



SEGURIDAD Y EFECTO PROTECTOR DE *CENCHRUS ECHINATUS* EN EL CÁNCER DE MAMA INDUCIDO EN *RATTUS RATTUS*

SAFETY AND PROTECTIVE EFFECT OF *CENCHRUS ECHINATUS* ON BREAST CANCER INDUCED IN *RATTUS RATTUS*

César Braulio Cisneros Hilario^{1,2,a}, Jorge Luis Arroyo Acevedo^{3,b}, María Paula Bedoya Castillo^{4,c}, Betsy Alexandra Lázaro Huamán^{4,c}, Katia Elizabeth Mendoza Chávez^{5,d}, Evelin Juline Cisneros Hilario^{4,e}

RESUMEN

Introducción: El cáncer de mama es una enfermedad que va aumentando su incidencia anualmente; es así que en búsqueda de alternativas complementarias para el tratamiento, se han estudiado algunas plantas medicinales que contienen grandes cantidades de polifenoles, los cuales tienen efectos anticancerígenos como es el caso del *Cenchrus echinatus* L. **Objetivo:** Determinar la seguridad y el efecto protector del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L. (cadillo) sobre el cáncer de mama inducido por 7,12-Dimetilbenzo[a]antraceno DMBA en *Rattus rattus*. **Métodos:** Estudio preclínico, experimental en ratones machos Balb/C53 y ratas Holtzman de ambos sexos. Se calculó la toxicidad aguda (DL50) y la toxicidad a 45 días mediante métodos de los probits y OECD respectivamente; para evaluar el efecto protector se utilizó el método de Barros 2004, también se registró microscópicamente la proliferación de células tumorales, utilizando el análisis estadístico descriptivo e inferencial, considerando $p < 0.05$. **Resultados:** Los estudios de seguridad demuestran que el extracto no induce cambios significativos a nivel hematológico, bioquímico y anatomopatológico. Se logró un 76.92 % del efecto protector del extracto frente al cáncer de mama inducido por DMBA en ratas. **Conclusiones:** Se ha demostrado que el extracto de *Cenchrus echinatus* L. presenta efecto protector sobre el cáncer de mama inducido por 7,12-Dimetilbenzo[a]antraceno en *Rattus rattus*; y no es tóxico en ratones y ratas.

Palabras claves: *Cenchrus echinatus* L.; Cáncer de mama; DMBA. (Fuente: DeCS BIREME)

ABSTRACT

Introduction: Breast cancer is a disease that is increasing its incidence annually, so in search of complementary alternatives for treatment have been studied some medicinal plants containing large amounts of polyphenols, which have anticancer effects as is the case of *Cenchrus echinatus* L. **Objective:** To determine the safety and protective effect of ethanol extract of *Cenchrus echinatus* L. (burdock) on breast cancer induced by 7,12-dimethylbenzo[a]anthracene in *Rattus rattus*. **Methods:** Preclinical, experimental study in male Balb/C53 mice and Holtzman rats of both sexes. Acute toxicity and toxicity at 45 days were calculated using probit and OECD methods, respectively; to evaluate the protective effect, the Barros 2004 method was used; tumor cell proliferation was also registered microscopically, using descriptive and inferential statistical analysis, considering $p < 0.05$. **Results:** Safety studies show that the extract does not induce significant hematologic, biochemical and pathological changes level 80% of the protective effect of the extract against DMBA-induced breast cancer in rats was achieved. **Conclusions:** It has been shown that *Cenchrus echinatus* extract L. has protective effect on breast cancer by 7,12-dimethylbenzo[a]anthracene induced in rats; and it is not toxic in mice and *Rattus rattus*.

Keywords: *Cenchrus echinatus* L.; Breast cancer; DMBA. (Source: MeSH NLM)

¹ Instituto de Investigaciones en Ciencias Biomédicas, Universidad Ricardo Palma. Lima, Perú.

² Universidad César Vallejo, Chimbote, Perú.

³ Facultad de Medicina "San Fernando", Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

⁴ Facultad de Medicina Humana, Universidad Ricardo Palma. Lima, Perú.

⁵ Asociación Peruana de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente Saludable. Chimbote, Perú.

^a Magíster en Farmacología con Mención en Farmacología Experimental

^b Doctor en Farmacia y Bioquímica

^c Estudiante de Pregrado

^d Maestrando en Psicología clínica y de la salud

^e Obstetra

Citar como: Cisneros Hilario CB, Arroyo Acevedo JL, Bedoya Castillo MP, Lázaro Huamán BA, Mendoza Chávez KE, Cisneros Hilario EJ. Seguridad y efecto protector de *Cenchrus echinatus* en el cáncer de mama inducido en *Rattus rattus*. Rev Fac Med Hum.2022;22(3):452-462. doi: 10.25176/RFMH.v22i3.4915

Journal home page: <http://revistas.urp.edu.pe/index.php/RFMH>

Artículo publicado por la Revista de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Ricardo Palma. Es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons: Creative Commons Attribution 4.0 International, CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), que permite el uso no comercial, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada. Para uso comercial, por favor póngase en contacto con revista.medicina@urp.pe



INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad que ha ido incrementando su incidencia en países desarrollados y en vías de desarrollo, esperando un incremento de casos del 47% (28,4 millones) entre el 2020-2040, debido a factores de riesgo que no sólo son socioeconómicos o modificables como la sobrepoblación sino también no modificables como la edad⁽¹⁻⁴⁾.

Esta expansión global, sitúa al cáncer como la primera causa de muerte prematura, logrando una disminución de hasta tres años de la esperanza de vida en países como Noruega y del Oeste de Europa⁽⁵⁾. La Global Cancer Statics 2020, reportó la aparición de 19,3 millones de casos nuevos de cáncer y casi diez millones de muertes por el mismo; también se comprobó que los casos de cáncer de mama sobrepasaron al cáncer de pulmón con 2.3 millones de nuevos casos (11,7%) contra 11,4% respectivamente, aunque el cáncer de pulmón sigue siendo la neoplasia con mayor mortalidad con 1,8 millones de muertes seguida por el cáncer colorrectal, hepático, de estómago y de mama⁽⁴⁾.

Los estudios globales en cáncer de mama han demostrado que con la estandarización de la edad a 45,9 se ha incrementado la mortalidad y los años de vida ajustado por discapacidad (AVAD); también por medio del índice sociodemográfico (SDI) se obtuvo que la mortalidad disminuyó en mujeres entre los rangos de edades de 15-49 y 50-69⁽⁶⁾. Así mismo, disminuyó su incidencia en las regiones con alto SDI y aumentó considerablemente en las zonas con mediano y bajo SDI⁽⁷⁾.

La detección precoz del cáncer de mama en mujeres juega un rol fundamental, ya que un diagnóstico tardío favorecería la progresión de la neoplasia hasta estadios avanzados como III o IV⁽⁸⁾. Siendo los factores causantes del retraso del diagnóstico los educativos, el estado civil, no reconocer los signos ni síntomas de la enfermedad, el miedo a la muerte y el no tener servicios de salud cercanos⁽⁹⁻¹¹⁾.

