



Universidad Nacional  
**Federico Villarreal**

Vicerrectorado de  
**INVESTIGACIÓN**

**Facultad de Medicina "Hipólito Unanue"**

**EFFECTO ANTITUMORAL DE LOS CURCUMINOIDES EN EL CARCINOMA  
HEPATOCELULAR INDUCIDO CON DIETILNITROSAMINA EN RATONES  
BALB/c, EN LA FACULTAD DE MEDICINA "HIPÓLITO UNANUE" DE LA  
UNIVERSIDAD NACIONAL FEDERICO VILLARREAL, LIMA – PERÚ, DE JULIO**

**A DICIEMBRE DE 2019**

Líneas de Investigación: Salud Pública

**Tesis para optar el Título Profesional de Médico Cirujano**

**AUTOR**

Saavedra Mejía, Luis Ángel Augusto

**ASESOR**

Dr. Jáuregui Francia, Filomeno

**JURADOS**

Dr. Huarachi Quintanilla, Luis Alberto

Dr. Aliaga Chávez, Max

Dr. Díaz Díaz, Luis Jesús

Lima – Perú

2020

## ÍNDICE

<b>Resumen.....</b>	<b>4</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>5</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>6</b>
1.1 Descripción y formulación del problema.....	7
1.2 Antecedentes.....	9
1.3 Objetivos.....	13
1.4 Justificación y uso de resultados.....	14
1.5 Hipótesis.....	14
<b>II. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>15</b>
2.1 Bases teóricas sobre el tema de investigación.....	15
<b>III. MÉTODO.....</b>	<b>18</b>
3.1 Tipo de investigación.....	18
3.2 Ámbito temporal y espacial.....	18
3.3 Variables.....	18
3.4 Población y muestra.....	18
3.5 Instrumentos.....	19
3.6 Procedimientos.....	20
3.7 Análisis de datos.....	22
3.8 Consideraciones éticas.....	23
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
<b>V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>33</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>34</b>
<b>VIII. REFERENCIAS.....</b>	<b>35</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Diagnósticos y desenlaces por grupo de estudio.....	26
<b>Tabla 2.</b> Regresión de Cox para la estimación de los factores de riesgos instantáneos.....	27
<b>Tabla 3.</b> Test de distribuciones iguales de curvas de supervivencia entre las muertes por efectos adversos (Log Rank).....	28

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de intervención propuesta.....	21
<b>Figura 2.</b> Características macroscópicas de los 5 grupos de ratones.....	24
<b>Figura 3.</b> Características microscópicas.....	25
<b>Figura 4.</b> Curvas de supervivencia (muertes por efectos adversos vs tiempo).....	28

## Resumen

**Objetivo:** Determinar el efecto antitumoral de los curcuminoides sobre el carcinoma hepatocelular inducido con dietilnitrosamina en ratones Balb/c. **Materiales y Métodos:** Estudio prospectivo longitudinal experimental, desarrollado en un laboratorio de investigación de la Facultad de Medicina "Hipólito Unanue", de la Universidad Nacional Federico Villarreal. Los datos fueron analizados mediante el programa SPSS v.23. Se usó la prueba de Chi Cuadrado para medir la asociación entre las variables, pruebas de dispersión de los datos, se midió el riesgo relativo, así como la prueba de Kruskal-Wallis. Se usó el método de Kaplan-Meier para medir la supervivencia y se efectuó modelos de regresión de Cox bivariados y multivariados para la estimación de "Hazard ratios" (HR). **Resultados:** Se halló que en los grupos CUR I y DEN los cambios macroscópicos e histopatológicos fueron mayores que en el resto de grupos. Los grupos CUR I y DEN se asociaron a mayor progresión de la disfunción hepática, respecto a los demás grupos ( $p < 0.05$ ). Conforme aumentaba la dosis de curcuminoides, disminuía el HR, pero los resultados no fueron estadísticamente significativos. A mayor dosis de curcuminoides se asociaron más efectos adversos y menor supervivencia. **Conclusiones:** Los curcuminoides presentaron mayor efecto antitumoral a mayor dosis (Grupos 2 y 3). A mayor dosis de curcuminoides se presentaron mayores efectos tóxicos (Grupo 3 respecto a los Grupos 1 y 2), lo cual repercutió en la menor supervivencia de los especímenes hacia el final del estudio.

**Palabras clave:** Carcinoma hepatocelular; Curcumina; Efecto antitumoral. (Fuente DeCS)

## Abstract

**Objective:** To determine the antitumor effect of curcuminoids on hepatocellular carcinoma induced with diethylnitrosamine in Balb / c mice. **Methods:** Experimental longitudinal prospective study, developed in a research laboratory of the "Hipólito Unanue" Medical School, of the Federico Villarreal National University. The data were analyzed using the SPSS v.23 program. The Chi Square test was used to measure the association between the variables, data dispersion tests, the Tukey test to test the null hypothesis, it was measured relative risk, as well as the Kruskal-Wallis test. The Kaplan-Meier method was used to measure survival and bivariate and multivariate Cox regression models were made for the estimation of hazards ratios (HR). **Results:** It was found that in the CUR I and DEN groups the macroscopic and histopathological changes were greater than in the other groups. The CUR I and DEN groups were associated with greater progression of liver dysfunction, compared to the other groups ( $p < 0.05$ ). As the dose of curcuminoids increased, the HR decreased, but the results were not statistically significant. Higher doses of curcuminoids were associated with more adverse effects and reduced survival. **Conclusions:** Curcuminoids had a greater antitumor effect at a higher dose (Groups 2 and 3). At a higher dose of curcuminoids there were greater toxic effects (Group 3 in comparison to Groups 1 and 2), which resulted in the lower survival of the specimens along the study.

**Key Words:** Carcinoma, Hepatocellular; Curcumin; Antitumor effect. (Source: MeSH)

## I. INTRODUCCIÓN

El siguiente trabajo de investigación pretende determinar el efecto antitumoral de los curcuminoides sobre el carcinoma hepatocelular inducido con dietilnitrosamina en ratones Balb/c, así como la dosis a la cual dicho efecto es mayor y la dosis en la cual se observan efectos tóxicos.

Capítulo I: Problema, el cáncer es considerado una de las principales causas de muerte en el mundo, siendo el carcinoma hepatocelular, la sexta más frecuente de su tipo. Se han ideado múltiples tratamientos, siendo los quimioterápicos los más usuales, aunque con efectos adversos evidenciados en diferentes estudios, por lo que se propone el uso de curcuminoides, los cuales han demostrado poseer efectos antitumorales. Ante ello se plantea lo siguiente: ¿A qué concentración de curcuminoides el efecto anticarcinogénico es más potente sobre el carcinoma hepatocelular inducido con dietilnitrosamina (DEN) en ratones BALB/c?

Capítulo II: Marco teórico, en este apartado se detalla las definiciones, epidemiología internacional y nacional, fisiopatología, así como tratamiento del carcinoma hepatocelular y definición, efectos y usos de los derivados de la curcumina.

Capítulo III: Método, se define el tipo y diseño general de estudio, el ámbito temporal y espacial, el universo de estudio, criterios de inclusión y exclusión, se describe la intervención propuesta, así como el modelo de análisis, correspondiente a los ratones Balb/c incluidos en la investigación.

Capítulo IV: Resultados, se detallan los resultados macroscópicos y microscópicos, así como del análisis descriptivo, del estudio de regresión de Cox y la gráfica de supervivencia.

Capítulo V: Discusión, se describen los resultados obtenidos en comparación con los antecedentes empleados para el trabajo de investigación.

## **1.1 Descripción y formulación del problema**

### ***1.1.1 Planteamiento del problema***

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2020), el cáncer es la segunda causa de muerte a nivel global, atribuyéndosele 9,6 millones de decesos en el 2018. Asimismo, la OMS (2018) reportó un total de 29240 muertes asociadas a cáncer, aproximadamente, en el Perú durante el 2016. El carcinoma hepatocelular (CHC) ha sido catalogado como la sexta neoplasia más frecuente, con más de 740 000 casos nuevos cada año (Armengol, Sarrias & Sala, 2017) y constituye la segunda causa de muerte por cáncer en el mundo (74.000 muertes, es decir, el 9,1% del total), después del cáncer de pulmón; en los países occidentales, el alcohol (72%), el síndrome metabólico (18%) y la hepatitis C (15%), las causas más frecuentes de CHC (Fron & Blanc, 2018). Esta situación se convierte aún más compleja al saber que el 80% del CHC se origina a partir de una condición de cirrosis previamente establecida (Chagoya de Sánchez et al, 2018). En el Perú, según el Ministerio de Salud (MINSA, 2013), el CHC corresponde al 2.7% de los casos de cáncer registrados en el periodo 2006-2011, y el segundo cáncer más letal con cerca del 11% de las defunciones por cáncer registradas en el 2011.

