

Efecto protector del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L. sobre el cáncer de mama en ratones

Protective effect of ethanol extract of *Cenchrus echinatus* L. breast cancer in mice

Efeito protetor do extrato etanólico de *Cenchrus echinatus* L. câncer de mama em ratos

César B. Cisneros Hilario¹, Jorge L. Arroyo Acevedo², Keith L. Carrillo Julca³

Resumen

El presente trabajo determinó el efecto protector del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L. sobre el cáncer de mama inducido en ratones. El diseño del estudio fue preclínico, experimental; se realizó en la Facultad de Medicina Humana de la USP Chimbote-Perú. Se utilizaron 50 ratones hembras de 25 ± 5 g de peso, las cuales fueron distribuidas al azar en 5 grupos de 10 c/u, el primer grupo: normal, segundo: recibe tóxico, el tercero, cuarto y quinto grupo: tóxico DMBA y extracto en tres niveles de dosificación. El efecto protector fue determinado registrándose macroscópicamente el tamaño y número de masas tumorales, además de la proliferación de células tumorales. Los datos fueron evaluados usando análisis estadístico descriptivo e inferencial (análisis de varianza, comparación de medias), considerando ($p < 0.05$). Se logró un 80% del efecto protector del cáncer de mama al administrar por vía oral durante 160 días el extracto en dosis de 200 mg/kg.

Palabras clave: Cáncer de mama, DMBA *Cenchrus echinatus* L., extracto etanólico.

Abstract

This paper seeks to determine the protective effect of ethanol extract of *Cenchrus echinatus* L. breast cancer induced in mice. The study design was preclinical, experimental. He was held in the Faculty of Human Medicine, USP Chimbote, Peru. normal second: get toxic, third, fourth and fifth group: Toxic DMBA extract 50 female mice of 25 ± 5 g weight, which were randomly divided into five groups of 10 c/u, the first group were used three dosage levels. The protective effect was determined macroscopically registering the size and number of tumor masses in addition to the proliferation of tumor cells. Data were evaluated using descriptive and inferential statistical analysis (analysis of variance, comparison of means), considering ($p < 0.05$). 80% of the protective effect of breast cancer by orally administering the extract for 160 days at doses of 200 mg/kg was achieved

Keywords: Breast cancer, DMBA *Cenchrus echinatus* L., ethanol extract.

Resumo

Este trabalho procura determinar o efeito protetor do extrato etanólico de *Cenchrus echinatus* L. câncer de mama induzida em ratos. O desenho do estudo foi pré-clínico, experimental. Ele foi realizada na Faculdade de Medicina Humana, USP Chimbote, Peru. normal de segunda: get grupo tóxico, terceiro, quarto e quinto: Tóxico extrato DMBA 50 ratos fêmeas, de 25 ± 5 g de peso, que foram divididos aleatoriamente em cinco grupos de 10 c/u, foram utilizados o primeiro grupo três níveis de dosagem. O efeito protetor foi determinada macroscopicamente registrar o tamanho e o número de massas de tumor para além da proliferação de células tumorais. Os dados foram avaliados por meio de análise descritiva e inferencial estatística (análise de variância, comparação de médias), considerando ($p < 0,05$). 80 % do efeito protetor do cancro da mama por meio da administração por via oral do extracto de 160 dias, em doses de 200 mg/kg foi alcançada.

Palavras-chave: O câncer de mama, DMBA *Cenchrus echinatus* L, extracto de etanol.

¹Universidad San Pedro, Dirección General de Investigación, cbraulio_cisnerosh@hotmail.com

²Univ.Nac. Mayor de San Marcos.

³Universidad San Pedro, Facultad de Medicina Humana.