En varios países se ha abierto la posibilidad del empleo de plantas medicinales como complemento o alternativa de tratamiento de bajo costo y fácil acceso en ciertas regiones, siendo el Perú un país

megadiverso en cuanto a especies vegetales existen investigaciones que reconocen sus aportes terapéuticos como es el caso de *Morinda citrifolia*, *Annona muricata*, *Uncaria tomentosa*, *Cenchrus echinatus* L, demostrando propiedades anticancerígenas⁽¹²⁻¹⁵⁾.

Se ha encontrado que el extracto etanólico del *Cenchrus echinatus* L. posee taninos, compuestos fenólicos, alcaloides, flavonoides y aminoácidos libres en mayor proporción, y en menor cantidad quinonas y glicósidos⁽¹³⁻¹⁵⁾. Asociando a los polifenoles como responsables de la actividad antiulcerosa, cardioprotectora, hepatoprotectora⁽¹⁴⁾, hipolipemiente⁽¹⁵⁾, anticancerígena⁽¹⁶⁻¹⁸⁾ y antioxidante⁽¹⁹⁻²⁰⁾.

En el 2000 la OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) recomienda como necesaria la determinación de toxicidad aguda y la dosis letal media (DL50) de productos medicinales⁽²¹⁻²²⁾. Así también se evalúa posibles cambios espontáneos en el comportamiento de roedores⁽²³⁾. Siendo un producto inocuo cuando los valores de DL50 superan los 5 000 mg/Kg⁽²³⁻²⁵⁾.

Existen especies silvestres con propiedades mutagénicas, estrogénicas e inmunosupresoras entre las cuales encontramos al DMBA y N-Methyl-N-nitrosourea (NMU)⁽²⁶⁻²⁸⁾. Donde el DMBA induce a la aparición promedio de 4,7 tumores mamarios hormonodependientes en ratas, con características histopatológicas y alteraciones genéticas de la neoplasia descrita en humanos⁽²⁹⁾.

En la actualidad hay un número limitado de productos vegetales estudiados, sus componentes, la determinación de su eficacia terapéutica y la dosis a utilizar. Por tales motivos nos planteamos determinar la seguridad y el efecto protector del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L. (cadillo) sobre el cáncer de mama inducido por DMBA en *Rattus rattus*.

MÉTODOS

Diseño y área de estudio

Se realizó un estudio experimental tipo observacional, prospectivo con enfoque longitudinal.

Población y muestra

Se trabajó con two poblaciones de roedores (*Mus musculus* y *Rattus rattus* var *albinus*), estando las muestras conformadas por 84 ratones albinos machos Balb/C53 (25 ± 5 g de peso corporal) para la determinación de DL50; 20 ratas Holtzman (diez ratas machos y diez ratas hembras de 160 ± 20 g de peso corporal) para evaluar la toxicidad a 45 días y 50 ratas hembras Holtzman (80 ± 10 g de peso corporal), para la evaluación del efecto anticancerígeno de mama, todos los especímenes procedieron del bioterio del Instituto Nacional de Salud Lima-Chorrillos.

Variables e instrumentos

Para la variable extracto de *Cenchrus echinatus* L., se evaluó la seguridad oral en dosis única (DL50) en ratones y la seguridad oral en dosis repetidas en ratas, también se consideró el screening fitoquímico del extracto. Mientras que para la variable cáncer de mama se realizó la inducción de cáncer de mama en ratas con DMBA y se evaluó el efecto del extracto de *Cenchrus echinatus* L., administrado por vía oral durante 16 semanas. Los instrumentos estuvieron conformados por fichas de recolección de donde se registraron las masas corporales, número de muertes (DL50); masas corporales, masa de órganos blandos, bioquímica sanguínea (seguridad a dosis repetida), tipos y cantidad de metabolitos secundario (screening fitoquímico); número, tamaño y ubicación de los tumores mamarios, bioquímica sanguínea (Efecto protector del extracto frente al cáncer de mama).

Procedimientos

Recolección de la planta: La muestra vegetal, plantas completas de *Cenchrus echinatus* L. fueron recolectadas en el caserío de San José, distrito de Santiago de Cao, Provincia de Ascope. Departamento de la Libertad.

Identificación taxonómica: La muestra vegetal fue clasificada según el sistema de Cronquist del año 1988 en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Constancia N° 140-USM-2010).

Obtención del extracto etanólico: Las muestras fueron seleccionadas, lavadas y deshidratadas a 40°C en un horno con aire circulante, luego se pulverizaron en

un molino de mano y se maceró con etanol de 96° a temperatura ambiente durante siete días; posteriormente se filtró y se eliminó el solvente en una estufa a 40°C, hasta obtener un peso constante. El residuo obtenido, se denominó extracto etanólico, el cual se conservó en frasco de color ámbar a 4°C⁽³⁰⁾.

Estudio fitoquímico: Se preparó una batería de tubos conteniendo un mL de una solución alcohólica de extracto de *Cenchrus echinatus* L. a los que se les practicaron las reacciones de Gelatina, tricloruro férrico, Dragendorff, Molisch, NaOH 10%, Vainillin sulfúrico, Liebermann, Shinoda y Ninhidrina, con el fin de determinar la presencia y cantidad de metabolitos secundarios⁽³¹⁾.

Determinación de la dosis letal 50 (DL50): Se formaron 14 grupos aleatorios de seis ratones cada grupo, los que los tratamientos fueron administrados por vía oral y por única vez, el primer grupo recibió solución suero fisiológico cinco mL/kg (SSF), y los demás grupos extracto etanólico de cadillo en dosis de 10, 100, 500, 1 000, 5 000, 7 500, 10 000, 12 500, 15 000, 17 500, 18 750, 19 375 y 20 000 mg/kg de peso corporal respectivamente. Los ratones fueron observados durante las primeras 24 horas y posteriormente de manera diaria dentro de un periodo de 14 días, anotándose la sintomatología tóxica, peso y número de muertes, la DL50 fue calculada haciendo uso del método estadístico de los Probits⁽²⁴⁻³²⁾.

Determinación de la toxicidad oral a 45 días: Se realizó teniendo en cuenta el ensayo 407 de la OECD-1995, se utilizó 20 ratas cepa Holtzman (diez de ambos sexos), se formaron cuatro grupos de cinco ratas, las que recibieron SSF 5 mL/Kg y extracto etanólico de cadillo 100 mg/kg por vía oral, durante los 45 días, se llevó un control semanal de los pesos de las ratas, finalmente se anestesiaron con pentobarbital sódico 30 mg/Kg por vía intraperitoneal (V.I) y se les extrajo una muestra de 5 mL de sangre por punción cardiaca, la que sirvió para determinar la sanguínea, luego las ratas fueron eutanizadas con 100 mg/kg de pentobarbital sódico V.I. y se les practicó una laparatomía para extraerles los órganos blandos y su evaluación macroscópica.