Aunque se ha determinado que la etiología de la mayoría de casos de CHC se asocia a la actividad inflamatoria crónica producida por los virus de la hepatitis B, C y Delta (HBV, HCV y HDV, respectivamente) (Di Bisceglie, 1998), y a pesar que se ha logrado el desarrollo de terapias dirigidas molecularmente (Lencioni, Marrero, Venook, Ye & Kudo, 2010) tratamientos quimioterápicos sistémicos como la basada en doxorubicina (Zhao et al.,2015), la mayoría solo poseen actividad antitumoral marginal, con un impacto menor sobre la supervivencia del paciente respecto a lo logrado en otros tipos de cáncer.

Según Zhao et al. (2015), los curcuminoides (CUR) son compuestos químicos que están presentes en la cúrcuma (*Curcuma longa*) siendo su principal componente la



curcumina, la cual presenta efectos antioxidantes, antiinflamatorios, antiangiogénicos y, principalmente, anticancerígenos. Evidencia reciente reporta, por primera vez, que la curcumina demostró ser no solo un potente inhibidor de las respuestas proinflamatorias, sino también un modulador válido de la producción de citocinas por activación de la microglía (Porro, Cianciulli, Trotta, Lofrumento, & Panaro, 2019). La curcumina comercial exhibe fuerte actividad anti-inflamatoria y antioxidante, y modula la expresión de factores de transcripción, proteínas del ciclo celular, y quinasas traductoras de señales; toda esta evidencia ha llevado al desarrollo de diversos estudios evaluando el potencial de los curcuminoides para la prevención y tratamiento del cáncer, así como de enfermedades inflamatorias (Gautam, Gao & Dulchavsky, 2007). La curcumina y sus análogos han demostrado poseer varias propiedades anticancerígenas en una serie de líneas celulares de cáncer, como pancreáticas, pulmonares, ováricas, orales, colorrectales, carcinoma de mama e incluso en células de melanoma (Vallianou, Evangelopoulos, Schizas & Kazazis, 2015). A la fecha, el potencial antitumoral de los curcuminoides en cuanto al carcinoma hepatocelular no está totalmente dilucidado, careciéndose de datos de dosis y toxicidad. Este proyecto está dirigido a aportar conocimientos respecto al potencial antitumoral de estos compuestos orgánicos sobre el hepatocarcinoma celular, evaluando dosis y toxicidad.

Por lo expuesto, se plantean los siguientes problemas:

### ***1.1.2 Formulación del problema***

#### **Problema General**

¿Cuál es el efecto antitumoral de los curcuminoides sobre el carcinoma hepatocelular inducido con dietilnitrosamina (DEN) en ratones BALB/c?

#### **Problemas específicos**

1. ¿Cuáles son los cambios macroscópicos que se observan tras la administración de curcuminoides en ratones Balb/c con carcinoma hepatocelular inducido con dietilnitrosamina?
2. ¿Cuáles son los cambios microscópicos que se observan tras la administración de curcuminoides en ratones Balb/c con carcinoma hepatocelular inducido con dietilnitrosamina?
3. ¿A qué dosis de curcuminoides se observan efectos antitumorales en ratones con carcinoma hepatocelular inducido?
4. ¿A qué dosis de curcuminoides se observan efectos tóxicos en ratones sanos y con carcinoma hepatocelular inducido?

## **1.2 Antecedentes**

Zhao et al. (2015), en un estudio titulado *Doxorubicin and curcumin co-delivery by lipid nanoparticles for enhanced treatment of diethylnitrosamine induced hepatocellular carcinoma in mice*, se tuvo por objetivo inducir CHC en ratones mediante la administración de DEN durante un período, después del cual se procedió a inyectar una solución compuesta nanopartículas lipídicas de doxorubicina + curcumina (DOX + CUR) vs solo doxorubicina para, posteriormente, examinar su eficacia en términos de crecimiento del tumor, marcadores de hepatotoxicidad y análisis histopatológicos. El método empleado fue un estudio experimental longitudinal prospectivo en el que se emplearon ratones de la cepa Balb/c y luego se procedió a un análisis de varianza en un sentido (ANOVA) para comparar la potencia Z, la tasa de liberación acumulada, viabilidad celular, el número y tamaño de los nódulos, razón hígado/cuerpo, niveles de aspartato amino transferasa (AST) y aspartato alanina transferasa (AST) y expresiones génicas. Los resultados demostraron que en aquellos ratones tratados con DOX + CUR hubo disminución del daño hepático, evidenciado mediante los niveles séricos de AST y ALT y el análisis anátomo-patológico. Asimismo, en

comparación al grupo tratado solo con DOX, los ratones tratados con DOX + CUR, a nivel molecular, se indujo un aumento de la caspasa-3 y de la razón Bax/Bcl-2 y disminución de C-myc, antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) y VEGF. De dicha forma, se demostró el efecto sinérgico de ambos compuestos en el desarrollo de apoptosis, sin embargo no fueron analizados de forma individual. Los autores concluyeron que la formulación de DOX + nanopartícula de CUR desarrolló excelentes características físicoquímicas, las cuales demostraron actividad antitumoral, modulación de apoptosis, proliferación angiogénesis, resistencia a drogas e hipoxia.

Por otro lado, Hu et al. (2015) desarrolló un estudio titulado *A polymeric nanoparticle formulation of curcumin in combination with sorafenib synergistically inhibits tumor growth and metastasis in an orthotopic model of human hepatocellular carcinoma*. El objetivo fue cultivar líneas celulares de CHC humano in vitro (placas Petri), así como en modelos in vivo (en ratones Balb/c), los cuales posteriormente fueron tratados con una formulación de nanopartículas de curcumina (NFC) vs sorafenib (terapia biológica aprobada para el tratamiento de CHC) vs una combinación de ambos, con el fin de suprimir proliferación, migración o metástasis de dichas células cancerígenas, así como estudiar el mecanismo potencial subyacente. El método empleado consistió en el uso de líneas celulares de CHC, Huh7, las cuales fueron cultivadas in vitro y luego inyectadas de forma subcutánea en ratones cepa Balb/c para generar un nódulo y posteriormente ser implantado en sus hígados; el análisis estadístico consistió en el empleo de ANOVA y T-student para los datos continuos y prueba exacta de Fisher o Chi-cuadrado para los datos categóricos. Los resultados demostraron que el NFC no solo inhibió la proliferación e invasión de CHC in vitro, sino también suprimió de forma drástica el crecimiento del tumor primario y la metástasis pulmonar en los modelos in vivo. Además de ello, en combinación con sorafenib, el NFC indujo apoptosis y arresto del ciclo celular. A nivel técnico, la combinación de ambos

compuesto generó un efecto sinérgico, el cual reguló la expresión de la metalopeptidasa de matriz tipo 9 (MMP9) por medio de la vía de señalización NF- $\kappa$ B/p65, así como disminuyó significativamente la población de células de CHC con marcador positivo para CD-133, las cuales han sido identificadas como células iniciadoras de este tipo de neoplasia primaria. Los autores concluyeron que la combinación de NFC y sorafenib representan una estrategia prometedora para el tratamiento del CHC y que se requieren estudios posteriores.

Asimismo, Zhang et al. (2017), realizó un estudio original denominado *The dark side of “the force” – lipid nanoparticles enhance the oncogenesis of diethylnitrosamine and result in liver cancer in mice*. El objetivo fue establecer un método para producir CHC en modelos animales (ratones), por medio de nanopartículas lipídicas de dietilnitrosamina (nanoDEN) y demostrar que los nanotransportadores pueden generar toxicidad a menor dosis y frecuencia. El método utilizado consistió en la preparación de las nanopartículas de DEN por medio de una técnica de microfluidos de alta presión y luego fueron inoculadas en ratones Kunming; para el análisis estadístico se empleó la prueba ANOVA y Chi-cuadrado. Los resultados mostraron que el nanoDEN, además de inducir la sobreexpresión de múltiples factores pivote durante la oncogénesis (COX-2,  $\beta$ -catenina y PCNA), incrementó la apoptosis de células hepáticas en comparación a la DEN sola, siendo este efecto más eficiente en células normales que en células cancerígenas. Los autores concluyeron que el nanoDEN puede ser más efectivo y eficiente la inducción de CHC, estableciendo un mejor método para producir modelos animales de cáncer hepático.

Por otra parte, Pan et al. (2017) elaboró un trabajo de investigación titulado *Curcumin inhibits hepatocellular carcinoma growth by targeting VEGF expression*, tuvo como objetivo determinar los efectos antiangiogénicos de la curcumina en el CHC. El método consistió en tratar células H22HCC con diferentes concentraciones de curcumina in vitro y se usó un modelo animal para el análisis in vivo, en donde se pretendió analizar la expresión de niveles

de VEGF y proteínas de la vía de señalización fosfatidilinositol 3 kinasa y serina/treonina kinasa 1 (PI3K/AKT); el modelo estadístico empleó el estudio ANOVA seguido del test de Turkey. Los resultados demostraron que el tratamiento con curcumina inhibió la proliferación de células H22 y promovió su apoptosis de manera dosis-dependiente en el estudio in vitro, mientras que en el modelo in vivo demostró suprimir el crecimiento del tumor a dosis de 50-100mg/kg. Asimismo, se evidenció una disminución significativa en la expresión de VEGF y en la señalización de PI3K/AKT. El estudio concluyó que la curcumina inhibió el crecimiento de CHC tanto in vitro como in vivo a través del control de la expresión de VEGF, lo cual puede proveer información importante para el tratamiento de del CHC.