Recibido, 31 de marzo de 2016
Aceptado, 6 de junio de 2016

Introducción

El término genérico cáncer de mama se refiere a la proliferación neoplásica maligna originada en el compartimiento epitelial ya sea de estructuras ductales o lobulares de la glándula mamaria, siendo el más común, el carcinoma ductal. Este cáncer, según los informes de la Organización Mundial de la Salud constituye la neoplasia maligna más común en la mujer en el mundo occidental (Seltzer, 2000). Actualmente, se considera al cáncer de mama como una patología multifactorial que se origina por efecto de más de una condición de estímulo. Los factores que están asociados al incremento de riesgo de desarrollar cáncer de mama son el género edad, menarca temprana, menopausia tardía, primer embarazo a término después de los 30 años de edad, uso de anticonceptivos o terapia hormonal de reemplazo por largos periodos, predisposiciones genéticas, dietas ricas en grasa, hábitos de fumar, tomar alcohol y haber recibido terapia con rayos X (Canales 2006).

La implementación de la fitoterapia en nuestra sociedad debe realizarse teniendo en cuenta determinadas pautas para llegar a producir los efectos deseados: la mejoría del síntoma sin efectos secundarios, la medicina vegetal o terapia con hierbas medicinales, comprende el uso de plantas o partes de plantas en su estado natural (sin procesamiento químico) (Villaescusa, 2000). Los flavonoides comprenden un amplio grupo de compuestos fenólicos que aparecen de forma espontánea en casi todas las plantas superiores, poseen un origen biosintético común y, por ese motivo, posee un mismo elemento estructural básico con diferentes grados de oxidación, dando lugar a los distintos tipos de flavonoides hoy conocidos, como: flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, isoflavonas, neoflavonas, catequinas, antocianinas, antocianidinas, chalconas, auronas, diflavonas (Lock de Ugaz, 1994). Los flavonoides, compuestos que además de estar dotados de una baja toxicidad, presentan unas características idóneas para ser considerados como compuestos antiinflamatorios y cicatrizantes, entre ellas: Inhiben distintas enzimas cuya expresión y/o actividad se encuentran incrementadas en los procesos inflamatorios y son compuestos que presentan propiedades antioxidantes *in vitro* (Asad, 2006).

Cenchrus echinatus L., vulgarmente conocida como cadillo (Soukup, 1970) pertenece a la familia Gramineae, es usado de manera tradicional para tratar problemas digestivos, genitourinarios e infecciones, además de poseer efecto analgésico y antiinflamatorios (Carrizo, 2009). Por estas razones se planteó el problema: ¿El extracto etanólico de *cadillo* tendrá efecto protector en ratones con inducción de cáncer de mama inducido por 7,12 dimetilbenzoantracina (DMBA) siendo nuestra hipótesis que el extracto etanólico de las hojas de *Cenchrus echinatus* L. al ser administrado por vía oral posee efecto protector sobre el cáncer de mama en ratones. El objetivo del estudio fue determinar el efecto protector del extracto de las hojas de *Cenchrus echinatus* L., sobre el cáncer de mama inducido por (DMBA) en ratones,

Material y métodos

La población estuvo formado por las ratones albinos cepa Balb-C52 criadas en el bioterio del Instituto Nacional de Salud Lima-Chorrillos, y la muestra que se utilizó fueron 50 ratones hembras de 25 ± 5 g de peso corporal, además de 5 Kg de plantas completas de cadillo; el diseño del estudio fue de tipo analítico-experimental, aleatorizado, completo, pre-clínico *in vivo*, las muestras vegetales fueron recolectadas en el caserío de San José, distrito de Santiago de Cao, Provincia de Ascope,

Departamento de La Libertad, Perú y su posterior identificación taxonómica en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, siendo clasificada según Cronquist (1988); Para la obtención del extracto, las plantas completas fueron seleccionadas y sometidas a deshidratación, a 40 °C en horno con aire circulante, luego el material seco, se trituro en un molino eléctrico de cuchillas, hasta obtener un polvo fino y se maceró con etanol de 96° durante 7 días, luego se filtró y dicho filtrado se desecó a 40°C en estufa hasta peso constante. El residuo seco, se denominó extracto etanólico (CYTED, 1995), el estudio fitoquímico del extracto se realizó según el método de (Lock de Ugaz, 1994) y las reacciones que se les practicaron fueron de Molisch, Fehling, tricoloruro férrico, Ninhidrina, Shinoda, Dragendorff, Bortrager Liebermann, Vainillín sulfúrico y para determinar cualitativamente la presencia y cantidad de metabolitos secundarios presentes en el extracto.