Diseño experimental para la determinación del efecto protector del extracto: Se utilizaron 50 ratas

albinas hembras distribuidas de manera aleatoria en cinco grupos de diez ratas cada grupo: El 1° grupo recibió SSF 5 mL/Kg, 2° grupo DMBA 20 mg/rata⁽³³⁾, los grupos 3°, 4° y 5° recibieron DMBA, además del extracto a dosis de diez, 100 y 200 mg/Kg respectivamente, todos los tratamientos fueron administrados por vía oral (V.O) haciendo uso de una cánula metálica.

Inducción de las masas tumorales: Se utilizó DMBA, el que se administró al inicio de la experimentación, por V.O en dosis única de 20 mg/rata⁽³³⁾, utilizándose como vehículo un mL de aceite de oliva, se llevó el control semanal del peso de las ratas, así como, el número, tamaño y ubicación de las masas tumorales, durante cuatro meses, las mismas que fueron comparadas numéricamente y porcentualmente con el grupo control que recibió DMBA 20mg/Kg, utilizando la siguiente fórmula: % inhibición de masas tumorales = $((C-T)/C) * 100$, donde C=control, T=tratamiento.

El análisis anatomopatológico: La semana 16, las ratas fueron eutanizadas con una sobredosis de pentobarbital sódico (100 mg/Kg) administrado V.I. y se les extrajo las masas tumorales de mamas macro y microscópicamente, las que se conservaron en formol al 10% y efectuar el estudio anatomopatológico de las masas tumorales.

Análisis estadístico:

Se utilizó el programa estadístico SPSS versión 17, que nos permitió determinar estadígrafos, evaluar diferencias y homogeneidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov) entre grupos. La comparación de las medias se realizó con ayuda de la prueba t de Student, Chi-cuadrado, análisis de varianza, entre otras. Para los diferentes análisis se consideró la $p < 0,05$. Los valores promedios del peso corporal a dosis repetidas se comparan por un método no paramétrico, la prueba de la U de Mann-Whitney.

Aspectos éticos

Los estudios se realizaron cumpliendo las normas internacionales, en relación a la manipulación de animales de laboratorio. Todo el procedimiento fue concebido como se estipula en el ensayo 407 de las Directrices de la OCDE⁽³⁴⁻³⁹⁾.

RESULTADOS

En la Tabla 1, se puede apreciar que el extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* contiene taninos, compuestos fenólicos, alcaloides, flavonoides y aminoácidos libres en abundante cantidad, quinonas y glicósidos en regular cantidad, no identificándose la presencia de esteroides triterpénicos.

Tabla 1. Estudio fitoquímico del extracto de *Cenchrus echinatus* L.

Reacción de Identificación	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	+++

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

En la Figura 1, se observa el número de muertes de ratones debido a la administración oral de concentraciones crecientes de extracto etanólico de

Cenchrus echinatus L. desde los 10 mg/Kg hasta los 20 000 mg/Kg de peso, siendo la DL50 (dosis que causa la muerte del 50% de los especímenes) de 16 223 mg/Kg.

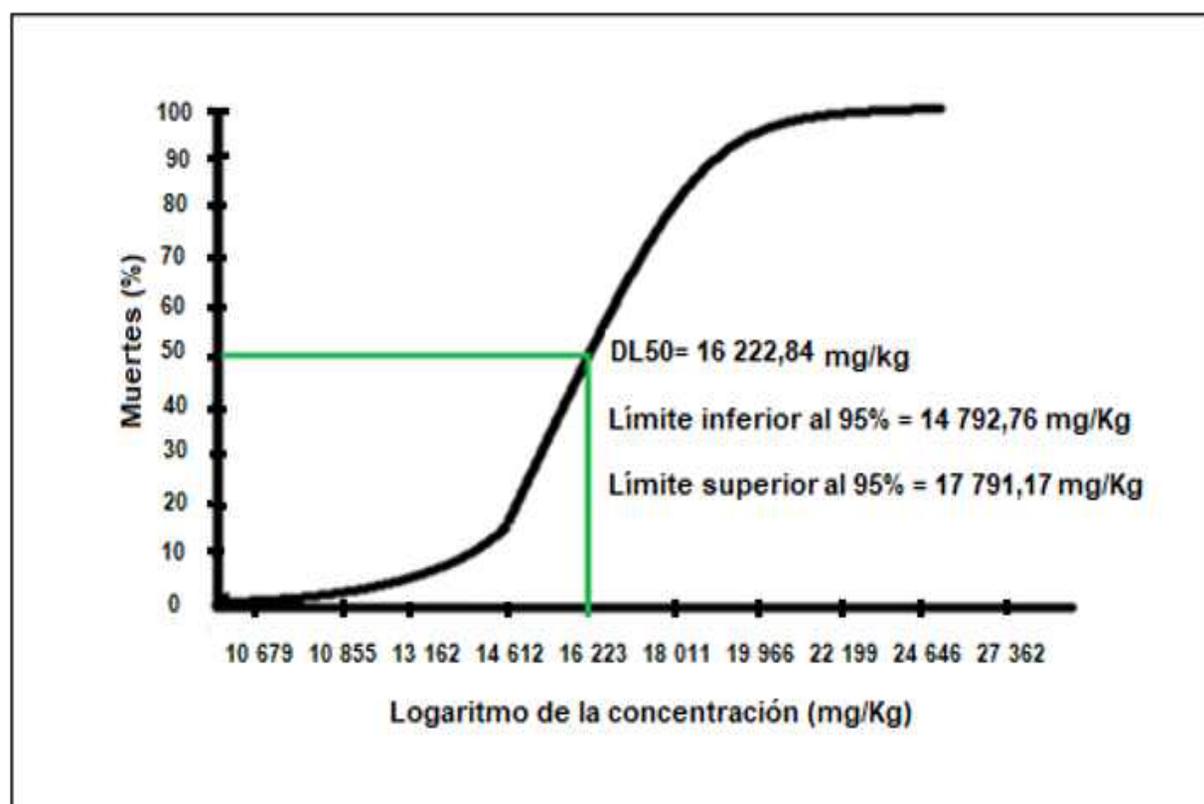


Figura 1. Seguridad oral a dosis única DL50, del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L.

En la Tabla 2, a. Se muestran los valores de bioquímica sanguínea evaluados durante la evaluación de la seguridad oral a 45 días del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L., representados por: Colesterol total, Lipoproteína de alta densidad (HDL), triglicérido, glucosa, urea, Transaminasa Glutámico Pirúvica (TGP), fosfatasa alcalina. También en b. Se evidencia los valores de numeración y fórmula leucocitaria representado por la cantidad de: Abastoados, segmentados, eosinófilos,

basófilos, monocitos, linfocitos y leucocitos. Así mismo en c. Muestra los pesos de los órganos blandos de las ratas como el estómago, bazo, riñón, hígado, pulmón, corazón y cerebro. Todos los parámetros se muestran considerando el valor medido con su respectivo error estándar, los grupos de tratamientos estuvieron conformados por ratas machos (M) y hembras (H), los que recibieron SSF 5 mL/Kg y 100 mg/kg de extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L respectivamente.