Wang, Wang & Bu (2018), publicó un estudio titulado *Curcumin inhibits the growth of liver cancer stem cells through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin signaling pathway*. El objetivo fue investigar los efectos de la curcumina en el crecimiento de células madre de CHC. Para ello, el método consistió establecer la proliferación y apoptosis de células madre de CHC mediante el ensayo colorimétrico MTT y citometría de flujo, y se empleó el análisis Western Blot para identificar cambios en la expresión de proteínas relacionadas a apoptosis; el análisis estadístico se basó en repetir 3 veces los experimentos planteados y se usó t-Student para estudiar las diferencias entre cada grupo. Los resultados demostraron que el tratamiento con curcumina inhibió el crecimiento de este tipo de células, indujo su apoptosis, así como reguló a expresión de proteínas asociadas a mecanismos de apoptosis y a liberación de citocromo c. Además de ello, el tratamiento con este compuesto evidenció inhibir la activación de la vía de señalización de la fosfatidilinositol 3 kinasa / proteína B kinasa / blanco de rapamicina mamífero (PI3K / AKT / mTOR). Los autores concluyeron que la curcumina inhibió el crecimiento de células madre de CHC a través de la vía de señalización mencionada y que

dicho compuesto puede ser un agente anticancerígeno efectivo en el tratamiento de esta neoplasia.

Por último, Teng et al. (2019), desarrolló un estudio denominado *Chemopreventive Effect of Phytosomal Curcumin on Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma in A Transgenic Mouse Model*. El objetivo fue evaluar el rol de un compuesto fitosomal de curcumina en un modelo de ratones transgénicos que expresaban dos oncoproteínas del virus de la hepatitis B (HBV) (proteína X de la hepatitis B y el mutante pre-S2) el cual se encuentra intrínsecamente relacionado con la patogénesis del CHC. Los resultados mostraron que el compuesto fitosomal, en comparación la curcumina no formulada, tuvo efectos significativamente mayores en la supresión de la formación de CHC, mejoría histopatológica, disminución de la acumulación lipídica y de infiltración leucocitaria, así como reducción del tamaño tumoral. Asimismo, el tratamiento con curcumina demostró mayor activación de del PPAR $\gamma$  antiinflamatorio, así como en la inhibición del pro inflamatorio NF-Kb y supresión de la activación oncogénica de mTOR.

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivo General**

➤ Determinar el efecto antitumoral de los curcuminoides sobre el carcinoma hepatocelular inducido con dietilnitrosamina en ratones Balb/c.

#### **1.3.2 Objetivos Específicos**

1. Determinar cuáles son los cambios macroscópicos que se observan tras la administración de curcuminoides en ratones Balb/c con carcinoma hepatocelular inducido con dietilnitrosamina.

2. Determinar cuáles son los cambios microscópicos que se observan tras la administración de curcuminoides en ratones Balb/c con carcinoma hepatocelular inducido con dietilnitrosamina.

3. Determinar las dosis de curcuminoides en la cual se observan efectos antitumorales en ratones con carcinoma hepatocelular inducido con dietilnitrosamina.
4. Determinar las dosis de curcuminoides en la cual se observan efectos tóxicos en ratones sanos y con carcinoma hepatocelular inducido.

#### **1.4 Justificación y uso de resultados**

Aunque son diversos los estudios que corroboran el efecto protector de la curcumina frente al CHC, aún no se ha identificado la concentración a la cual el efecto antitumoral es más potente, ni a qué dosis genera toxicidad, menos aún los cambios moleculares generados en las células tumorales sometidas al tratamiento.

Los pocos estudios existentes fueron realizados, en su mayoría en países asiáticos, no habiendo ninguno realizado en Latinoamérica y, específicamente, en Perú que reproduzca dichos hallazgos.

Por tanto, la importancia del trabajo radica en determinar, con valores aproximados, la concentración de curcuminoides más potente en el CHC inducido por dietilnitrosamina en ratones Balb/c, así como determinar a qué dosis se observan efectos tóxicos.

#### **1.5 Hipótesis**

##### ***1.5.1 Hipótesis Alterna (H1)***

Los curcuminoides comerciales poseen efecto antitumoral a dosis específicas sobre el carcinoma hepatocelular inducido en ratones.

##### ***1.5.2 Hipótesis Nula (H0)***

Los curcuminoides comerciales no poseen efecto antitumoral a dosis específicas sobre carcinoma hepatocelular inducido en ratones.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Bases teóricas sobre el tema de investigación

El carcinoma hepatocelular (CHC) es el tumor hepático primario maligno más frecuente, cuya incidencia está aumentando de forma generalizada en la mayor parte de los países occidentalizados, lo que hace que esta neoplasia sea actualmente un problema sanitario de primer orden (Armengol, Sarrias & Sala, 2017). Además, el CHC es el sexto tumor más frecuente con más de 740.000 casos nuevos cada año y constituye la segunda causa de muerte por cáncer en el mundo (74.000 muertes, es decir, el 9,1% del total) después del cáncer de pulmón (Fron & Blanc, 2018). Esta enfermedad afecta de manera casi exclusiva a pacientes con hepatopatía crónica que han desarrollado cirrosis, especialmente la relacionada con los virus de la hepatitis B y C, siendo en este grupo de pacientes el CHC la causa más frecuente de muerte (Matilla Peña, Chiva, Fernández-Simón & Romerao Cristobal, 2012).

Los primeros reportes de agentes capaces de inducir el desarrollo de tumores en animales se dan en 1908 en Copenhague y en Nueva York en 1911, en donde se demostró que existía un organismo ultrafiltrable en la leucosis de las aves y que podían inducir sarcomas en pollos sanos, después de la inoculación de filtrados libres de células que venían de sarcomas de animales infectados. Para el desarrollo de carcinoma hepatocelular, el agente causal resultó ser un retrovirus oncogénico, el virus de la hepatitis B (García, 2016).

De acuerdo con Forner, Reig & Bruix (2018), mundialmente la infección crónica por virus de hepatitis B (VHB) es un factor de riesgo para carcinoma hepatocelular. La mayoría de casos de CHC (80%) ocurren en África subsahariana y en el este asiático, donde los principales factores de riesgo son la infección crónica por VHB y la exposición a la aflatoxina B; en paciente con VHB la incidencia de CHC incrementa con la carga viral, duración de la infección y la severidad de la enfermedad hepática.



En el Perú, es evidente que en áreas hiperendémicas del VHB también prevalece el CHC, como se ha mostrado en los estudios realizados en Abancay entre 1956-1986 y Huanta entre 1960-1982, donde alrededor del 6% y 7% de todos los fallecimientos están asociados a enfermedades hepáticas relacionadas a esta infección como CHC, cirrosis hepática y hepatitis fulminante. De acuerdo con los datos de la región, las tasas de mortalidad por cáncer de hígado y hepatitis B aguda en la región Apurímac es de 2.85 y 0.82 por cada 100 000 habitantes/año entre 1995-2000. El CHC en Perú no es poco frecuente: Lima es la ciudad que tiene la incidencia más alta del continente americano  $4.78 \times 100,000$  (MINSA, 2013), además considerando que el factor de riesgo más importante para esta enfermedad es local en muchas regiones del país, es probable que la incidencia de esta neoplasia sea incluso mayor (Ramírez-Soto, Guevara-Cuadros & Huichi-Atamari, 2012).

El Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN), catalogado como el centro de referencia a nivel nacional del Ministerio de Salud, atiende cada año un promedio de 70 pacientes nuevos con este carcinoma. Todos los pacientes con CHC localizado admitidos al Departamento de Abdomen del INEN son tratados con resección hepática independientemente del tamaño del tumor siempre y cuando la función del futuro hígado remanente sea la adecuada y no haya hipertensión portal. Debido a que no hay un tratamiento efectivo se ha resecado inclusive en presencia de trombo vascular macroscópico o de metástasis linfática regional. Ocasionalmente se han realizado resecciones paliativas por ruptura de tumor, dolor o hipoglicemia severa (Ruiz et al., 2007).

