1,4-dihydroxy-anthraquinone-2-methoxy-7-methyl, derived from noni fruit ethanolic extract, can be used as a new anti-wrinkle agent due to its ability to induce the biosynthetic activity of extracellular matrix components (Kim *et al.*, 2005). In the same study, the authors found that this compound increases the production of procollagen type I and glycosaminoglycans and reduced the expression of matrix metalloproteinase (collagenase-1) in human dermal fibroblasts. In addition, the nanoemulsion prepared from this compound increased type I procollagen synthesis in the skin of rats.

PERIODONTAL REGENERATION

TISSUE

Boonanantanasarn *et al.* (2014) evaluated the regenerative action of *M. citrifolia* lyophilized leaf extract in the periodontal ligament of premolars and molars. After cleaning the material, cell culture was performed using complete medium, ascorbic acid supplemented medium and noni extract supplemented medium, for the evaluation of cell proliferation, mineralization and protein synthesis. The results show that noni leaf aqueous extract was effective at inducing cellular proliferation, protein synthesis, alkaline phosphatase activity and *in vitro* matrix mineralization, thus having an osteoinductive effect and an effect on periodontal tissue regeneration.

SUMMARY AND DISCUSSION

Several *in vitro* and *in vivo* studies, primarily using the extracts of leaves and fruits, suggest that *M. citrifolia* may have potential for a variety of health problems. Nevertheless, well-designed and conducted clinical trials in humans are necessary to support the present findings and to guarantee and validate its efficacy and safety. Thus, noni like so many other plants used by traditional medicine may have therapeutic properties in humans, but only more research will tell.

Acknowledgements

The authors would like to thank Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA). Ana L. Abreu-Silva is a CNPq senior researcher.

Conflict of Interest

The authors have no conflicts of interest to report.

- Ahmed AS, Charles PD, Cholan R, *et al.* 2015. Antibacterial efficacy and effect of *Morinda citrifolia* L. mixed with irreversible hydrocolloid for dental impressions: a randomized controlled trial. *J Pharm Bioallied Sci* 7: S597–S599.
- Akihisa T, Matsumoto K, Tokuda H, *et al.* 2007. Anti-inflammatory and potential cancer chemo preventive constituents of the fruits of *Morinda citrifolia* (Noni). *J Nat Prod* 70: 754–757.
- Almeida-Souza F, Taniwaki NN, Amaral ACF, *et al.* 2016. Ultrastructural changes and death of *Leishmania infantum* promastigotes induced by *Morinda citrifolia* Linn. fruit (Noni) juice treatment. *Evid Based Complement Alternat Med* 2016 Article ID 5063540, 9 pages.
- Angel P, Szabowski A, Schorpp-Kistner M. 2001. Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene* 20: 2413–2423.
- Anitha T, Mohandass S. 2006. Anti-oxidant activity of *Morinda citrifolia* on lymphoma-bearing mice. *Anc Sci Life* 26: 85–88.
- Arpornsuwan T, Punjanon T. 2006. Tumor cell-selective antiproliferative effect of the extract from *Morinda citrifolia* fruits. *Phytother Res* 20: 515–517.
- Aziz MY, Omar AR, Subramani T, *et al.* 2014. Damnacanthal is a potent inducer of apoptosis with anticancer activity by stimulating p53 and p21 genes in MCF-7 breast cancer cells. *Oncol Lett* 7: 1479–1484.
- Basar S, Uhlenhut K, Högger P, *et al.* 2010. Analgesic and antiinflammatory activity of *Morinda citrifolia* L. (Noni) fruit. *Phytother Res* 24: 38–42.
- Beh HK, Seow LJ, Asmawi MZ, *et al.* 2012. Anti-angiogenic activity of *Morinda citrifolia* extracts and its chemical constituents. *Nat Prod Res* 26: 1492–1427.
- Boonanantanasarn K, Janebodin K, Suppakpatana P, *et al.* 2014. *Morinda citrifolia* leaves enhance osteogenic differentiation and mineralization of human periodontal ligament cells. *Dent Mater J* 33: 157–165.
- Brito DR, Fernandes RM, Fernandes MZ, *et al.* 2009. Anthelmintic activity of aqueous and ethanolic extracts of *Morinda citrifolia* fruit on *Ascaridia galli*. *Rev Bras Parasitol Vet* 18: 32–36.
- Calzuola I, Gianfranceschi GL, Marsili V. 2006. Comparative activity of antioxidants from wheat sprouts, *Morinda citrifolia*, fermented papaya and white tea. *Int J Food Sci Nutr* 57: 168–177.
- Candida T, França JP, Chaves AL, *et al.* 2014. Evaluation of antitumoral and antimicrobial activity of *Morinda citrifolia* L. grown in Southeast Brazil. *Acta Cir Bras* 29: 10–14.
- Caramel S, Marchionni M, Stagnaro S. 2015. *Morindacitrifolia* plays a central role in the primary prevention of mitochondrial-dependent degenerative disorders. *Asian Pac J Cancer Prev* 16: 1675.