Tabla 2. Seguridad oral a dosis repetida del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L. en ratas
2a. Parámetros de bioquímica sanguínea. **2b.** Numeración y fórmula leucocitaria.
2c. Pesos de órganos blandos de ratas.

2a.														
TTO	Colesterol total (mg/dL). p<0,701		HDL (mg/dL). p<0,655		Triglicéridos (mg/dL). p<0,782		Glucosa (mg/dL). p<0,860		Urea (mg/dL) p<0,809		TGP (U/L) p<0,415		Fosfatasa alcalina (U/L) p<0,743	
	VM	EE	VM	EE	VM	EE	VM	EE	VM	EE	VM	EE	VM	EE
SSF (M)	156,8 ± 9,5		43,2 ± 2,1		150,0 ± 7,2		88,9 ± 3,3		16,2 ± 2,2		24,0 ± 5,8		150,0 ± 16,6	
Ext (M)	165 ± 12,6		43,8 ± 2,7		156,8 ± 9,4		89,5 ± 4,0		17,2 ± 2,2		29,8 ± 7,2		127,6 ± 15,8	
SSF (H)	166,6 ± 5,0		41,2 ± 1,1		159,3 ± 4,1		92,6 ± 4,2		19,8 ± 2,9		26,8 ± 4,4		136,4 ± 16,4	
Ext (H)	173 ± 9,8		40,4 ± 2,5		152,4 ± 4,6		89,4 ± 5,0		17,8 ± 2,2		23,4 ± 2,7		138,6 ± 4,3	

2b.														
TTO	Abastondados (%) p<0,407		Segmentados (%) p<0,665		Eosinófilos (%) p<0,225		Basófilos (%) p<0,418		Monocitos (%) p<0,366		Linfocitos (%) p<0,857		Leucocitos (U/mm ³) p<0,473	
	VM	EE	VM	EE	VM	EE	VM	EE	VM	EE	VM	EE	VM	EE
SSF (M)	1,4 ± 0,4		59,2 ± 2,0		0,6 ± 0,4		0,0 ± 0,0		1,6 ± 0,4		37,2 ± 1,6		8 434,0 ± 549,3	
Ext (M)	2,4 ± 1,0		57,4 ± 1,9		2,4 ± 0,9		0,0 ± 0,0		0,6 ± 0,2		37,2 ± 3,4		7 924,0 ± 751,8	
SSF (H)	0,6 ± 0,4		61,0 ± 2,5		2,0 ± 1,0		0,0 ± 0,0		1 ± 0,3		35,4 ± 3,0		8 060,0 ± 951,1	
Ext (H)	1,8 ± 0,9		62,0 ± 2,3		0,6 ± 0,2		0,2 ± 0,2		0,8 ± 0,2		34,6 ± 1,9		8 308,0 ± 885,9	

2c.														
TTO	Estómago p<0,456		Bazo p<0,024		Riñón p<0,000		Hígado p<0,001		Pulmón p<0,120		Corazón p<0,019		Cerebro p<0,000	
	VM	EE	VM	EE	VM	EE	VM	EE	VM	EE	VM	EE	VM	EE
SSF (M)	4,9 ± 0,8		1,6 ± 0,2		1,2 ± 0,2		10,0 ± 0,4		1,9 ± 0,3		1,0 ± 0,1		1,5 ± 0,0	
Ext (M)	4,2 ± 0,4		1,0 ± 0,1		0,9 ± 0,1		10,5 ± 0,7		1,8 ± 0,2		1,1 ± 0,1		1,6 ± 0,0	
SSF (H)	3,9 ± 0,7		0,9 ± 0,1		1,1 ± 0,0		9,7 ± 0,2		1,5 ± 0,2		0,7 ± 0,1		1,5 ± 0,0	
Ext (H)	4,8 ± 0,5		0,8 ± 0,1		1,1 ± 0,1		10,3 ± 0,5		1,6 ± 0,2		0,9 ± 0,1		1,7 ± 0,0	

Dónde: TTO= tratamiento, SSF=SSF 5 mL/kg, Ext= Extracto 100 mg/kg, (M)= rata macho, (H)= rata hembra, VM= valor medio, EE= error estándar.

En la Tabla 3, Se muestran los parámetros considerados al evaluar el efecto protector del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L. a la semana 16 de experimentación, como son: **3a.** bioquímica sanguínea representados por: Colesterol total, Lipoproteína de alta densidad (HDL), triglicérido, glucosa, urea, Transaminasa Glutámico Pirúvica (TGP), fosfatasa

alcalina. También en **3b.** Se evidencia los valores de numeración y fórmula leucocitaria representado por: Abastondados, segmentados, eosinófilos, basófilos, monocitos, linfocitos y leucocitos. Todos los parámetros se muestran considerando el valor medido con su respectivo error estándar, los grupos tratamientos estuvieron conformados por ratas hembras.

Tabla 3. Evaluación del efecto protector del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L. en ratas **3a.** Parámetros de bioquímica sanguínea. **3b.** Numeración y fórmula leucocitaria.

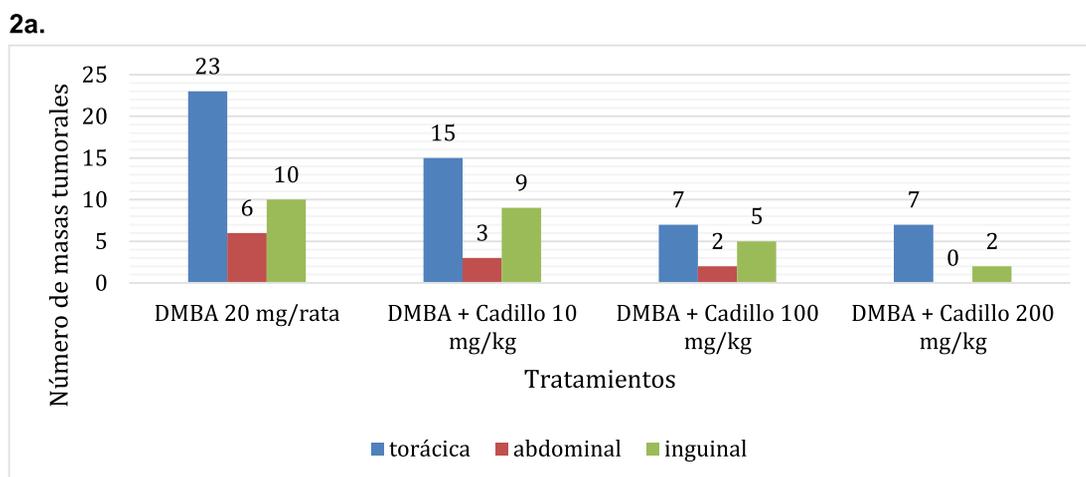
3a.															
TTO	Colesterol total (mg/dL) p<0,786		HDL (mg/dL). p<0,910		Triglicéridos (mg/dL). p<0,571		Glucosa (mg/dL). p<0,205		Urea (mg/dL) p<0,809		TGP (U/L) p<0,000		Fosfatasa alcalina (UI/L) p<0,024		
	VM	EE	VM	EE	VM	EE	VM	EE	VM	EE	VM	EE	VM	EE	
SSF	158,3	±10,1	50,0	±5,5	118,8	±10,6	84,8	±2,2	14,0	±1,5	12,8	±0,9	105,5	±9,8	
TX	171,4	±5,9	49,8	±2,6	141,0	±10,2	93,6	±2,5	18,5	±1,6	27,0	±2,8	139,4	±11,4	
TX-E10	164,0	±10,5	54,2	±3,2	134,0	±10,8	85,8	±5,0	14,2	±1,2	17,2	±2,4	136,4	±4,2	
TX-E100	162,7	±7,2	50,1	±3,6	137,4	±8,0	86,1	±3,2	16,2	±0,5	13,8	±1,3	118,6	±6,2	
TX-E200	160,1	±8,4	52,4	±3,0	133,4	±6,2	84,3	±3,5	14,8	±1,3	14,1	±1,7	108,4	±5,2	