El efecto anticancerígeno fue evaluado por el método, según: Barros, 2004. Para lo cual se utilizaron 50 ratones distribuidos en igual cantidad y de manera aleatoria, donde el grupo 1° recibió SSF 5 mL/Kg, el grupo 2° recibió 20 mg de DMBA, y los grupos 3°, 4° y 5° recibieron DMBA y extracto en dosis de 10, 100 y 200 mg/Kg respectivamente, todos los tratamientos se administraron por vía oral donde el DMBA se administra por única vez y los extractos diariamente. Durante todo el proceso, se realizó la palpación de las glándulas mamarias para determinar el tiempo de aparición, número y tamaño de masas tumorales. Al culminar la semana 16, los ratones fueron anestesiados para la extracción de sangre por punción cardiaca lo que sirvió para la determinación de la bioquímica sanguínea, e inmediatamente se eutanizó para la extracción de las glándulas mamarias que sirvió para su estudio anatomopatológico. Estos estudios fueron conducidos cumpliendo las normas internacionales, y lo establecido para el cuidado y uso de animales de laboratorio (OECD, 1993).

Para el análisis estadístico de los datos se empleó el programa SPSS evaluándose diferencias y homogeneidad entre grupos. Se aplicó el análisis de varianza y el de múltiples comparaciones considerándose una $p < 0,05$.

Resultados

Tabla 1. Marcha fitoquímica del extracto etanólico de las hojas de *Cenchrus echinatus* L.

Reacción	Metabolito Secundario	Cantidad
Gelatina	Taninos	+++
Tricloruro férrico	Compuestos Fenólicos	+++
Dragendorff	Alcaloides	+++
Mayer	Alcaloides	+++
Hidróxido de sodio	Quinonas	++
Alfa naftol	Glicósidos	++
Liebermann	Esteroides y triterpenos	-
Shinoda	Flavonoides	+++
Ninhidrina	Aminoácidos libres	+++

Leyenda: (+++) = Abundante cantidad; (++)=Regular cantidad o positivo, (+)= Poca cantidad o trazas; (-)=Ausencia.

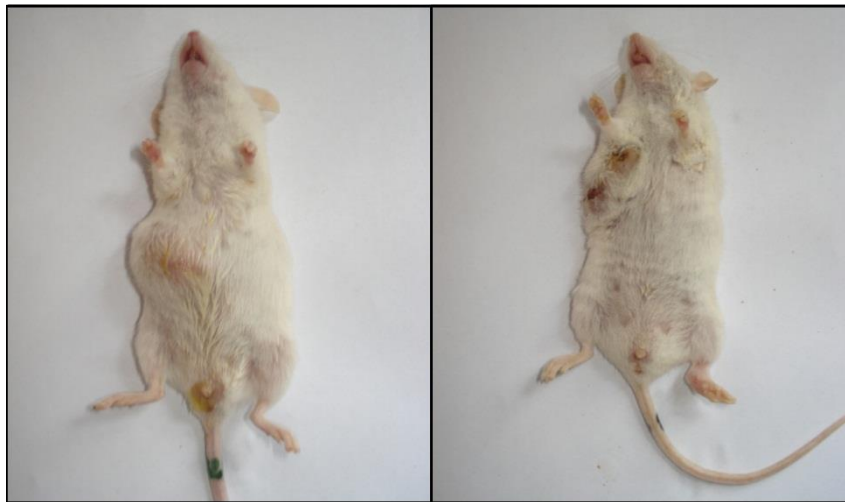


Figura 1. Especímenes evidenciando masas tumorales de mama correspondientes al grupo que sólo recibe el inductor 7,12 dimetilbenzoantracina (DMBA) a la décimo sexta semana.