Como ya se explica en nuestro país, las personas normalmente llegan a estadíos casi finales donde el hígado es resecado para evitar su diseminación. Actualmente el tratamiento para el hepatocarcinoma se puede dividir en 4 procedimientos curativos que incluyen la resección quirúrgica, en donde la cirrosis es el factor determinante al momento de valorar la resecabilidad del tumor, puesto que la reserva funcional hepática y la capacidad de

regeneración del parénquima remanente depende de la gravedad de la cirrosis; en general, sólo los pacientes con estadios iniciales toleran la resección hepática. El procedimiento hepático que se utiliza en pacientes en estadio medio, que significa pacientes con nódulo menor a 5cm y sin invasión vascular, es el trasplante hepático. El tratamiento percutáneo que consiste en la inyección intratumoral de etanol, es eficaz en estadios iniciales, pero disminuye su eficacia por la presencia de septos intratumorales y no hay evidencias de que el tratamiento consiga modificar la esperanza de vida con pacientes en estadios B y C. A medida que el tumor crece el aporte se arterializa por la arteria hepática entonces lo que se trata es de eliminar este mecanismo. La embolización arterial es el tratamiento más utilizado para los pacientes con CHC no tributario de tratamientos con intención radical. Actualmente, la doxorubicina es una de las drogas quimioterápicas más usadas para pacientes con carcinoma CHC (Wang et al., 2015); siendo eficaz en tumores multinodulares y asintomáticos sin invasión vascular ni enfermedad fuera del hígado. Sin embargo posee un alto grado de toxicidad multiorgánica, así como gran incidencia de recidivas (Forner et al., 2016).

En contraste a los distintos tipos de tratamiento descritos, una alternativa no farmacológica es el uso de curcuminoides, los cuales poseen una amplia gama de actividades farmacológicas, incluyendo propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, y anticancerígenas. Recientemente se ha encontrado que la propiedad anticancerígena de la curcumina está dada por la actividad antiangiogénica, la cual es la principal vía de diseminación del CHC. Uno de los propósitos del siguiente trabajo es contrastar este método con un fármaco quimioterápico de gran uso y medir el impacto del principio activo del rizoma *Curcuma longa* como medida no farmacológica (Chintana, 2008).

### **III. MÉTODO**

#### **3.1 Tipo de investigación**

##### **3.1.1 *Por la ocurrencia de los hechos***

Estudio prospectivo

##### **3.1.2 *Por el acopio de la información***

Estudio de corte longitudinal

##### **3.1.3 *Por el análisis y alcance de los resultados***

Estudio experimental (experimento puro).

#### **3.2 *Ámbito temporal y espacial***

El estudio se realizó en las instalaciones de la Facultad de Medicina “Hipólito Unanue” de la Universidad Nacional Federico Villarreal, en un laboratorio de investigación desde julio a diciembre del 2019.

#### **3.3 Variables**

El presente estudio contó con las variables grupos de estudio, diagnóstico (Dx), metástasis (M), tiempo de seguimiento, muerte por efectos adversos y muerte por cáncer. La variable grupo de estudio fue categorizada en grupo blanco, grupo DEN, grupo CUR I, grupo CUR II y grupo CUR III. La variable diagnóstico se categorizó en sano, congestión pasiva crónica, displasia leve, displasia moderada, displasia severa y carcinoma hepatocelular. La variable metástasis fue categorizada dicotómicamente en “sí” y “no” haciendo referencia a la presencia o ausencia de esta, y la variable tiempo de seguimiento fue medida como el número de días que cada ratón permaneció dentro del estudio. La variable muerte por efectos adversos, así como la variable muerte por cáncer se categorizo dicotómicamente en “muerte” y “censura”.

#### **3.4 Población y muestra**

El presente proyecto tuvo como población accesible a ratones cepa BALB/c del Instituto Nacional de Salud. De esta población se tomó una muestra de 50 ratones distribuidos en 5 grupos para el experimento propiamente dicho.

$$n = \frac{(Z_{1-\alpha_2} + Z_{1-\beta})^2 \times (S_1^2 + S_2^2)}{(x_1 - x_2)^2}$$

$$n = \frac{15,68 \times (1,1664 + 5,29)}{9,8596}$$

$$n = 10,2678$$

### 3.4.1 Criterios de Inclusión y Exclusión

#### **Inclusión**

- Ratones cepa Balb/c de fácil manejo.
- Que no requieran demasiados cuidados.
- Ratones que sean biomodelo en investigación para oncología.
- Especímenes machos.

#### **Exclusión**

- Aquellos especímenes (ratones) que son modelos para estudios oncológicos y a la vez para más de dos evaluaciones patológicas adicionales.
- Agentes biológicos de fácil manejo pero de muy bajo peso, < 25 gramos.
- Ratones de gran tamaño.

### 3.5 Instrumentos

Para la recolección de información de los grupos propuestos en el presente estudio se procedió a realizar una autopsia de los ratones en análisis, para lo cual se contó con equipos de disección, campos estériles e implementos de bioseguridad.

Luego se procedió a realizar una hepatectomía total. Se llevó a cabo cortes de dicho órgano para mandarlos al Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Militar Central y ser evaluados mediante tinción hematoxilina-eosina (H-E). Para dichos análisis, y los

anteriormente descritos en la sección de intervención propuesta, se usó compuestos para la preservación de las piezas anatómicas, envases de almacenamiento, entre otros instrumentos.

### **3.6 Procedimientos**

#### **3.6.1 Estudio experimental propiamente dicho**

Primero, se distribuyó cada ratón en una jaula, individualmente y se les aclimató en el laboratorio por un período de una semana. Cada jaula contó con un bebedero, comida y una superficie de viruta tratada. El ambiente en el que se dispuso las jaulas contó con 4 sistemas de calefacción: 3 en circuito y uno global.

Se procedió a dividir los ratones de la muestra en 5 grupos (Figura 1):

- Grupo 1 o A (10 ratones): Grupo experimental 1 (con administración de DEN y CUR en concentración de 272 mg/kg)
- Grupo 2 o B (10 ratones): Grupo experimental 2 (con administración de DEN y CUR en concentración de 372 mg/kg)
- Grupo 3 o C (10 ratones): Grupo experimental 3 (con administración de DEN y CUR en concentración de 472 mg/kg)
- Grupo 4 o D (10 ratones): Grupo control (solo con administración de DEN y placebo)
- Grupo 5 o E (10 ratones): Grupo blanco (sin administración cancerígena, ni tratamiento)

Grupo 1 o A: Estos son los ratones a los que se les administró DEN por vía intraperitoneal en concentración de 200 mg/kg, una vez al día, primero solo por 14 días; así como luego de 14 días, CUR en concentración de 272 mg/kg una vez al día, durante 15 semanas.

Grupo 2 o B: Estos son los ratones a los que se les administró DEN por vía intraperitoneal en concentración de 200 mg/kg, una vez al día, primero solo por 14 días; así

como luego de los 14 días, CUR en concentración de 372 mg/kg, una vez al día, durante 15 semanas.

Grupo 3 o C: Estos son los ratones a los que se les administró DEN por vía intraperitoneal en concentración de 200 mg/kg, una vez al día, primero solo por 14 días; así como después de los 14 días, CUR en concentración de 472 mg/kg, una vez al día, durante 15 semanas.

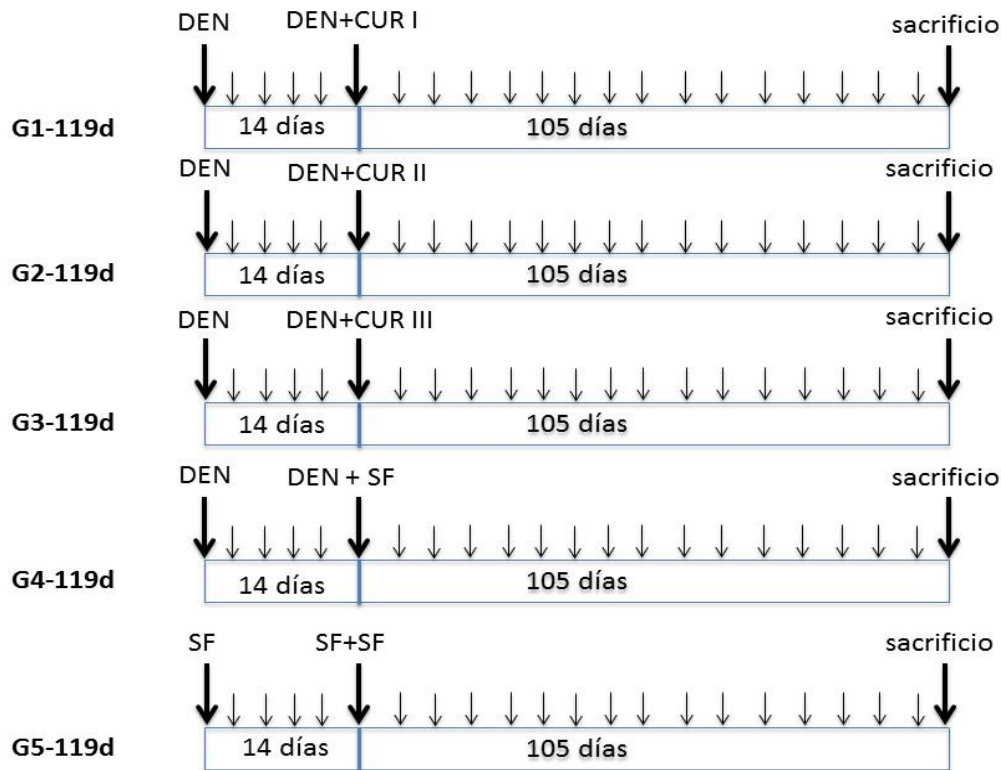
Grupo 4 o D: Estos son los ratones a los que se les administró DEN por vía intraperitoneal en concentración de 200 mg/kg, una vez al día, primero solo por 14 días. Asimismo luego de los 14 días, se le administró un placebo, consistente en suero fisiológico 0,9%, una vez al día. La aplicación del procedimiento se dio por 15 semanas.