- Clafshenkel WP, King TL, Kotlarczyk MP, *et al.* 2012. *Morinda citrifolia* (Noni) juice augments mammary gland differentiation and reduces mammary tumor growth in mice expressing the unactivated c-erbB2 transgene. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012 Article ID 487423, 15 pages.
- Deng S, West BJ, Palu AK, *et al.* 2007. Noni as an anxiolytic and sedative: a mechanism involving its gamma-aminobutyric acid ergic effects. *J Phytother* 14: 517–522.
- Dussossoy E, BratP BE, *et al.* 2011. Characterization, anti-oxidative and anti-inflammatory effects of Costa Rican noni juice (*Morinda citrifolia* L.). *J Ethnopharmacol* 133: 108–115.
- Franchi LP, Guimarães NN, De Andrade LR, *et al.* 2013. Antitumorigenic and antirecombinogenic activities of noni fruit juice in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *An Acad Bras Ciênc* 85: 585–594.
- Furusawa E, Hirazumi A, Story S, *et al.* 2003. Antitumor potential of a polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (Noni) on sarcoma 180 ascites tumour in mice. *Phytother Res* 17: 1158–1164.
- Gooda Sahib Jambocus N, Saari N, Ismail A, *et al.* 2016. An Investigation into the antiobesity effects of *Morinda citrifolia* L. leaf extract in high fat diet induced obese rats using a 1H NMR metabolomics approach. *J Diabetes Res* 2016 Article ID 2391592, 14 pages.
- Harada S, Hamabe W, Kamiya K, *et al.* 2009. Preventive effect of *Morinda citrifolia* fruit juice on neuronal damage induced by focal is chemia. *Biol Pharm Bull* 32: 405–409.
- Harada S, Fujita-Hamabe W, Kamiya K, *et al.* 2010. *Morinda citrifolia* fruit juice prevents ischemic neuronal damage through suppression of the development of post-ischemic glucose intolerance. *J Nat Med* 64: 468–473.
- Hiramatsu T, Imoto M, Koyano T, *et al.* 1993. Induction of normal phenotypes in ras-transformed cells by damnacanthol from *Morinda citrifolia*. *Cancer Lett* 73: 161–166.
- Hirazumi A, Furusawa E. 1999. An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni) with antitumour activity. *Phytother Res* 13: 380–387.
- Hirazumi A, Furusawa E, Chou SC, *et al.* 1994. Anticancer activity of *Morinda citrifolia* (noni) on intraperitoneally implanted Lewis lung carcinoma in syngeneic mice. *Proc West Pharmacol Soc* 37: 145–146.
- Hornick CA, Myers A, Sadowska-Krowicka H, *et al.* 2003. Inhibition of angiogenic initiation and disruption of newly established human vascular networks by juice from *Morinda citrifolia* (noni). *J Angiogenesis* 6: 143–149.
- Horsfall AU, Olabihi O, Aiyegbusi A, *et al.* 2008. *Morindacitrifolia* fruit juice augments insulin action in Sprague–Dawley rats with experimentally induced diabetes. *Nig Q J Hosp Med* 18: 162–165.
- Huang HL, Ko CH, Yan YY, *et al.* 2014. Antiadhesion and anti-inflammation effects of noni (*Morinda citrifolia*) fruit extracts on AGS cells during *Helicobacter pylori* infection. *J Agric Food Chem* 62: 2374–2383.
- Huang HL, Liu CT, Chou MC, *et al.* 2015. Noni (*Morinda citrifolia* L.) fruit extracts improve colon microflora and exert anti-inflammatory activities in Caco-2 cells. *J Med Food* 18:663–676.
- Issell BF, Gotay CC, Pagano I, *et al.* 2009. Using quality of life measures in a Phase I clinical trial of noni in patients with advanced cancer to select a Phase II dose. *J Diet Suppl* 6: 347–359.
- Jainkittivong A, Butsarakamruha T, Langlais RP. 2009. Antifungal activity of *Morinda citrifolia* fruit extract against *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 108: 394–398.
- Jang BC. 2012. The fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni) downregulates HIF-1 α protein expression through inhibition of PKB, ERK-1/2, JNK-1 and S6 in manganese-stimulated A549 human lung cancer cells. *Int J Mol Med* 29: 499–504.
- Khan Y, Pandey V. 2016. Methanolic extract of *Morinda citrifolia* L. (Noni) unripe fruit attenuates ethanol-induced conditioned place preferences in mice. *Front Pharmacol e Collection7*: 352.
- Kamiya K, Hamabe W, Harada S, *et al.* 2008. Chemical constituents of *Morinda citrifolia* roots exhibit hypoglycemic effects in streptozotocin-induced diabetic mice. *Biol Pharm Bull* 31: 935–938.
- Kannan S, Manickam S, Rajamohammed MA. 2014. Anxiolytic, sedative and hypnotic activities of aqueous extract of *Morinda citrifolia* fruit. *J Ayurveda Integr Med* 5: 73–75.