3b.															
TTO	Abastones (%) p<0,408		Segmentados (%) p<0,502		Eosinófilos (%) p<0,469		Basófilos (%) p<0,705		Monocitos (%) p<0,284		Linfocitos (%) p<0,742		Leucocitos (U/mm ³) p<0,171		
	VM	EE	VM	EE	VM	EE	VM	EE	VM	EE	VM	EE	VM	EE	
SSF	0,7	±0,3	63,8	±3,9	1,3	±0,5	0,0	±0,0	0,3	±0,3	33,1	±4,0	5 293	±251	
TX	1,6	±0,5	62,7	±2,5	2,3	±0,9	0,0	±0,0	1,8	±0,6	33,2	±3,1	7 470	±764	
TX-E10	1,2	±0,6	56,2	±3,9	2,2	±0,8	0,0	±0,0	0,6	±0,2	38,6	±3,2	6 982	±822	
TX-E100	0,7	±0,3	62,6	±3,1	1,3	±0,8	0,1	±0,1	1,2	±0,4	34,9	±3,3	6 822	±468	
TX-E200	1,2	±0,3	59,3	±1,9	0,7	±0,3	0,1	±0,1	1,2	±0,4	37,1	±1,8	6 269	±452	

Dónde: TTO= tratamiento, SSF= SSF 5 mL/Kg, TX=DMBA 20 mg/rata, TX-E10=DMBA 20 mg/rata + Extracto 10 mg/Kg, TX-E100=DMBA 20 mg/rata +Extracto 100 mg/Kg, TX-E200=DMBA 20 mg/rata + Extracto 200 mg/Kg, VM= valor medido, EE= Error estándar.

En la figura 2, 2a. se aprecia una mayor cantidad de formación de masas tumorales en el grupo DMBA 20 mg/rata (39 unidades), distribuidas 23 a nivel torácico, seis a nivel abdominal y diez a nivel inguinal, así también una menor formación de masas tumorales en el grupo que recibió DMBA + Cadillo 200 mg/Kg con un

total de nueve masas tumorales distribuidas siete a nivel torácico y dos a nivel inguinal. También se observa en 2b. En relación al grupo que recibió el DMBA 20 mg/rata (39 masas tumorales) y el grupo DMBA + cadillo 200 mg/kg (nueve masas tumorales) existe un 76,92% de inhibición porcentual de masas tumorales.



2b.

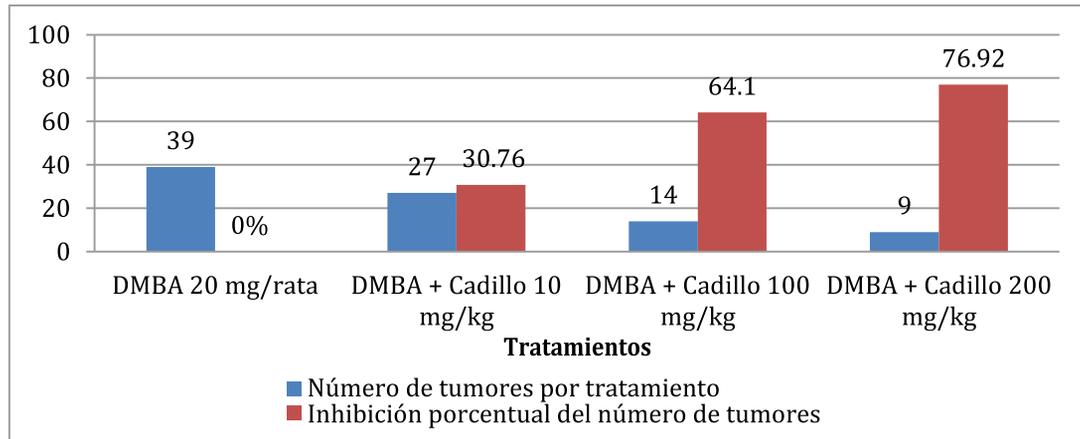


Figura 2. Evaluación del efecto protector del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L. **a.** Número y ubicación de masas tumorales. **b.** Número de tumores por tratamiento e inhibición porcentual de masas tumorales.

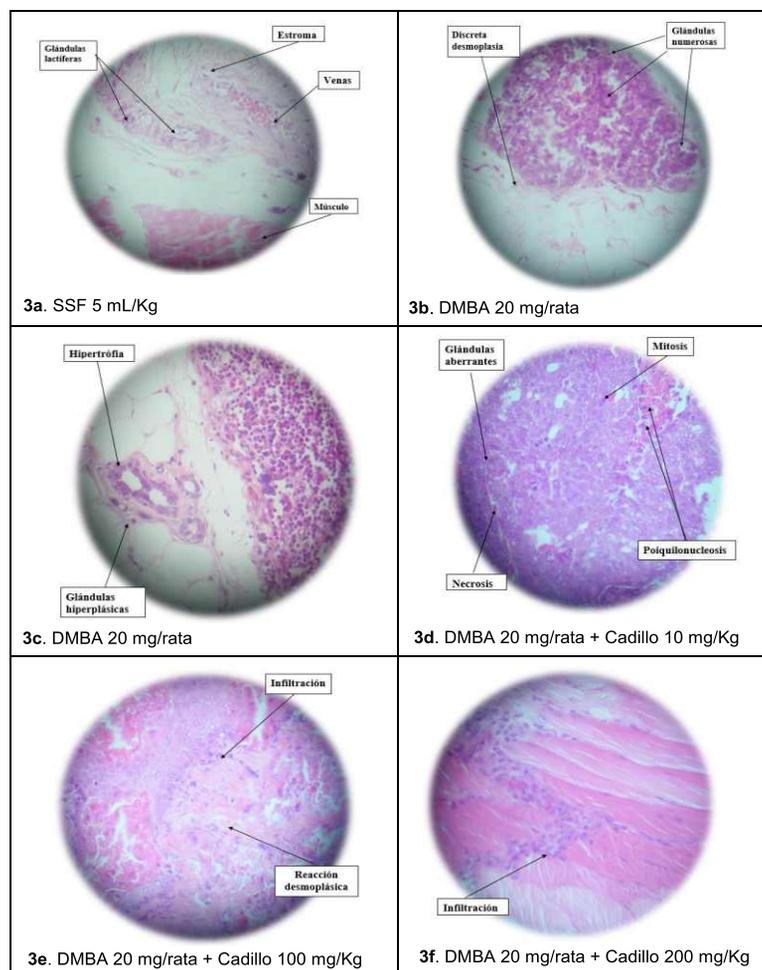


Figura 3. Estudio anatomopatológico de las masas tumorales al evaluar el efecto protector del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L. sobre el cáncer de mama inducido por DMBA en ratas (objetivo 400X).