Grupo 5 o E: Tuvieron ninguna intervención. Son los ratones a los que no se les indujo cáncer, para que luego, mediante exámenes histológicos de hígado, pueda establecerse una comparación con respecto a los que sí fueron intervenidos.

Una vez cumplidas las 15 semanas de tratamiento, se sacrificó a los ratones de todos los grupos para realizarles estudios anatómo-patológicos previa hepatectomía total, mediante tinción hematoxilina-eosina.

## **Figura 1**

Esquema de intervención propuesta



**Nota.** Los animales en el grupo 1, 2, 3 y 4 fueron inducidos por 14 días con DEN (200 mg/kg) intraperitonealmente y los del grupo 5 fueron inyectados intraperitonealmente con SF. Luego, los grupos 1,2 y 3 recibieron DEN+CUR I, II y III a dosis-kilo por 15 semanas según lo especificado.

### 3.7 Análisis de datos

Los datos obtenidos fueron analizados con el programa estadístico SPSS v.23. Se usó la prueba de Chi Cuadrado para medir la asociación entre las variables. También, se aplicó la prueba V de Cramer con la finalidad de medir el grado de asociación entre dichas variables. Asimismo, se llevó a cabo pruebas de dispersión de los datos y el test de Tukey para testar la hipótesis nula. La prueba para medir el riesgo relativo también fue efectuada para determinar el valor de las variables protectora, así como la prueba de Kruskal-Wallis. Se usó el método de Kaplan-Meier para medir la supervivencia. La prueba de Kolmogorov-Smirnov se efectuó, además de las ya anteriormente descritas, para medir la normalidad de los datos. Se efectuó modelos de regresión de Cox bivariados y multivariados para la estimación de los riesgos

instantáneos “*Hazard ratios*” (HR). Todo valor de p menor a 0,05 fue considerado como estadísticamente significativo.

### **3.8 Consideraciones éticas**

El presente trabajo de investigación se basó éticamente en la Guía de Manejo y Cuidado de Animales de Laboratorio emitido por el Instituto Nacional de Salud (INS). Asimismo, tomó en consideración los Principios Rectores Internacionales para Investigación Biomédica con Animales (International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals) propuestos por la Conciliación de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (Council for International Organizations of Medical Sciences, CIOMS) en conjunto con el Consejo Internacional para Animales de Laboratorio Científicos (International Council for Laboratory Animal Science, ICLAS).



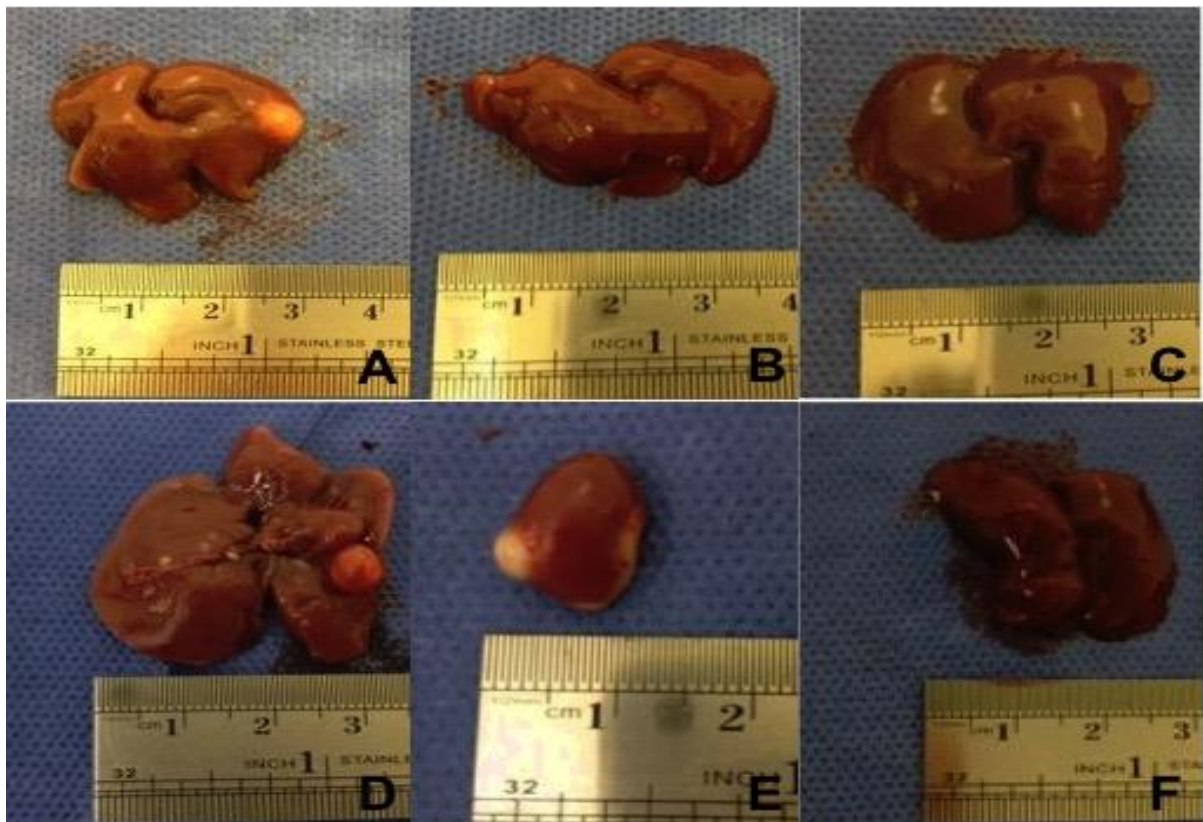
## IV. RESULTADOS

### 4.1 Inspección macroscópica y microscópica

Las características macroscópicas y microscópicas de cada hígado, así como de los demás órganos que pudieran presentar metástasis, fueron examinadas en todos los cinco grupos de experimentación. En el grupo CUR I (Grupo 1) se pudo observar nódulos en hígados aumentados de consistencia y tamaño (Fig. 2A). En los grupos CUR II y CUR III (Grupo 2 y Grupo 3) se observó cierto aumento de tamaño y consistencia de los hígados, pero no hubo nódulos macroscópicamente visibles (Fig. 2B-C). En el grupo DEN (Grupo 4), los hígados mostraban aumento de tamaño y consistencia del tejido, además se pudo observar grandes nódulos macroscópicamente así como el compromiso de más órganos por metástasis (Fig. 2D-E). Por último, en el grupo blanco (Grupo 5), se observó ningún tumor y tanto el tamaño como la consistencia hepática era menor que los grupos tratados con DEN (Fig. 2F).