- Kim SW, Jo BK, Jeong JH, *et al.* 2005. Induction of extracellular matrix synthesis in normal human fibroblasts by anthraquinone isolated from *Morinda citrifolia* (Noni) fruit. *J Med Food* 8: 552–555.
- Köktürk S, Ceylan S, Etus V, *et al.* 2013. *Morindacitrifolia* L. (noni) and memantine attenuate periventricular tissue injury of the fourth ventricle in hydrocephalic rabbits. *Neural Regen Res* 8: 773–782.
- Lim SL, Goh YM, Noordin MM, *et al.* 2016. *Morindacitrifolia* edible leaf extract enhanced immune response against lung cancer. *Food Funct* 7: 741–751.
- Lin YL, Chou CH, Yang DJ, *et al.* 2012. Hypolipidemic and antioxidative effects of noni (*Morinda citrifolia* L.) juice on high-fat/cholesterol-dietary hamsters. *Plant Foods Hum Nutr* 67: 294–302.
- Mahattanadul S, Ridditid W, Nima S, *et al.* 2011. Effects of *Morindacitrifolia* aqueous fruit extract and its biomarker scopoletin on reflux esophagitis and gastric ulcer in rats. *J Ethnopharmacol* 134: 243–250.
- Mandukhail SR, Aziz N, Gilani AH. 2010. Studies on antidyslipidemic effects of *Morinda citrifolia* (Noni) fruit, leaves and root extracts. *Lipids Health Dis* 9: 88. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-9-88>.
- Mondego-Oliveira R, Almeida-Souza F, Sá JC, *et al.* 2015. Noni fruit extract induces effective control of lesions in mice infected with *Leishmaniaamazonensis*. *J Anim Vet Adv* 14: 151–154.
- Muralidharan P, Kumar VR, Balamurugan G. 2010. Protective effect of *Morinda citrifolia* fruits on beta-amyloid (25–35) induced cognitive dysfunction in mice: an experimental and biochemical study. *Phytother Res* 24: 252–258.
- Murata K, Abe Y, Futamura-Masudaa M, *et al.* 2014. Activation of cell-mediated immunity by *Morinda citrifolia* fruit extract and its constituents. *Nat Prod Commun* 9: 445–450.
- Muto J, Hosung L, Uwaya A, *et al.* 2010. *Morinda citrifolia* fruit reduces stress-induced impairment of cognitive function accompanied by vasculature improvement in mice. *Physiol Behav* 101: 211–217.
- Narasingam M, Pandey V, Mohamed Z. 2016. Noni (*Morinda citrifolia* L.) fruit extract attenuates the rewarding effect of heroin in conditioned place preference but not withdrawal in rodents. *Exp Anim* 65(2): 157–164.
- Nayak S, Mengi S. 2010. Immunostimulant activity of noni (*Morinda citrifolia*) on T and B lymphocytes. *Pharm Biol* 48: 724–731.
- Nayak BS, Isitor GN, Maxwell A, *et al.* 2007. Wound-healing activity of *Morinda citrifolia* fruit juice on diabetes-induced rats. *J Wound Care* 16: 83–86.
- Nayak BS, Sandiford S, Maxwell A. 2009. Evaluation of the wound-healing activity of ethanolic extract of *Morinda citrifolia* L. leaf. *Evid Based Complement Alternat Med* 6: 351–356.
- Nayak BS, Marshall JR, Isitor G, *et al.* 2011. Hypoglycemic and hepatoprotective activity of fermented fruit juice of *Morinda citrifolia* (Noni) in diabetic rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011 Article ID 875293, 5 pages.
- Nerurkar PV, Nishioka A, Eck PO, *et al.* 2012. Regulation of glucose metabolism via hepatic for khead transcription factor 1 (FoxO1) by *Morinda citrifolia* (noni) in high-fat diet-induced obese mice. *Bri J Nutr* 108: 218–228.
- Nualsanit T, Rojanapanthu P, Gritsanapan W, *et al.* 2011. Damnacanthol-induced anti-inflammation is associated with inhibition of NF- κ B activity. *Inflamm Allergy Drug Targets* 10: 455–463.
- Nualsanit T, Rojanapanthu P, Gritsanapan W, *et al.* 2012. Damnacanthol, a noni component, exhibits antitumorigenic activity in human colorectal cancer cells. *J Nutr Biochem* 23: 915–923.
- Okusada K, Nakamoto K, Nishida M, *et al.* 2011. The antinociceptive and anti-inflammatory action of the CHCl₃-soluble phase and its main active component, damnacanthol, isolated from the root of *Morinda citrifolia*. *Biol Pharm Bull* 34: 103–107.
- Pachauri SD, Tota S, Khandelwal K, *et al.* 2012. Protective effect of fruits of *Morindacitrifolia* L. on scopolamine induced memory impairment in mice: a behavioral, biochemical and cerebral blood flow study. *J Ethnopharmacol* 139: 34–41.
- Pachauri SD, Verma PR, Dwivedi AK, *et al.* 2013. Ameliorative effect of Noni fruit extract on streptozotocin-induced memory impairment in mice. *Behav Pharmacol* 24: 307–319.