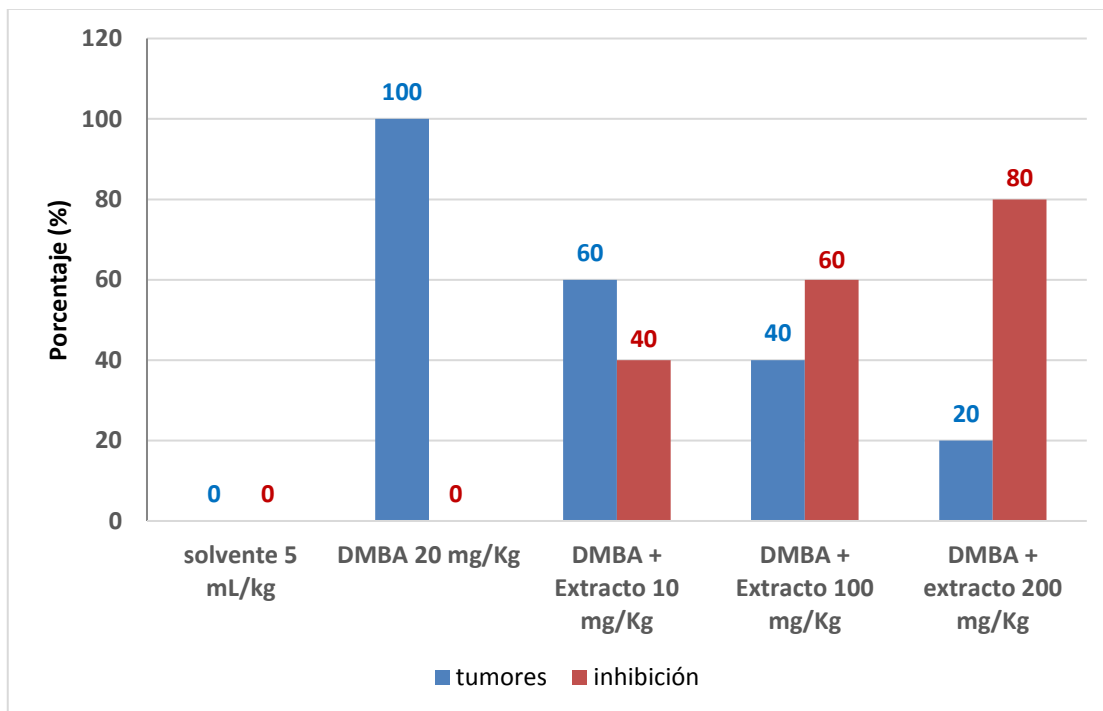


Figura 2. Porcentaje de aparición e inhibición de masas tumorales de mama a la décimo sexta semana en ratones al evaluar el efecto protector del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L. sobre el cáncer de mama inducido por DMBA.

Tabla 2. Estadística descriptiva de los parámetros bioquímicos al evaluar el efecto protector del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L. (cadillo) sobre el cáncer de mama inducido con 7,12-dimetilbenzo[a]antraceno en ratones.