En la figura 3. Se observan el estudio anatomopatológico de las masas tumorales: 3a. Glándula mamaria normal; 3b y 3c. Zonas hiperplásicas y adenocarcinoma mamario. 3d. Adenocarcinoma

mamario con metástasis. 3e. Glándula mamaria con infiltración inflamatoria. 3f. Glándula mamaria con nódulo linfático más infiltración de células mononucleares en zona muscular.

DISCUSIÓN

Cenchrus echinatus L. es una planta anual, originaria de América, de la familia Poaceae, de naturaleza cespitosas con tallos erectos o decumbentes, ramificados y glabros de 15–85 cm de alto, se pueden encontrar en playas, sitios perturbados, trópicos y subtropicos; a una altitud de cero a 760 metros⁽⁴⁰⁾.

El estudio fitoquímico del extracto evidenció la presencia de abundante cantidad de flavonoides, que además de presentar baja toxicidad se considera un producto vegetal de uso seguro, con actividad protectora sobre el cáncer de mama, así como propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, entre otras⁽⁴¹⁾.

Al evaluar la toxicidad oral del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L., se observó, una dosis letal mediana (DL50) de 16 223 mg/kg, además de un aumento sostenido de pesos de los ratones desde 27 – 33 g durante 14 días, no llegándose evidenciar signos de toxicidad o muerte de los ratones a dosis por encima de los 5000 mg/kg por vía oral, consideradas prácticamente no tóxicas⁽⁴²⁾. Además, según las normas de la Comunidad Europea (2000) clasifica la toxicidad aguda oral, como no tóxico cuando se supera la dosis de 2000 mg/kg. Pudiendo este compararse con la Directriz 407 de la OCDE donde en un estudio se eligieron dos inmunosupresores muy conocidos, azatioprina (AZA) y ciclosporina A (CysA), como compuestos modelo en un rango de dosis que no causa signos tóxicos visibles en los animales durante un período de tratamiento de 28 días⁽⁴³⁾.

En la evaluación de la seguridad oral a 45 días se encontró que el extracto de *Cenchrus echinatus* L. no interfirió en el desarrollo de las ratas albinas ya que los pesos corporales de los especímenes incrementaron de manera gradual en todos los grupos desde los 78-170 g; los valores bioquímica sanguínea (Colesterol total, HDL, glucosa, urea, TGP, fosfatasa alcalina, abastionados, segmentados, eosinófilos, basófilos, monocitos, linfocitos y leucocitos) y el estudio macroscópico de los órganos blandos (Estómago, bazo, riñón, hígado, pulmón, corazón y cerebro) no mostraron alteraciones importantes, las variaciones encontradas están dentro del rango establecido en el CENPALAB, 2010 para esta especie⁽⁴⁴⁻⁴⁵⁾.

El DMBA es un hidrocarburo policíclico aromático, altamente lipofílico, el que, para causar la carcinogenicidad de mama requiere de su bioactivación e interacción con el ADN, convirtiéndose en epóxidos y generando mayor formación de radicales libres, donde los lóbulos uno y dos de la glándula mamaria presentan el índice proliferativo celular más alto y por tanto tienen más actividad metabólica, lo cual queda confirmado con nuestros resultados ya que observamos una mayor proliferación de masas tumorales en el grupo que recibe sólo DMBA (4 tumores por rata), ubicándose la mayor proliferación a nivel torácico.

Por otro lado, se conoce que los estrógenos son responsables de la iniciación y promoción del cáncer de mama; así, la inhibición de la síntesis de estrógenos por luteína (cuatro-tetrahidrochalcona) puede ser efectiva en la prevención del cáncer de mama, al inhibir fuertemente la aromatasa. Añadiendo que posiblemente, algunas sustancias presentes en el extracto de *Cenchrus echinatus* L., hayan favorecido los hallazgos obtenidos en el presente estudio.

Nuestro hallazgo principal fue la eficacia protectora del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L., al evidenciarse una disminución de la aparición de masas tumorales desde 39 unidades con DMBA hasta nueve unidades con *Cenchrus echinatus* L 200 mg/Kg. Siendo comparado con un estudio realizado a 32 ratas Sprague Dawley hembras de 21 días de edad, a las cuales se les administró por vía intraperitoneal N-metil-N-nitroso urea (NMU), obtuvieron que el tratamiento con sirolimus disminuyó las expresiones de ER y PgR del cáncer de mama y a su vez redujo el tamaño de las masas tumorales⁽⁴⁶⁾.

En un estudio donde se empleó NMU como inductor de cáncer mamario y sirolimus como tratamiento, la histología de las masas tumorales no presentaron subtipos histológicos de carcinoma invasivo agresivo de ningún tipo especial (NST)⁽⁴⁶⁾, mientras que en nuestro estudio se evidenció una proliferación epitelial y mioepitelial de las células en la mayoría de los tumores mamarios, mostraron una eficacia anticancerígena del extracto de 30.76%, 64.10% y 76.92% a dosis de 10, 100 y 200 mg/Kg de extracto de cadillo respectivamente, cuyo efecto protector se atribuye a la presencia de los

flavonoides que inducen apoptosis al activar la caspasa ocho y Bax, inhibiendo la expresión del Bcl-2 y permitiendo la liberación de citocromo C⁽⁴⁷⁾.

Por tanto, siendo el cáncer de mama un gran problema de salud a nivel mundial, con mayor frecuencia en la mujer, se hace necesaria la búsqueda de nuevos productos seguros y eficaces para afrontar esta enfermedad⁽²⁹⁾.

Los resultados de este trabajo de investigación presentaron sus limitaciones en cuanto a la observación del comportamiento de los animales de experimentación durante la evaluación de la seguridad oral del extracto, así mismo realizar estudios de seguridad a largo plazo como la toxicidad crónica, con la administración de tratamientos por otras vías de administración y la incorporación de parámetros como las especies reactivas de oxígeno en sangre, así como la

actividad antioxidante y antiangiogénico del extracto podrían apoyar el presente estudio.

CONCLUSIÓN

Se logró obtener el extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L, el cual al contar con metabolitos secundarios importantes como los flavonoides, compuestos fenólicos y taninos en mayor cantidad se considera como producto vegetal de uso seguro y además tendría implicancias sobre el cáncer de mama.