- Pak-Dek MS, Abdul-Hamid A, Osman A, *et al.* 2008. Inhibitory effect of *Morinda citrifolia* L. on lipoprotein lipase activity. *J Food Sci* 73: 595-598.
- Palu AK, Kim AH, West BJ, *et al.* 2008. The effects of *Morinda citrifolia* L. (noni) on the immune system: its molecular mechanisms of action. *J Ethnopharmacol* 115: 502-506.
- Palu A, Su C, Zhou BN, *et al.* 2010. Wound healing effects of noni (*Morinda citrifolia* L.) leaves: a mechanism involving its PDGF/ A2A receptor ligand binding and promotion of wound closure. *Phytother Res* 24: 1437-1441.
- Pandy V, Narasingam M, Mohamed Z. 2012. Antipsychotic-like activity of noni (*Morinda citrifolia* Linn.) in mice. *BMC Complement Altern Med* 12: 186.
- Pandy V, Narasingam M, Kunasegaran T, *et al.* 2014. Effect of noni (*Morinda citrifolia* Linn.) fruit and its bioactive principles scopoletin and rutin on rat vas deferens contractility: an *in vivo* study. *Scientific World Journal* 2014:909586. <https://doi.org/10.1155/2014/909586>.
- Pandy V, Khan Y. 2016. Noni (*Morinda citrifolia* Linn.) fruit juice attenuates the rewarding effect of ethanol in conditioned place preference in mice. *Exp Anim* 65(4): 437-445.
- Pazos DC, Jiménez FE, Garduño L, *et al.* 2011. Hypolipidemic effect of seed oil of noni (*Morinda citrifolia*). *Nat Prod Commun* 6: 1005-1008.
- Piaru SP, Mahmud R, Abdul Majid AM, *et al.* 2012. Antioxidant and antiangiogenic activities of the essential oils of *Myristica fragrans* and *Morinda citrifolia*. *Asian Pac J Trop Med* 5: 294-298.
- Potterat O, Hamburger M. 2007. *Morinda citrifolia* (Noni) fruit— phytochemistry, pharmacology, safety. *Planta Med* 73: 191-199.
- Prapaitrakool S, Itharat A. 2010. *Morinda citrifolia* Linn. for prevention of postoperative nausea and vomiting. *J Med Assoc Thai* 93: S204-S209.
- Pratap UP, Anand K, Yasmine F, *et al.* 2016. Phytochemicals in *Morinda citrifolia* fruit selectively modulate age-associated immunity and antioxidant enzyme activities through ERK pathway in splenic lymphocytes of male F344 rats. *J Recept Signal Transduct Res* 36: 139-151.
- Ratnogli SL, Aoki C, Sudarmono P, *et al.* 2014. Antiviral activity of extracts from *Morinda citrifolia* leaves and chlorophyll catabolites, pheophorbide and pyro pheophorbide a, against hepatitis C virus. *Microbiol Immunol* 58: 188-194.
- Retnani Y, Dan TM, Taryati. 2014. *Morinda citrifolia* L. leaf extract as antibacterial *Salmonella typhimurium* to increase productivity of quail (*Coturnix Coturnix japonica*). *Pak J Biol Sci* 17: 560-564.
- Saludes JP, Garson MJ, Franzblau SG, *et al.* 2002. Antitubercular constituents from the hexane fraction of *Morinda citrifolia* Linn. (Rubiaceae). *Phytother Res* 16: 683-685.
- Sang S, Liu G, He K, *et al.* 2003. 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. *Bioorg Med Chem* 11: 2499-2502.
- Sattar FA, Ahmed F, Ahmed N, *et al.* 2012. A double-blind, randomized, clinical trial on the antileishmanial activity of a *Morinda citrifolia* (Noni) stem extract and its major constituents. *Nat Prod Commun* 7: 195-196.
- Schäfer M, Sharp P, Brooks VJ, *et al.* 2008. Enhanced bactericidal activity against *Escherichia coli* in calves fed *Morinda citrifolia* (Noni) puree. *J Vet Intern Med* 22: 499-502.
- Selvam P, Muruges N, Witvrouw M, *et al.* 2009. Studies of antiviral activity and cytotoxicity of *Wrightia tinctoria* and *Morinda citrifolia*. *Indian J Pharm Sci* 71: 670-672.