### Figura 2

Características macroscópicas de los 5 grupos de ratones

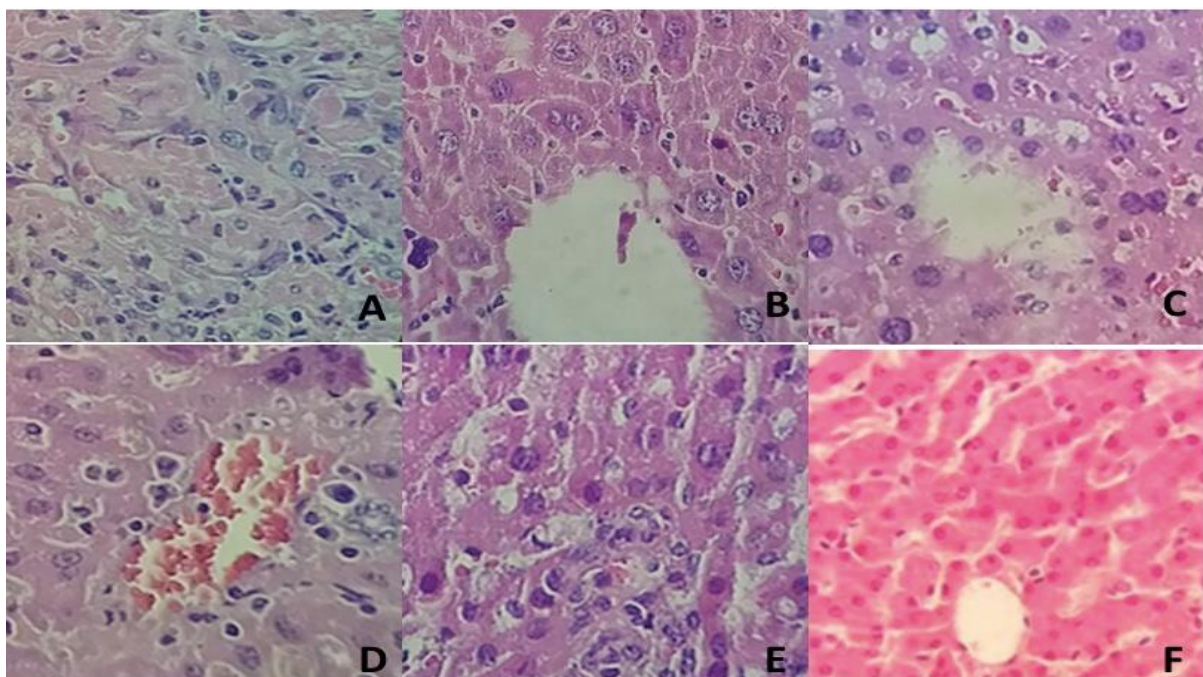


**Nota.** (A) Grupo CUR I (Grupo 1), hígado con cierto aumento de tamaño mostrando nódulo blanco-amarillento. (B,C) Grupos CUR II y III (Grupo 2 y 3), respectivamente, hígados aumentados de tamaño. (D,E) Grupo DEN (Grupo 4), hígado mostrando nódulo bien definido y riñón metastásico. (F) Grupo blanco (Grupo 5), hígado normal.

Microscópicamente, el grupo CUR I (Grupo 1) presentó en su mayoría congestión pasiva crónica, displasia moderada, y carcinoma hepatocelular (Tabla 1) histológicamente comprobado con infiltración de células inflamatorias, proliferación de células fibroblásticas y zonas de necrosis (Fig. 3A). En los grupos CUR II y CUR III (Grupo 2 y Grupo 3) se observó mayormente displasia moderada y leve, respectivamente (Fig. 3B-C). El grupo DEN (Grupo 4) obtuvo frecuencias similares para displasia leve, displasia moderada, displasia severa y carcinoma hepatocelular (Tabla 1), también comprobado mediante el examen histológico (Fig. 3D-E). Finalmente, el grupo blanco (Grupo 5) mostró una arquitectura histológicamente normal en todas las muestras hepáticas de los especímenes pertenecientes a este grupo (Fig. 3F).

### Figura 3

Características microscópicas



**Nota.** (A) Grupo CUR I (Grupo 1), carcinoma hepatocelular. (B) Grupo CUR II (Grupo 2), displasia moderada. (C) Grupo CUR III (Grupo 3), displasia leve. (D,E) Grupo DEN (Grupo 4) displasia severa y carcinoma hepatocelular, respectivamente. (F) Grupo control (Grupo 5), arquitectura hepática normal.

#### 4.2 Análisis estadístico

En lo que respecta la analítica descriptiva, se evaluó las frecuencias de los diagnósticos patológicos para cada grupo de estudio, así como de las variables metástasis, muerte por efectos adversos, muerte por CHC y tiempo de seguimiento. Se observa que en el Grupo 1 el 30% tuvo diagnóstico de congestión pasiva crónica, 10% displasia leve, 30% displasia moderada, 30% CHC, 10% de metástasis y 30% muerte por efectos adversos. En el Grupo 2, el 30% de los ratones tuvo diagnóstico de displasia leve, 30% displasia moderada, 20% displasia severa, 20% CHC, 20% metástasis y 40% muerte por efectos adversos. En el Grupo 3, el 30% tuvo diagnóstico de congestión pasiva crónica, 30% displasia leve, 20% displasia moderada, 10% displasia severa, 10% CHC, 60% muerte por efectos adversos y 10% muerte por CHC. En el Grupo 4, el 30% desarrolló displasia leve, 20% displasia moderada, 30% displasia moderada, 20% CHC, 10% metástasis y 20% muerte por efectos adversos. En el Grupo 5, ninguno de los ratones desarrolló patología hepática (100% sanos). La comparación de proporciones múltiples, medida por medio de la prueba Kruskal-Wallis, fue estadísticamente significativa para los diagnósticos histopatológicos ( $p < 0.05$ ); mientras que, la comparación de medias múltiples, evaluada mediante la prueba ANOVA, fue estadísticamente significativa para la variable tiempo de seguimiento ( $p < 0.05$ ) (Tabla 1).

**Tabla 1**

Diagnósticos y desenlaces por grupo de estudio

Variables	Grupos de estudio					Valor p
	Grupo 1, N (%)	Grupo 2, N (%)	Grupo 3, N (%)	Grupo 4, N (%)	Grupo 5, N (%)	
Diagnósticos						$<0,001^a$

Sin patología hepática	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	10 (100)	
Congestión pasiva crónica	3 (30)	0 (0)	3 (30)	0 (0)	0 (0)	
Displasia leve	1 (10)	3 (30)	3 (30)	3 (30)	0 (0)	
Displasia moderada	3 (30)	3 (30)	2 (20)	2 (20)	0 (0)	
Displasia severa	0 (0)	2 (20)	1 (10)	3 (30)	0 (0)	
Carcinoma hepatocelular	3 (30,0)	2 (20,0)	1 (10,0)	2 (20,0)	0 (0,0)	
Metástasis	1 (10,0)	2 (20,0)	0 (0,0)	1 (10,0)	0 (0,0)	0,444 <sup>a</sup>
Muerte por efectos adversos	3 (30,0)	4 (40,0)	6 (60,0)	2 (20,0)	0 (0,0)	0,053 <sup>a</sup>
Muerte por CHC	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (10,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,406 <sup>a</sup>
Tiempo de seguimiento (M ± DE)	98,2 ± 33,56	105,80 ± 19,97	83,90 ± 35,57	115,70 ± 7,80	119,00 ± 0,00	0,014 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Prueba de Kruskal-Wallis

<sup>b</sup> Prueba de ANOVA

Con respecto a la Regresión de Cox, se evaluó cada grupo de estudio contra el valor de desenlace, es decir el desarrollo de CHC vs no CHC. Para ello, se comparó el Grupo DEN (Grupo 4) con cada uno de los grupos en los que se administraban diferentes dosis de curcuminoides (Grupos 1, 2 y 3), observándose una disminución del HR conforme aumenta la dosis de curcuminoides, pero estos valores fueron mayores de 1, constituyéndose la administración de curcuminoides como factores pronósticos en vez de factores protectores. No obstante, ninguno de ellos fue estadísticamente significativo ( $p > 0.05$ ) y el IC abarcaba valores que incluían la unidad (Tabla 2).

**Tabla 2**

Regresión de Cox para la estimación de los factores de riesgos instantáneos

Grupo de estudio	Carcinoma hepatocelular		
	HR	IC 95%	Valor p
Grupo 4 vs Grupo 1	1.71	0,28 a 10,26	0.555
Grupo 4 vs Grupo 2	1.33	0,18 a 9,47	0.774
Grupo 4 vs Grupo 3	1.28	0,11 a 14,15	0.839

Mediante el estudio de Kaplan-Meier se analizaron las muertes por efectos adversos en cada uno de los grupos por medio de una curva de supervivencia, siendo la prueba Log Rank estadísticamente significativa para este (Tabla 3). Se observa que en el Grupo C (Grupo

3), los ratones empezaron a morir más temprano a lo largo del tiempo, siendo la supervivencia menor, seguido del Grupo B (Grupo 2) y Grupo A (Grupo 1) (Figura 4).

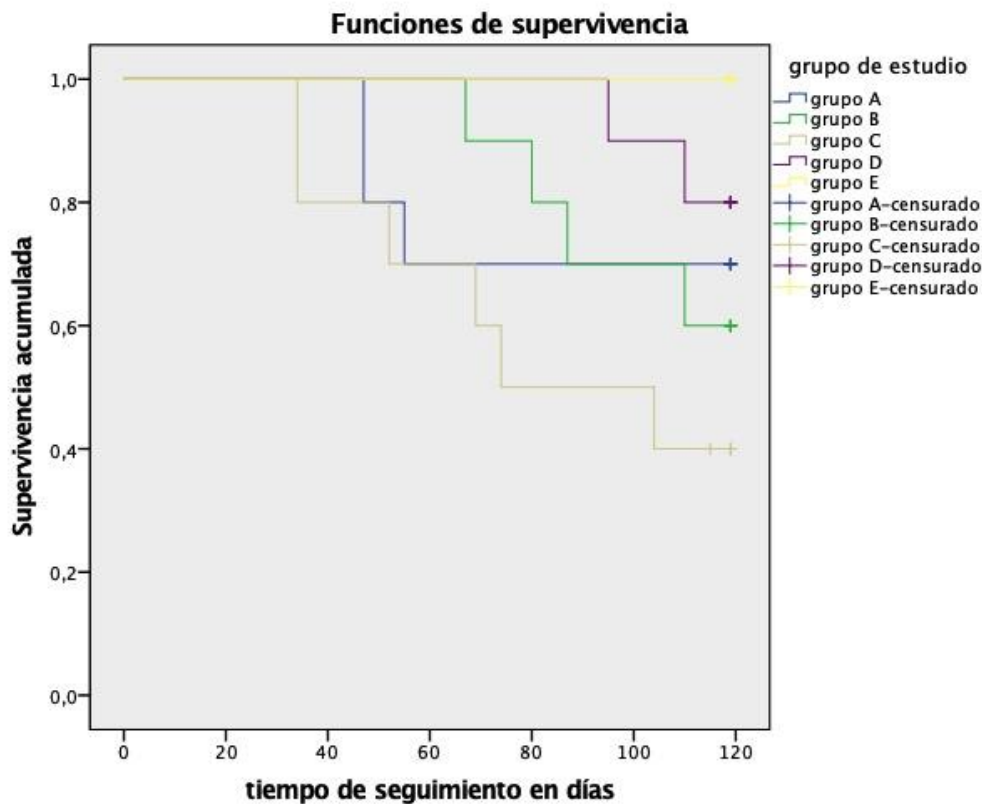
**Tabla 3**

Test de distribuciones iguales de curvas de supervivencia entre las muertes por efectos adversos (Log Rank)