En condiciones experimentales se ha demostrado que el extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L. administrado por vía oral durante 16 semanas es protector del cáncer de mama inducido por siete, 12-Dimetilbenzo[a]antraceno en ratas hembras, al evidenciarse una disminución del número y tamaño de las masas tumorales, así como una mayor protección del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L. a dosis de 200 mg/Kg.

Contribuciones de autoría: César Braulio Cisneros Hilario: Concepción y diseño del artículo, análisis e interpretación de datos, redacción del artículo, revisión crítica del artículo, aprobación de la versión final. Jorge Luis Arroyo Acevedo: Diseño del artículo, análisis e interpretación de datos; revisión crítica del artículo, aprobación de la versión final. María Paula Bedoya Castillo: Recolección de resultados, redacción del artículo, revisión crítica del artículo. Betsy Alexandra Lázaro Huamán: Recolección de resultados, redacción del artículo, revisión crítica del artículo. Katia Elizabeth Mendoza Chávez: Recolección de resultados, Redacción del artículo. Evelin Juline Cisneros Hilario: Recolección de resultados, redacción del artículo.

Financiamiento: Autofinanciado.

Correspondencia: César Braulio Cisneros Hilario

Dirección: Urb. Los Girasoles De La Molina Mz. G Lote 24 La Molina, Lima, Perú.

Teléfono: 993976156

Email: cbraulio.cisnerosh@gmail.com

Conflicto de interés: Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Recibido: 28 de abril, 2022

Aprobado: 07 de junio, 2022

REFERENCIAS

1. Cao W, Chen H-D, Yu Y-W, Li N, Chen W-Q. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020. *Chin Med J (Engl)* 2021;134(07):783–91. DOI: [10.1097/CM9.0000000000001474](https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000001474)
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68(6):394–424. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
3. Zhang S, Sun K, Zheng R, Zeng H, Wang S, Chen R, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2015. *J Natl Cancer Cent* 2021;1(1):2–11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jncc.2020.12.001>
4. Estadísticas mundiales del cáncer 2020: estimaciones de GLOBOCAN de incidencia y mortalidad en todo el mundo para 36 cánceres en 185 países - Sung - 2021 - CA: A Cancer Journal for Clinicians - Wiley Online Library [Internet]. [citado 2022 abr 10]; Disponible en: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21660>
5. Brustugun OT, Møller B, Helland Å. Years of life lost as a measure of cancer burden on a national level. *Br J Cancer* 2014;111(5):1014–20. DOI: [10.1038/bjc.2014.364](https://doi.org/10.1038/bjc.2014.364)
6. Pérez Carrasco MC. Expresión de las proteínas bax y bcl2 en células de cáncer de mama in vitro tratadas con amaranthus hipochondriacus. 2020 [citado 2022 abr 10]; Disponible en: <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/31536>
7. Mubarik S, Yu Y, Wang F, Malik SS, Liu X, Fawad M, et al. Epidemiological and sociodemographic transitions of female breast cancer incidence, death, case fatality and DALYs in 21 world regions and globally, from 1990 to 2017: An Age-Period-Cohort Analysis. *J Adv Res* 2022;37:185–96. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.07.012>
8. Cáncer de mama [Internet]. [citado 2022 abr 10]; Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
9. Oliveira MEC de, Oliveira TA de, Santos TT de M, Andrade LS dos S, Weller M. Atraso na primeira consulta após percepção dos sinais/sintomas de câncer de mama. *Rev Fam Ciclos Vida E Saúde No Contexto Soc* 2020;8(4):819–26. DOI: <https://doi.org/10.18554/refacs.v8i4.4255>
10. Weller M, Oliveira ME, Santos TT, Andrade LS, Gomes KA, et al. Larga distancia de viaje para la atención médica y mala adherencia a los programas de detección de cáncer de mama como predictores de retraso del paciente [Internet]. 2019; 2(1): 1008. Disponible en: <https://meddocsonline.org/annals-of-epidemiology-and-public-health/Long-travel-distance-for-health-care-and-poor-adherence-to-breast-cancer-screening-programs-as-predictors-of-patient-delay.html>
11. Medeiros GC, Bergmann A, Aguiar SS de, Thuler LCS. Análise dos determinantes que influenciam o tempo para o início do tratamento de mulheres com câncer de mama no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública* [Internet]. 2015; 31(6):1269–82. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/csp/a/X5mMwNFwhCFKGVvchMTG3Xf/?lang=pt>