Variables	Tratamientos	Valor medio	Error estándar	Variables	Tratamientos	Valor medio	Error estándar
Colesterol total (mg/dL) p<0,786	SSF 5	158,3	10,1	Abastondos (%) p<0,408	SSF 5	0,7	0,3
	DMBA 20	171,4	5,9		DMBA 220	1,6	0,5
	DMBA + E10	164,0	10,5		DMBA + E10	1,2	0,6
	DMBA + E100	162,7	7,2		DMBA + E100	0,7	0,3
	DMBA + E200	160,1	8,4		DMBA + E200	1,2	0,3
HDL (mg/dL) p<0,910	SSF 5	50,0	5,5	Segmentados (%) p<0,502	SSF 5	63,8	3,9
	DMBA 20	49,8	2,6		DMBA 20	62,7	2,5
	DMBA + E10	54,2	3,2		DMBA + E10	56,2	3,9
	DMBA + E100	50,1	3,6		DMBA + E100	62,6	3,1
	DMBA + E200	52,4	3,0		DMBA + E200	59,3	1,9
Triglicéridos (mg/dL) p<0,571	SSF 5	118,8	10,6	Eosinófilos (%) p<0,469	SSF 5	1,3	0,5
	DMBA 20	141,0	10,2		DMBA 20	2,3	0,9
	DMBA + E10	134,0	10,8		DMBA + E10	2,2	0,8
	DMBA + E100	137,4	8,0		DMBA + E100	1,3	0,8
	DMBA + E200	133,4	6,2		DMBA + E200	0,7	0,3
Glucosa (mg/dL) p<0,205	SSF 5	84,8	2,2	Basófilos (%) p<0,705	SSF 5	0,0	0,0
	DMBA 20	93,6	2,5		DMBA 20	0,0	0,0
	DMBA + E10	85,8	5,0		DMBA + E10	0,0	0,0
	DMBA + E100	86,1	3,2		DMBA + E100	0,1	0,1
	DMBA + E200	84,3	3,5		DMBA + E200	0,1	0,1
Urea (mg/dL) p<0,089	SSF 5	14,0	1,5	Monocitos (%) p<0,284	SSF 5	0,3	0,3
	DMBA 20	18,5	1,6		DMBA 20	1,8	0,6
	DMBA + E10	14,2	1,2		DMBA + E10	0,6	0,2
	DMBA + E100	16,2	0,5		DMBA + E100	1,2	0,4
	DMBA + E200	14,8	1,3		DMBA + E200	1,2	0,4
TGP (UI/dL) p<0,000	SSF 5	12,8	0,9	Linfocitos (%) p<0,742	SSF 5	33,2	4,0
	DMBA 20	27,0	2,8		DMBA 20	33,2	3,1
	DMBA + E10	17,2	2,4		DMBA + E10	38,6	3,2
	DMBA + E100	13,8	1,3		DMBA + E100	34,9	3,3
	DMBA + E200	14,1	1,7		DMBA + E200	37,1	1,8
Fosfatasa alcalina (UI/dL) p<0,024	SSF 5	105,5	9,8	Leucocitos (leuc x mL) p<0,171	SSF 5	5293,3	251,5
	DMBA 20	139,4	11,4		DMBA 20	7470,0	763,8
	DMBA + E10	136,4	4,2		DMBA + E10	6982,0	821,7
	DMBA + E100	118,6	6,2		DMBA + E100	6822,0	467,7
	DMBA + E200	108,4	5,2		DMBA + E200	6268,9	451,7