	Valor p
Log Rank (Mantel-Cox)	0.028

**Figura 4**

Curvas de supervivencia (muertes por efectos adversos vs tiempo)



**Nota.** Se presenta la curva de supervivencia de muertes por efectos adversos en función al tiempo. El grupo A corresponde al Grupo CUR I (1) observándose una supervivencia del 70% al final del estudio. El grupo B corresponde al Grupo CUR II (2), con una supervivencia

de 60% hacia el final del estudio. El grupo C corresponde al Grupo CUR III (3), con una supervivencia de 40% hacia el final. El grupo D representa al Grupo DEN (4), con una supervivencia de 80%. El grupo E corresponde al Grupo blanco (5), con 100% de supervivencia al final del estudio.

## V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los cambios macroscópicos en el grupo CUR I (Grupo 1) difirieron de los hallados en los grupos de mayor dosis de curcuminoides (Grupo 2 y Grupo 3), siendo los hallazgos en los grupos CUR II y CUR III, en general, patológicamente más leves. Estos resultados son similares a los reportados por Zhao et al. (2015), quienes observaron que los especímenes sujetos al tratamiento con curcumina (curcuminoide) evidenciaban menor presencia de masas nodulares conforme se incrementaba la dosis.

En el grupo DEN (Grupo 4), los cambios patológicos macroscópicamente incluyeron hepatomegalia, consistencia hepática aumentada, grandes nódulos y metástasis, lo cual también es apoyado por lo reportado por Zhao et al. (2015) quienes observaron tales cambios en los roedores pertenecientes al grupo DEN en su estudio.

Microscópicamente, las mayores frecuencias de daño hepático severo, como displasia severa y CHC, se observaron en los grupos CUR I (Grupo 1) y DEN (Grupo 4). Dichos hallazgos en el grupo Grupo 4 guardan relación con lo reportado por Tork et al. (2015), Ahmed et al. (2015) y Kadasa et al. (2015), mientras que lo hallado en el Grupo 1 es apoyado por Fujise et al. (2012), quienes reportaron la presencia de nódulos cancerígenos en los hígados de los especímenes pertenecientes al grupo tratado con curcumina. Partial et al. (2015) reportan otro resultado similar en su estudio donde el grupo tratado con curcumina se parecía histológicamente más al grupo DEN.

En los grupos CUR II (Grupo 2) y CUR III (Grupo 3) los cambios histológicos, si bien evidenciaban, en las muestras, células reactivas con nucléolo prominente, aún conservaban la arquitectura tisular en su mayoría. Tork et al. (2015), Ahmed et al. (2015), Kadasa et al. (2015) y Abouzied et al. (2015) obtuvieron resultados similares en los grupos tratados con curcumina, los cuales solo evidenciaron infiltrado inflamatorio, dilatación de la

vena centrolobulillar y zonas de necrosis, pero siempre con conservación de la arquitectura tisular hepática sin evidencia de carcinogénesis.

El efecto antitumoral reportado en los Grupos 2 y 3 puede deberse a su influencia reportada en estudios previos sobre el sistema inmunitario, procesos de angiogénesis, entre otros (D'Souza & Devarajan, 2016). Diversos estudios epidemiológicos han demostrado que la inflamación es uno de los factores más importantes en el desarrollo del cáncer, y posiblemente se deba a la inactivación del factor nuclear NF-kB, el cual lleva directamente a la inhibición de la expresión de ciertas citocinas pro-inflamatorias (TNF, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, y IL-12) (Bose et al., 2015). Sin embargo, estas son solo hipótesis que aún necesitan ser confirmadas por más estudios.

La diferencia de diagnósticos por grupo de estudio fue estadísticamente significativa, de acuerdo a la prueba de Kruskal-Wallis con  $p < 0.05$ . Este resultado evidencia que el pertenecer a determinado grupo intervino sobre el diagnóstico obtenido, lo cual es reforzado por el estudio de Ahmed et al. (2015), en el cual se observaron cambios estadísticamente significativos en los grupos blanco, control y de tratamiento; así como por el estudio de Kadasa et al. (2015), en donde la diferencia fue estadísticamente significativa entre los grupos blanco y el grupo control.

Por otra parte, respecto a la regresión de Cox, se observa que la administración de cualquier dosis de curcuminoides constituyó factores pronósticos para el desenlace (desarrollo de CHC vs no CHC). Se evidencia que, si bien el HR disminuyó conforma aumentaba la dosis de curcuminoides, todos estos valores fueron  $> 1$ , es decir que los grupos que reciben curcuminoides tienen mayor probabilidad de presentar riesgos instantáneos de desarrollo de CHC; sin embargo, ninguno de estos resultados fue estadísticamente significativo ( $p > 0.05$ ). Por otro lado, cada uno de los grupos contrastados presentaba IC que incluían a la unidad, lo cual significa que sí podría tener un efecto protector, pero por algunos



factores como el tamaño de muestra, tiempo de seguimiento, método de inducción, etc., no se logró observar un resultado real.

Asimismo, las diferencias entre las curvas de supervivencia en la prueba de Kaplan-Meier resultó estadísticamente significativas para las muertes por efectos adversos, ya que la prueba de Log Rank (Mantel-Cox) resultó con un  $p < 0.05$ , lo que significa que el pertenecer a determinado grupo intervino en la supervivencia de los especímenes en función del tiempo. De acuerdo al análisis, se observó que la supervivencia al final del estudio en grupo DEN (Grupo 4) fue de 80%, empezando a presentar decesos más tarde, a lo largo del tiempo; mientras que, en el caso de los Grupos CUR I, II y III, (Grupos 1, 2 y 3, respectivamente), la supervivencia fue de 70%, 60% y 40%, respectivamente, siendo los ratones del Grupo 3 los que fallecieron de forma más temprana, en función al tiempo. Esto significa que a mayor dosis de curcuminoides se asociaron mayores efectos tóxicos. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Zhao et al. (2014), quien obtuvo diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia entre los grupos de estudio para muertes por carcinoma hepatocelular, en el grupo control fue del 60% ( $p < 0,05$ ) respecto al grupo blanco, y la del tratado con curcumina fue de 83,3% ( $p < 0,05$ ) con respecto al grupo control.

## VI. CONCLUSIONES

- Macroscópicamente, los grupos a los que se les administró mayores dosis de curcuminoides (Grupos 2 y 3), desarrollaron cambios anatómicos patológicamente más leves respecto al Grupo 1, y este último con respecto al grupo al que solo se administró DEN.
- Microscópicamente, los grupos CUR I y DEN (Grupos 1 y 4, respectivamente) desarrollaron cambios histológicos más severos con mayor frecuencia (displasia severa y CHC), con respecto a los Grupos 2 y 3, quienes conservaron la arquitectura tisular en su mayoría.
- Los curcuminoides presentaron mayor efecto antitumoral a mayor dosis (Grupos 2 y 3); sin embargo, los hallazgos no fueron estadísticamente significativos ni presentaron un IC adecuado.
- A mayor dosis de curcuminoides se presentaron mayores efectos tóxicos (Grupo 3 respecto a los Grupos 1 y 2), lo cual repercutió en la menor supervivencia de los especímenes hacia el final del estudio.

## VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar estudios evaluando la eficacia de los curcuminoides en vehículos que les confieran mayor estabilidad y biodisponibilidad en el organismo vivo, y comparando tales efectos con los expuestos por antineoplásicos de elección para el tratamiento de carcinoma hepatocelular.
- Se recomienda realizar estudios usando pruebas moleculares en expresión de ARNm involucrados en las vías de señalización del proceso carcinogénico del carcinoma hepatocelular y así evaluar que vías exactamente podría estar afectando los curcuminoides en el carcinoma hepatocelular.
- Se recomienda, una vez resueltos los sesgos y dilucidados los mecanismos moleculares mencionados, evaluar los efectos de los curcuminoides en humanos por ensayos clínicos, dados que todos estos estudios son preclínicos y carecerían de resultados definitivos.