12. Mostacero-León J, Peláez-Peláez F, Alarcón-Rojas NM, Cruz-Castillo AJDL, Alva-Calderón R, Charcape-Ravelo M. Plantas utilizadas para el tratamiento del cáncer expandidas en los principales mercados de la provincia de Trujillo, Perú, 2016 – 2017. *Bol Latinoam Caribe Plantas Med Aromáticas* 2019;18(1):81–94. Disponible en: <https://blacpma.ms-editions.cl/index.php/blacpma/article/view/70>
13. Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 2003;23(1A):363–98. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12680238/#:~:tex t=ln%20several%20systems%2C%20curcumin%20has,been%20found%20to%20be%20safe>.
14. Cisneros CB, Córdova EC. Efecto protector del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L. (cadillo) sobre las lesiones gástricas inducidas por indometacina y etanol en ratones. Conocimiento para el desarrollo [Internet] 2011 [citado 2022 abr 10];2(1). Disponible en: <https://revista.usanpedro.edu.pe/index.php/CPD/article/view/233>
15. Cisneros CB, Acevedo JL, Carrillo KL. Efecto hipolipemiente del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L. “cadillo” en ratas. *undefined* [Internet] 2015 [citado 2022 abr 10]; Disponible en: <https://www.semanticscholar.org/paper/Efecto-hipolipemiente-del-extracto-etan%C3%B3lico-de-L.-Hilario-Acevedo/fa54f8c2251589dcca3b28f85b5d1c41fe18858>
16. Lambert JD, Yang CS. Cancer chemopreventive activity and bioavailability of tea and tea polyphenols. *Mutat Res* 2003;523–524:201–8. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(02\)00336-6](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(02)00336-6)
17. Suzuki Y, Miyoshi N, Isemura M. Health-promoting effects of green tea. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2012;88(3):88–101. DOI: <https://doi.org/10.2183/pjab.88.88>
18. Suganuma M, Sueoka E, Sueoka N, Okabe S, Fujiki H. Mechanisms of cancer prevention by tea polyphenols based on inhibition of TNF-alpha expression. *BioFactors Oxf Engl* 2000;13(1–4):67–72. DOI: <https://doi.org/10.1002/biof.5520130112>
19. Vitelli-Storelli F, Zamora-Ros R, Molina AJ, Fernández-Villa T, Castelló A, Barrio JP, et al. Association between Polyphenol Intake and Breast Cancer Risk by Menopausal and Hormone Receptor Status. *Nutrients* 2020;12(4):994. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu12040994>
20. Lee C-H, Chang Y-C, Chen C-S, Tu S-H, Wang Y-J, Chen L-C, et al. Crosstalk between nicotine and estrogen-induced estrogen receptor activation induces $\alpha 9$ -nicotinic acetylcholine receptor expression in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2011;129(2):331–45. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu12040994>
21. Barra A, Coroneo V, Dessi S, Cabras P, Angioni A. Characterization of the volatile constituents in the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from different origins and its antifungal and antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 2007;55(17):7093–8. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf071129w#>
22. Diener null, Schleder null. Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC50 Tests. *ALTEX* 1999;16(3):129–34. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11107319/>
23. Cisneros CB, Loyola IL, Miranda FA. Dosis letal media (dl50) del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L. “cadillo” en *Mus musculus albinus*. *undefined* [Internet] 2012 [citado 2022 abr 10]; Disponible en: [https://www.semanticscholar.org/paper/Dosis-letal-media-\(dl50\)-del-extracto-etan%C3%B3lico-de-Hilario-Lara/736a64e01ab648c6c856234df679b171d7e526c3](https://www.semanticscholar.org/paper/Dosis-letal-media-(dl50)-del-extracto-etan%C3%B3lico-de-Hilario-Lara/736a64e01ab648c6c856234df679b171d7e526c3)
24. Williams PL, Burson JL. Industrial toxicology: safety and health applications in the workplace / Phillip L. Williams and James L. Burson. New York: Lifetime Learning Publications; 1985.
25. Loomis TA. Fundamentos de Toxicología. Acribia, Editorial, S.A.; 1982.
26. Mitra AK, Faruque FS. Breast cancer incidence and exposure to environmental chemicals in 82 counties in Mississippi. *South Med J* 2004;97(3):259–63. DOI: [10.1097/01.SMJ.0000100115.62621.F1](https://doi.org/10.1097/01.SMJ.0000100115.62621.F1)
27. Reynolds P, Hurley SE, Goldberg DE, Yerabati S, Gunier RB, Hertz A, et al. Residential proximity to agricultural pesticide use and incidence of breast cancer in the California Teachers Study cohort. *Environ Res* 2004;96(2):206–18. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2004.03.001>
28. Schootman M, Sun D. Small-area incidence trends in breast cancer. *Epidemiol Camb Mass* 2004;15(3):300–7. DOI: [10.1097/01.ede.0000121605.41388.7c](https://doi.org/10.1097/01.ede.0000121605.41388.7c)
29. Costa EL. A New Approach for Cancer Treatment: from Specific Induction of Breast Cancer to Innovative Therapy [Internet]. 2021 [citado 2022 abr 10]; Disponible en: <https://studogeral.sib.uc.pt/handle/10316/95304>
30. CYTED. 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; [Internet] 1995. p.220. Disponible en: https://www.cytred.org/?q=es/detalle_proyecto&un=114
31. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales [Internet]. Dep. Académico Cienc. PUCP [citado 2022 abr 10]; Disponible en: https://departamento.pucp.edu.pe/ciencias/pub_dpto/investigacion-fitoquimica-metodos-en-el-estudio-de-productos-naturales/
32. Vega Montalvo R, Carrillo Domínguez C. Efecto sobre la motilidad intestinal y toxicidad aguda oral del extracto fluido de *Ocimum gratissimum* L. (Orégano cimarrón). *Rev Cuba Plantas Med* 1997;14–8. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1028-47961997000200004&lng=en&nrm=i&tng=es
33. Barros ACS, Muranaka ENK, Mori LJ, Pelizon CHT, Iriya K, Giocondo G, et al. Induction of experimental mammary carcinogenesis in rats with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *Rev Hosp Clin* 2004;59(5):257–61. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0041-87812004000500006>
34. OECD.org - OECD [Internet]. [citado 2022 abr 10]; Disponible en: <https://www.oecd.org/>
35. Commissioner O of the. U.S. Food and Drug Administration. Good Laboratory Practice for nonclinical laboratory studies, Code of Federal Regulations [Internet]. 1997. [citado 2022 abr 10]; Disponible en: <https://www.fda.gov/home>
36. Guide for the care and use of laboratory animals. National Research Council. (E. U. U.); 1996. p.21–79. Disponible en: <https://grants.nih.gov/grants/olaw/guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>
37. Guía para el cuidado, uso y reproducción de los animales de experimentación en el CENPALAB. La Habana: CENPALAB. [Internet] 2000 [citado 2022 abr 10]; Disponible en: <http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla>
38. Olfert, E., Brenda, M., McWilliam, A. Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación. Canada: Consejo Canadiense de Protección de los Animales. [Internet] 1998 [citado 2022 abr 10]; Disponible en: <https://www.ccac.ca/>
39. Manual de los Procedimientos Operacionales de Trabajo. CETEX, CENPALAB [Internet] 2000 [citado 2022 abr 10]; Disponible en: <http://revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/issue/archive>
40. Morillo Herrera KL. Efecto antiinflamatorio del extracto etanólico de *Cenchrus echinatus* L. (cadillo) sobre el granuloma inducido por carragenina en ratas. *Univ San Pedro* [Internet] 2018 [citado 2022 abr 10]; Disponible en: <http://repositorio.usanpedro.edu.pe/handle/USANPEDRO/5999>
41. Flavonoides: aplicaciones medicinales e industriales [Internet]. [citado 2022 abr 10]; Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/113738>
42. Costa-Silva JH, Lima CR, Silva EJR, Araújo AV, Fraga MCCA, Ribeiro E Ribeiro A, et al. Acute and subacute toxicity of the Carapa guianensis Aublet (Meliaceae) seed oil. *J Ethnopharmacol* 2008;116(3):495–500. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.12.016>
43. Instiőris L, Siroki O, Dési I, Lesznayk J, Serényi P, Szekeres E, et al. Extension of the protocol of OECD guideline 407 (28-day repeated dose oral toxicity test in the rat) to detect potential immunotoxicity of chemicals. *Hum Exp Toxicol* 1998;17(4):206–11. DOI: <https://doi.org/10.1177/096032719801700402>
44. Alemán CL, Más RM, Rodeiro I, Noa M, Hernández C, Menéndez R, et al. Reference database of the main physiological parameters in Sprague-Dawley rats from 6 to 32 months. *Lab Anim* 1998;32(4):457–66. DOI: <https://doi.org/10.1258/002367798780599802>
45. Wolford ST, Schroer RA, Gohs FX, Gallo PP, Brodeck M, Falk HB, et al. Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals. *J Toxicol Environ Health* 1986;18(2):161–88. DOI: <https://doi.org/10.1080/15287398609530859>
46. Jaffar NFN, Sakri MSM, Jaafar H, Abdul Rahman WFW, Din TADA-AT. Evaluation of NMU-Induced Breast Cancer Treated with Sirolimus and Sunitinib on Breast Cancer Growth. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP* 2020;21(10):2919–25. DOI: [10.31557/APJCP.2020.21.10.2919](https://doi.org/10.31557/APJCP.2020.21.10.2919)
47. Yang CS, Lambert JD, Sang S. Antioxidative and anti-carcinogenic activities of tea polyphenols. *Arch Toxicol* 2009;83(1):11. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00204-008-0372-0>