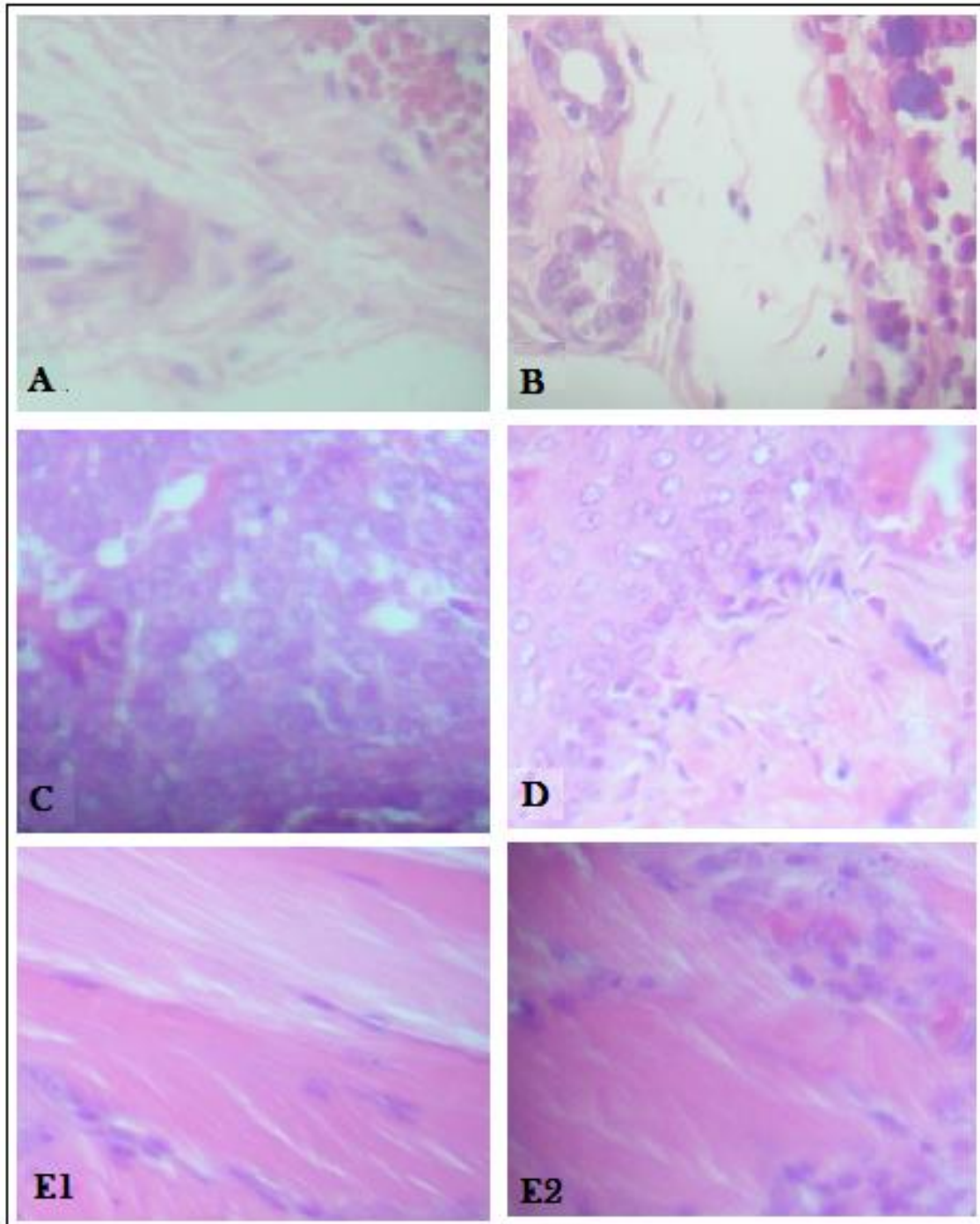


Figura 3. Estudio anatomopatológico de las muestras tumorales al evaluar el efecto protector del cadillo sobre el cáncer de mama inducido por DMBA en ratones. (400 X). Dónde: **A.** Glándula mamaria normal (Grupo: SSF 5mL/Kg.) **B.** Hiperplásicas, Hipertrofia, Adenocarcinoma (Grupo: DMBA 20 mg). **C.** Carcinoma mamario con metastasis (Grupo: DMBA + cadillo 10 mg/Kg.) **D.** Glán. mamar con infiltrac inflamatorio (Grupo: DMBA + cadillo 100 mg/Kg.) **E1-E2.** Glándula mamaria con nódulo linfático más infiltración de células mononucleares en zona muscular. (Grupo: DMBA + cadillo 200 mg/Kg.)

Discusión

El DMBA es uno de los hidrocarburos policíclicos aromáticos más potentes para inducir cáncer de mama, debido a su bioactivación e interacción con el ADN. Así, en la célula mamaria, el metabolito reactivo diol-epóxido adiciona residuos de adenina y guanina al ADN. La formación de metabolitos genotóxicos como el diol epóxido del DMBA es favorecida por acción de la familia de citocromo P450. Se ha identificado CYP1A1 y CYP1B1 como enzimas que metabolizan la conversión del DMBA a 3,4-diol-epóxido. Al respecto, se conoce que los flavonoides tipo nafto flavona, inhiben competitivamente CYP1A y además inhiben la unión al ADN (Weimer, 2000).

El extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L. evidencia un 80% de eficacia protectora (figura 1) además de ser rico en compuestos fenólicos y flavonoides (tabla 1). Además en este estudio se aprecia la respuesta sobre los adenocarcinomas de mama por efecto del extracto etanólico, observándose un mejor efecto en el grupo que recibe extracto a dosis de 200 mg/Kg (figuras 1 y 2).