- Serafini MR, Detoni CB, Menezes P, Dos P, *et al.* 2014. UVA-UVB photoprotective activity of topical formulations containing *Morinda citrifolia* extract. *Biomed Res Int* 2014 Article ID 587819, 10 pages.
- Serafini MR, Santos RC, Guimarães AG, *et al.* 2011. *Morinda citrifolia* Linn leaf extract possesses antioxidant activities and reduces nociceptive behavior and leukocyte migration. *J Med Food* 14: 1159–1166.
- Sereno D, Cordeiro Da Silva A, Mathieu-Daude F, *et al.* 2007. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug- screening procedures. *Parasitol Int* 56: 3–7.
- Sharma K, Pachauri SD, Khandelwal K, *et al.* 2016. Anticancer effects of extracts from the fruit of *Morinda citrifolia* (Noni) in breast cancer cell lines. *Drug Res (Stuttg)* 66: 141–147.
- Siddiqui BS, Sattar FA, Begum S, *et al.* 2014. A note on anti-leishmanial, spasmolytic and spasmogenic, antioxidant and antimicrobial activities of fruits, leaves and stem of *Morinda citrifolia* Linn—an important medicinal and food supplement plant. *J Med Aromat Plants* 3: 159.
- Sukamporn P, Rojanapanthu P, Silva G, *et al.* 2016. Damncanthal and its nano formulation exhibit anti-cancer activity via cyclinD1 down-regulation. *Life Sci* 152: 60–66.
- Taskin EI, Akgün-Dar K, Kapucu A, *et al.* 2009. Apoptosis-inducing effects of *Morinda citrifolia* L. and doxorubicin on the Ehrlich ascites tumor in Balb-c mice. *Cell Biochem Funct* 27: 542–546.
- Thani W, Vallisuta O, Siripong P, *et al.* 2010. Anti-proliferative and antioxidative activities of Thai noni/Yor (*Morinda citrifolia* Linn.) leaf extract. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 41: 482–489.
- Thoo YY, Ho SK, Abas F, *et al.* 2013. Optimal binary solvent extraction system for phenolic antioxidants from mengkudu (*Morinda citrifolia*) fruit. *Molecules* 18: 7004–7022.
- Tin SS, Wiwanitkit V. 2014. *Morinda citrifolia* fruit and anxiolytic effect. *J Ayurveda Integr Med* 5: 140.
- Ulloa JA, González Tapia NT, Rosas Ulloa P, *et al.* 2015. Effect of soaking in noni (*Morinda citrifolia*) juice on the microbiological and color behavior of Haden minimally processed mango. *J Food Sci Tech* 52: 3079–3085.
- Wang MY, Su C. 2001. Cancer preventive effect of *Morinda citrifolia* (Noni). *Ann N Y Acad Sci* 952: 161–168.
- Wang MY, West BJ, Jensen CJ, *et al.* 2002. *Morinda citrifolia* (Noni): a literature review and recent advances in Noni research. *Acta Pharmacol Sin* 12: 1127–1141 2002.
- Wang MY, Lutfiyya MN, Weidenbacher-Hoper V, *et al.* 2009. Antioxidant activity of noni juice in heavy smokers. *ChemCent J* 3: 2009.
- Wang MY, Peng L, Weidenbacher-Hoper V. 2012. Noni juice improves serum lipid profiles and other risk markers in cigarette smokers. *Sci World J* 2012 Article ID 594657, 8 pages.
- West BJ, Deng S, Palu AK, *et al.* 2009. *Morinda citrifolia* Linn. (Rubiaceae) leaf extracts mitigate UVB-induced erythema. *J Nat Med* 63: 351–354.
- Wu Y, Girmay S, Da Silva VM, *et al.* 2015. The role of endophytic fungi in the anticancer activity of *Morinda citrifolia* Linn.(Noni). *Evid Based Complement Alternat Med* 2015 Article ID 393960, 8 pages.
- Younos C, Rolland A, Fleurentin J, *et al.* 1990. Analgesic and behavioral effects of *Morinda citrifolia*. *Planta Med* 56: 430–434.
- Zaidan MR, Noor Rain A, Badrul AR, *et al.* 2005. In vitro screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method. *Trop Biomed* 22: 165–170.