## VIII. REFERENCIAS

- Abouzied, M.M., Eltahir, H.M., Abdel Aziz, M.A., Ahmed, N.S., Abd El-Ghany, A.A., Abd El-Aziz, E.A., & Abd El-Aziz, H.O. (2015). Curcumin ameliorate DENA-induced HCC via modulating TGF- $\beta$ , AKT, and caspase-3 expression in experimental rat model. *Tumor Biology*, 36(3), 1763-1771. 10.1007/s13277-014-2778-z
- Ahmed, H.H., Shousha, W.G., Shalby, A.B., El-Mezayen, H.A., Ismaiel, N.N., & Mahmoud, N.S. (2015). Curcumin: a unique antioxidant offers a multimechanistic approach for management of hepatocellular carcinoma in rat model. *Tumor Biology*, 36(3), 1667-1678. 10.1007/s13277-014-2767-2
- Armengol, C., Sarrias, M.R., & Sala, M. (2018). Carcinoma hepatocelular: presente y futuro. *Medicina Clínica*, 150(10), 390–397. 10.1016/j.medcli.2017.08.010
- Bose, S., Panda, A.K., Mukherjee, S., & Sa, G. (2015). Curcumin and tumor immune-editing: resurrecting the immune system. *Cell Division*, 10, 6. 10.1186/s13008-015-0012-z
- Chagoya de Sánchez, V., et al. (2018). Estudio integral de cirrosis y carcinoma hepatocelular. *Mensaje Bioquímico*, 42(2018), 130-146.
- Chintana, P. (2008). Role of Curcumin on Tumor Angiogenesis in Hepatocellular Carcinoma. *Naresuan University Journal*, 16(3), 239-254.
- D'Souza, A.A., & Devarajan, P.V. (2016). Bioenhanced oral curcumin nanoparticles: Role of carbohydrates. *Carbohydrate Polymers*, 136, 1251-1258. 10.1016/j.carbpol.2015.10.021
- Di Bisceglie, A.M. (1998). Hepatitis C. *The Lancet*, 351(9099), 351–355. 10.1016/s0140-6736(97)07361-3
- Forner, A., et al. (2016). Diagnóstico y tratamiento del carcinoma hepatocelular. Actualización del documento de consenso de la AEEH, SEOM, SERAM, SERVEI y SETH. *Medicina Clínica*, 146(11), 511.e1–511.e22. 10.1016/j.medcli.2016.01.028

- Forner, A., Reig, M., & Bruix, J. (2018). Hepatocellular carcinoma. *The Lancet*, 391(10127), 1301–1314. 10.1016/s0140-6736(18)30010-2
- Fron, C., & Blanc, J.F. (2018). Carcinoma hepatocelular. *EMC - Tratado de Medicina*, 22(2), 1–9. 10.1016/s1636-5410(18)89309-6
- Fujise, Y., Okano, J., Nagahara, T., Abe, R., Imamoto, R., & Murawaki, Y. (2012). Preventive effect of caffeine and curcumin on hepato-carcinogenesis in diethylnitrosamine-induced rats. *International Journal of Oncology*, 40(6), 1779-1788. 10.3892/ijo.2012.1343
- García, A. (2016). Virus oncogénicos.
- Gautam, S.C., Gao, X., & Dulchavsky, S. (2007). IMMUNOMODULATION BY CURCUMIN. En Aggarwal, B.B., Surh, YJ., Shishodia, S. (Eds.), *The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease. ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY* (pp. 321-341), Boston: Springer.
- Hu, B. et al. (2015). A polymeric nanoparticle formulation of curcumin in combination with sorafenib synergistically inhibits tumor growth and metastasis in an orthotopic model of human hepatocellular carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 468(4), 525–532. 10.1016/j.bbrc.2015.10.031
- Kadasa, N.M., Abdallah, H., Afifi, M., & Gowayed, S. (2015). Hepatoprotective effects of curcumin against diethylnitrosamine induced hepatotoxicity in albino rats. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(1):103-108. 10.7314/apjcp.2015.16.1.103
- Lencioni, R., Marrero, J., Venook, A., Ye, S.L., & Kudo, M. (2010). Design and rationale for the non-interventional Global Investigation of therapeutic DEcisions in hepatocellular carcinoma and Of its treatment with sorafeNib (GIDEON) study. *International Journal of Clinical Practice*, 64(8), 1034–1041. 10.1111/j.1742-1241.2010.02414.x

- Matilla Peña, A., Chiva, M.T., Fernández-Simón, A., & Romerao Cristobal, M. (2012). Hepatocarcinoma. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(12), 693–703. 10.1016/s0304-5412(12)70370-0
- Ministerio de Salud. (2013). Análisis de la situación del cáncer en el Perú 2013.
- Organización Mundial de la Salud. (2018). Global status report on noncommunicable diseases country profiles 2018.
- Organización Mundial de la Salud. (2020). World Cancer Report, Cancer research for cancer prevention.
- Pan, Z., Zhuang, J., Ji, C., Cai, Z., Liao, W., & Huang, Z. (2018). Curcumin inhibits hepatocellular carcinoma growth by targeting VEGF expression. *Oncology Letters*, 15(4), 4821-4826. 10.3892/ol.2018.7988
- Patial, V., S, M., Sharma, S., Pratap, K., Singh, D., & Padwad, Y.S. (2015). Synergistic effect of curcumin and piperine in suppression of DENA-induced hepatocellular carcinoma in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40(2), 445-452. 10.1016/j.etap.2015.07.012
- Porro, C., Cianciulli, A., Trotta, T., Lofrumento, D.D., & Panaro, M.A. (2019). Curcumin Regulates Anti-Inflammatory Responses by JAK/STAT/SOCS Signaling Pathway in BV-2 Microglial Cells. *Biology*, 8(3), 51. 10.3390/biology8030051
- Ramírez-Soto, M., Guevara-Cuadros, J., & Huichi-Atamari, M. (2012). Mortalidad por hepatocarcinoma y cirrosis hepática en Apurímac: 2007- 2010. *Revista Peruana de Epidemiología*, 16(1), 01-05.
- Ruiz, E., Sanchez, J., Celis, J., Payet, E., Berrospi, F., Chavez, I., & Young, F. (2007). Resultados a corto y largo plazo de la Resección Hepática por Hepatocarcinoma. Análisis de 232 Resecciones Consecutivas. *Revista Peruana de Gastroenterología*, 27(3), 223-235.

- Teng, C.F., et al. (2019). Chemopreventive Effect of Phytosomal Curcumin on Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma in A Transgenic Mouse Model. *Nature Scientific Reports*, 9(1), 10338. 10.1038/s41598-019-46891-5
- Tork, O.M., Khaleel, E.F., & Abdelmaqsoud, O.M. (2015). Altered Cell to Cell Communication, Autophagy and Mitochondrial Dysfunction in a Model of Hepatocellular Carcinoma: Potential Protective Effects of Curcumin and Stem Cell Therapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(18), 8271-8279. 10.7314/apjcp.2015.16.18.8271
- Vallianou, N.G., Evangelopoulos, A., Schizas, N., & Kazazis, C. (2015). Potential Anticancer Properties and Mechanisms of Action of Curcumin. *Anticancer Research*, 35(2), 645-652.
- Wang, J., Ma, L., Tang, X., Zhang, X., Qiao, Y., Shi, Y., Xu, Y., Wang, Z., Yu, Y., & Sun, F. (2015). Doxorubicin induces apoptosis by targeting Madcam 1 and AKT and inhibiting protein translation initiation in hepatocellular carcinoma cells. *Oncotarget*, 6(27), 24075-24091. 10.18632/oncotarget.4373
- Wang, J., Wang, C., & Bu, G. (2018). Curcumin inhibits the growth of liver cancer stem cells through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin signaling pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(4):3650-3658. 10.3892/etm.2018
- Zhang, W.K., Gu, H.W., Li, X.J., Li, Y.S., Tang, H.B., Tian, G.H., & Shang, H.C. (2017). The dark side of “the force” – lipid nanoparticles enhance the oncogenesis of diethylnitrosamine and result in liver cancer in mice. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 13(2), 701–711. 10.1016/j.nano.2016.09.017
- Zhao, J.A., Peng, L., Geng, C.Z., Liu, Y.P., Wang, X., Yang, H.C., & Wang, S.J. (2014). Preventive effect of hydrazinocurcumin on carcinogenesis of diethylnitrosamine-

induced hepatocarcinoma in male SD rats. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(5), 2115-2121. 10.7314/apjcp.2014.15.5.2115

Zhao, X., Chen, Q., Li, Y., Tang, H., Liu, W., & Yang, X. (2015). Doxorubicin and curcumin co-delivery by lipid nanoparticles for enhanced treatment of diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in mice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 93, 27–36. 10.1016/j.ejpb.2015