La figura 3(B) muestran las características de un adenocarcinoma mamario intraductal en el grupo que solo recibió DMBA. La figura 3(C, D, E) muestran las respuestas favorables del extracto etanólico sobre el cáncer de mama inducido en ratones, siendo dosis dependientes. Nuestro hallazgo principal fue la reducción de la aparición de masas tumorales, debido a los flavonoides de *Cenchrus echinatus* L., cuyo beneficio puede explicarse porque los flavonoides inducen apoptosis al activar la caspasa 8 y Bax, inhiben la expresión del Bcl-2 y permiten la liberación de citocromo C (Jang, 2005). El cáncer mama es un problema de salud pública, ocupa el segundo lugar de mortalidad en mujeres a partir de 20 años en el Perú (Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas, 2007), y entre el primer y segundo lugar a nivel internacional (Jernal, 2005) Debido a la resistencia farmacológica y los marcados efectos adversos de los agentes que actualmente se emplea en su tratamiento, se hace necesaria la búsqueda de nuevos productos, de preferencia naturales, que puedan demostrar eficacia y mínimos efectos adversos en el manejo de esta enfermedad.. Así mismo se evaluó la toxicidad del extracto evidenciándose en la tabla 2 que el extracto no induce cambios en bioquímica sanguínea al ser administrado a los ratones, demostrando seguridad e inocuidad del extracto.

Conclusión

En condiciones experimentales se ha demostrado que el extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L., inhibe el desarrollo de tumores cancerígenos de mama en ratones, inducido por 7,12-dimetilbenzo[A]antraceno, evidenciándose seguridad y una eficacia del 80% en el grupo recibió extracto en dosis de 200 mg/kg.

Referencias bibliográficas

- Asad, S., Singh, S., Ahmad, A., Hadi, S. (2006). Flavonoids: antioxidants in diet and potential anticancer agents. *Medical Science*.
- Barros, ACS D et al., (2004). Induction of experimental mammary carcinogenesis in rats with 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene. *Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo* 59(5):257-261

- Canales, A., De Celis, R., Salado, H. (2006). *Cáncer de mama y exposición a hidrocarburos aromáticos*. www.e-Gnosis.udg.mx .México Pp 1-9
- Carrizo, E., Palacio, M., Roic, L. (2009). *Plantas de uso medicinal en la flora de los alrededores de la ciudad de Santiago del Estero*.(Argentina).
- Cronquist, A. (1988). *The evolution and classification of flowering plants*. New York: *The New York Botanical Garden*, 555.
- CYTED. (1995). Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. *Proyecto X-I. Búsqueda de principios bioactivos de plantas de la región. Manual de técnicas de investigación*.
- Jang, H. S., Kook, S. H., Son, Y. O., Kim, J. G., Jeon, Y. M., Jang, Y. S., Choi, K. C., Kim, J., Han, S. K., Lee, K. Y., Park, B. K., Cho, N. P, Lee, J.C. (2005). Flavonoids purified from *Rhus verniciflua* Stokes actively inhibit cell growth and induce apoptosis in human osteosarcoma cells. *Biochim Biophys Acta*. 1726(3):309-16. 31.
- Jemal, A., Murria, T., Ward, E., Samuel, A., Tiwari, R., Ghafoor, A., Fever, E., Thun, M. (2005). Cancer Statistics 2005. *CA Cancer J Clin*.55:10-30.
- Lock de Ugaz, O. (1994). *Investigación Fitoquímica. Métodos de estudios de productos naturales*. 2° Edición. Lima: Fondo Editorial PUCP.
- Organisation for Economic Cooperation and Development. *Oecd Guidelines for the Testing of Chemical*. V.1. V.2. OCDE; 1993; Paris.
- Seltzer, V. (2000). Cancer in women: prevention and early detection. *Womens Health Gend Based Med*. 9:483-488.
- Soukup, J. (1979). *Vocabulario de los Nombres Vulgares de la Flora Peruana y Catálogo de los Géneros* (2° ed). Ed. Salesiana. p 85.
- Villaescusa, C. (2000) La adormidera. Una fuente de alcaloides de extraordinario interés. *AFT*. 4(4):252-9
- Weimer, T., Reddy, A., Harttig, U., Alexander, D., Stamm, C., Miller M, et al. (2000). Influence of β naphthoflavone on 7,12-dimethylbenz(a)anthracene metabolism, DNA adduction, and tumorigenicity in rainbow trout. *Toxicol Sci*. 57:217-28.