ANEXO 1

FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit with FITC annexin V and PI, for Flow Cytometry

Catalog no. V13242

Table 1. Contents and storage information.

| Material | Amount | Composition | Storage* | Stability |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| FITC annexin V (Component A) | 250 µL | Solution in 25 mM HEPES, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4, 0.1% bovine serum albumin (BSA) | <ul style="list-style-type: none"> • 2–6°C • Protect from light • DONOT FREEZE COMPONENT A | When stored as directed this kit is stable for 6 months. |
| Propidium iodide (PI, Component B) | 100 µL | 1 mg/mL (1.5 mM) solution in deionized water | | |
| 5X annexin-binding buffer (Component C) | 15 mL | 50 mM HEPES, 700 mM NaCl, 12.5 mM CaCl ₂ , pH 7.4 | | |
| *The FITC annexin V and propidium iodide are light sensitive and may be handled in normal room light, but avoid prolonged exposure to light. | | | | |
| Number of assays: Sufficient material is supplied for 50 flow cytometry assays based on a 100 µL assay volume. | | | | |
| Approximate fluorescence excitation/emission maxima: FITC annexin V: 494/518 in nm; Propidium iodide: 535/617 in nm, bound to DNA. | | | | |

Introduction

Apoptosis is a carefully regulated process of cell death that occurs as a normal part of development. Inappropriately regulated apoptosis is implicated in disease states, such as Alzheimer's disease and cancer. Apoptosis is distinguished from necrosis, or accidental cell death, by characteristic morphological and biochemical changes, including compaction and fragmentation of the nuclear chromatin, shrinkage of the cytoplasm, and loss of membrane asymmetry.¹⁻⁵ In normal live cells, phosphatidylserine (PS) is located on the cytoplasmic surface of the cell membrane. However, in apoptotic cells, PS is translocated from the inner to the outer leaflet of the plasma membrane, thus exposing PS to the external cellular environment.⁶ In leukocyte apoptosis, PS on the outer surface of the cell marks the cell for recognition and phagocytosis by macrophages.^{7,8} The human anticoagulant,

annexin V, is a 35–36 kDa Ca^{2+} -dependent phospholipid-binding protein that has a high affinity for PS.⁹ Annexin V labeled with a fluorophore or biotin can identify apoptotic cells by binding to PS exposed on the outer leaflet.¹⁰

The FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit with FITC annexin V and PI for flow cytometry provides a rapid and convenient assay for apoptosis. The kit contains recombinant annexin V conjugated to fluorescein (FITC annexin V), as well as a ready-to-use solution of the red-fluorescent propidium iodide (PI) nucleic acid binding dye. PI is impermeant to live cells and apoptotic cells, but stains dead cells with red fluorescence, binding tightly to the nucleic acids in the cell. After staining a cell population with FITC annexin V and PI in the provided binding buffer, apoptotic cells show green fluorescence, dead cells show red and

green fluorescence, and live cells show little or no fluorescence (Figure 1). These populations can easily be distinguished using a flow cytometer with the 488 nm line of an argon-ion laser for excitation.

We have optimized this assay using Jurkat cells, a human T-cell leukemia clone, treated with camptothecin to induce apoptosis. Some modifications may be required for use with other cell types.

Before Starting

Materials Required but Not

- Provided**
- Samples (appropriate sample concentrations range from 2×10^5 to 1×10^6 cells/mL)
 - Inducing agent
 - Phosphate buffered saline (PBS)
 - Deionized water

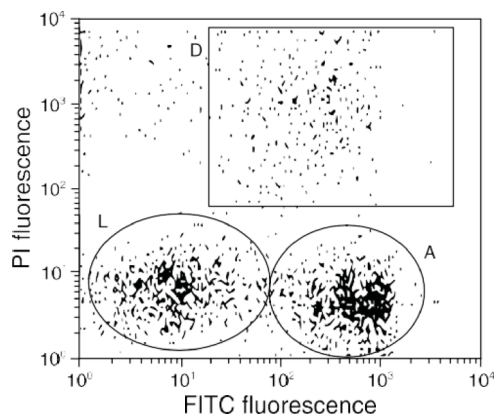
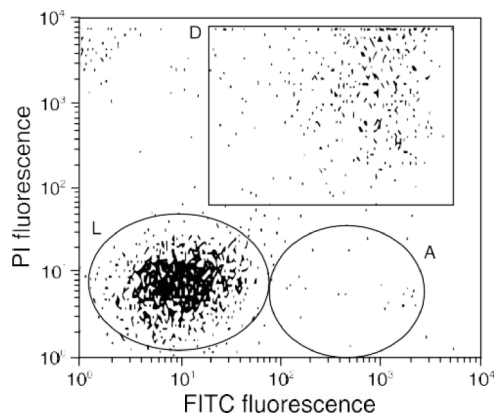


Figure 1. Jurkat cells (T-cell leukemia, human) treated with 10 μ M camptothecin for four hours (bottom panel) or untreated (as control, top panel). Cells were then treated with the reagents in the kit, followed by flow cytometric analysis. Note that the camptothecin-treated cells (bottom panel) have a higher percentage of apoptotic cells (indicated by an “A”) than the basal level of apoptosis seen in the control cells (top panel). L = live cells, D = dead cells.

Caution Propidium iodide is a potential mutagen; use appropriate precautions when handling this reagent.

Experimental Protocols

We have optimized this assay using Jurkat cells treated with camptothecin to induce apoptosis. Some modifications may be required for use with other cell types.

Flow Cytometry

Induce apoptosis in cells using the desired method. Prepare a negative control by incubating cells in the absence of inducing agent.

Harvest the cells after the incubation period and wash in cold phosphate-buffered saline (PBS).

Prepare 1X annexin-binding buffer. For example, for ~10 assays, add 1 mL 5X annexin-binding buffer (Component C) to 4 mL deionized water.

Prepare a 100 µg/mL working solution of PI by diluting 5 µL of the 1 mg/mL PI stock solution (Component B) in 45 µL 1X annexin-binding buffer.

Store the unused portion of this working solution for future experiments.

Re-centrifuge the washed cells (from step 1.2), discard the supernatant, and resuspend the cells in 1X annexin-binding buffer.

Determine the cell density and dilute in 1X annexin-binding buffer to $\sim 1 \times 10^6$ cells/mL, preparing a sufficient volume to have 100 µL per assay.

Add 5 µL of FITC annexin V (Component A) and 1 µL of the 100 µg/mL PI working solution (prepared in step 1.4) to each 100 µL of cell suspension.

Incubate the cells at room temperature for 15 minutes.

After the incubation period, add 400 µL of 1X annexin-binding buffer, mix gently and keep the samples on ice.

As soon as possible, analyze the stained cells by flow cytometry, measuring the fluorescence emission at 530 nm (e.g., FL1) and >575 nm (e.g., FL3). The population should separate into three groups: live cells will show only a low level of fluorescence, apoptotic cells show green fluorescence and dead cells show both red and green fluorescence (see Figure 1).

Confirm the flow cytometry results by viewing the cells under a fluorescence microscope, using filters appropriate for fluorescein (FITC) and rhodamine (TRITC) or Texas Red® dye.

Microscopy

This protocol was developed using Jurkat cells treated with

camptothecin to induce apoptosis and may be adapted for adherent cell lines.

Induce apoptosis in cells using the desired method. Prepare a negative controls by incubating cells in the absence of inducing agent.

After the incubation period, wash the cells in cold PBS.

Prepare 1X annexin-binding buffer. For example, to make 1 mL of the 1X buffer, add 200 μ L 5X annexin-binding buffer (Component C) to 800 μ L deionized water.

Prepare a 100 μ g/mL working solution of PI by diluting 5 μ L of the 1 mg/mL PI stock solution (Component B) in 45 μ L 1X annexin-binding buffer.

Store the unused portion of this working solution for future experiments.

Re-centrifuge the washed cells (from step 2.2), discard the supernatant, and resuspend the cells in 1X annexin-binding buffer.

Determine the cell density and dilute in annexin-binding buffer to $\sim 1 \times 10^6$ cells/mL, preparing a sufficient volume for deposition on a slide.

Add 5–25 μ L of the annexin V conjugate (Component A) and 1–2 μ L of the 100 μ g/mL PI working solution (prepared in step 2.4) to each 100 μ L of cell suspension. Higher

concentrations of the annexin V conjugate tend to produce better results; determine the optimal staining concentration empirically.

Incubate the cells at room temperature for 15 minutes.

Wash the cells with 1X Annexin-Binding buffer.

Deposit the cells onto slides, mount them using the desired method and observe the fluorescence using appropriate filters.

The cells should separate into three groups: live, apoptotic, and dead. Live cells show only weak annexin V staining of the cellular membrane, while apoptotic cells show a significantly higher degree of surface labeling. Dead cells show both membrane staining by annexin V and strong nuclear staining from the propidium iodide.

References

1. Immunol Cell Biol 76, 1 (1998); **2.** Cytometry 27, 1 (1997); **3.** J Pharmacol Toxicol Methods 37, 215 (1997); **4.** FASEB J 9, 1277 (1995); **5.** Am J Pathol 146, 3 (1995); **6.** Cytometry 31, 1 (1998); **7.** J Immunol 148, 2207 (1992); **8.** J Immunol 151, 4274 (1993); **9.** J Biol Chem 265, 4923 (1990); **10.** Blood 84, 1415 (1994).

Product List Current prices may be obtained from our website or from our Customer Service Department.

| Cat. no. | Product Name | Unit Size |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| V13242 | FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit with FITC annexin V and PI *flow cytometry* *50 assays* | 1 kit |

Contact Information

Molecular Probes, Inc. 29851 Willow Creek Road Eugene, OR 97402
Phone: (541) 465-8300
Fax: (541) 335-0504

Customer Service:

6:00 am to 4:30 pm (Pacific Time) Phone: (541) 335-0338
Fax: (541) 335-0305
probesorder@invitrogen.com

Toll-Free Ordering for USA:

Order Phone: (800) 438-2209
Order Fax: (800) 438-0228

Technical Service:

8:00 am to 4:00 pm (Pacific Time) Phone: (541) 335-0353
Toll-Free (800) 438-2209
Fax: (541) 335-0238
probestech@invitrogen.com

Invitrogen European Headquarters

Invitrogen, Ltd. 3 Fountain Drive
Inchinnan Business Park Paisley PA4 9RF, UK
Phone: +44 (0) 141 814 6100
Fax: +44 (0) 141 814 6260
Email: euroinfo@invitrogen.com
Technical Services: eurotech@invitrogen.com

For country-specific contact information, visit www.invitrogen.com.

Further information on Molecular Probes products, including product bibliographies, is available from your local distributor or directly from Molecular Probes. Customers in Europe, Africa and the Middle East should contact our office in Paisley, United Kingdom. All others should contact our Technical Service Department in Eugene, Oregon.

Molecular Probes products are high-quality reagents and materials intended for research purposes only. These products must be used by, or directly under the supervision of, a technically qualified individual experienced in handling potentially hazardous chemicals. Please read the Material Safety Data Sheet provided for each product; other regulatory considerations may apply.

Limited Use Label License No. 223: Labeling and Detection Technology

The purchase of this product conveys to the buyer the non-transferable right to use the purchased amount of the product and components of the product in research conducted by the buyer (whether the buyer is an academic or for-profit entity). The buyer cannot sell or otherwise transfer (a) this product (b) its components or (c) materials made using this product or its components to a third party or otherwise use this product or its components or materials made using this product or its components for Commercial Purposes. The buyer may transfer information or materials made through the use of this product to a scientific collaborator, provided that such transfer is not for any Commercial Purpose, and that such collaborator agrees in writing (a) to not transfer such materials to any third party, and (b) to use such transferred materials and/or information solely for research and not for Commercial Purposes. Commercial Purposes means any activity by a party for consideration and may include, but is not limited to: (1) use of the product or its components in manufacturing; (2) use of the product or its components to provide a service, information, or data; (3) use of the product or its components for therapeutic, diagnostic or prophylactic purposes; or (4) resale of the product or its components, whether or not such product or its components are resold for use in research. Invitrogen Corporation will not assert a claim against the buyer of infringement of the above patents based upon the manufacture, use or sale of a therapeutic, clinical diagnostic, vaccine or prophylactic product developed in research by the buyer in which this product or its components was employed, provided that neither this product nor any of its components was used in the manufacture of such product. If the purchaser is not willing to accept the limitations of this limited use statement, Invitrogen is willing to accept return of the product with a full refund. For information on purchasing a license to this product for purposes other than research, contact Molecular Probes, Inc., Business Development, 29851 Willow Creek Road, Eugene, OR 97402, Tel: (541) 465-8300. Fax: (541) 335-0354.

Several Molecular Probes products and product applications are covered by U.S. and foreign patents and patents pending. All names containing the designation ® are registered with the U.S. Patent and Trademark Office.

Copyright 2010, Molecular Probes, Inc. All rights reserved. This information is subject to change without notice.