

Efecto antitumoral de compuestos glicoconjugados sobre cultivos primarios de células de cáncer de páncreas obtenidas por ecoendoscopia

María Inés Molejon,^{1,2} Gisela Weiz,¹ Juan Ignacio Tellechea,³ Javier Breccia,¹ María Inés Vaccaro²

¹ INCITAP-CONICET (Instituto de Ciencias de la Tierra y Ambientales de La Pampa - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de La Pampa. Santa Rosa, La Pampa.

² IBIMOL-CONICET (Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), Departamento de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

³ Institución Médica Profensa. Santa Rosa, La Pampa. Argentina.

Acta Gastroenterol Latinoam 2019;49(3):208-221

Recibido: 14/11/2018 / Aceptado: 19/02/2019 / Publicado online: 17/09/2019

Resumen

El adenocarcinoma pancreático (PDAC), que constituye el 90% de los cánceres de páncreas, es la cuarta causa mundial de muertes relacionadas al cáncer. Debido a sus características moleculares y genéticas, PDAC pertenece al grupo de tumores con más resistencia al tratamiento quimioterápico. En la actualidad, las opciones terapéuticas disponibles incluyen la cirugía, la radiación, la quimioterapia, la inmunoterapia y drogas dirigidas. Sin embargo, la mayoría de los tratamientos son paliativos, con el objeto de disminuir los síntomas relacionados con la enfermedad. Por lo tanto, nuestro objetivo es evaluar el efecto de un compuesto glicosilado, la hidroquinona-rutinósido, sobre células tumorales pancreáticas primarias con el fin de buscar mayor efectividad de los tratamientos quimioterápicos actuales. Encontramos que la utilización de glicocompuestos como segunda línea de terapia mejora significativamente el efecto antitumoral de la

gemcitabina. Estos resultados sugieren un potencial interés en la utilización de compuestos glicoconjugados como terapias complementarias a los tratamientos estándares contra el cáncer.

Palabras claves. Adenocarcinoma pancreático, hidroquinona, proteína de membrana de vacuola 1, aspiración con aguja fina, biopsia.

Abreviaturas

PDAC: Adenocarcinoma pancreático.

HQ: Hidroquinona.

VMP1: Vacuole-membrane protein 1.

PAAF: Punción aspirativa con aguja fina.

El adenocarcinoma pancreático (PDAC) involucra el 90% de los tumores que afectan el páncreas. El PDAC es uno de los tumores malignos con peor pronóstico, con un estimativo de 367.000 nuevos casos en el mundo durante 2015, y con 359.000 muertes en ese mismo año.¹ El cáncer de páncreas actualmente constituye la cuarta causa de muerte por cáncer en los países desarrollados, sin embargo, si no se produce un avance en las terapias utilizadas, se cree que la enfermedad llegará a ser la segunda causa de muerte en la próxima década.² La razón de este grave pronóstico se relaciona en parte con la insensibilidad a la quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia. Además, los signos y síntomas del PDAC aparecen en la última

Correspondencia: María I Vaccaro
Junín 954 (C1113AAD). Ciudad Autónoma de Buenos Aires
Argentina / Tel.: +5411 4964 8268
Correo electrónico: mvaccaro@ffy.b.uba.ar

etapa de la enfermedad, por lo que la mayoría de los pacientes se presenta con estadios avanzados del tumor al momento del diagnóstico. Así, aunque la resección quirúrgica ha demostrado tasas de supervivencia de hasta el 40%, el 85% de los pacientes con PDAC no son elegibles para cirugía.³ Del 15% que es sometido a cirugía, el 85% presenta relapso tumoral.⁴⁻⁸

La autofagia es un proceso de degradación de componentes citoplasmáticos altamente conservado, que sirve como un mecanismo de supervivencia en condiciones de ayuno.^{9, 10} La autofagia ocurre a nivel basal en la mayor parte de los tejidos y contribuye al recambio rutinario de los componentes citoplasmáticos. Está implicada en el desarrollo, la diferenciación y la remodelación de tejidos en distintos organismos.^{11, 12} El rol de la autofagia en la salud y la enfermedad ha sido descrito como un arma de doble filo, debido a que se encuentra relacionada tanto con la sobrevida como con la muerte celular.¹³ Esta decisión depende del estado de la carcinogénesis, del contexto célula/tejido, de las características moleculares de la célula blanco y de la naturaleza del estrés.¹⁴⁻¹⁶ Yang y col. han demostrado que la autofagia esta activada constitutivamente en tumores que presentan la mutación Kras. El Kras se encuentra activado en casi todos los tumores pancreáticos, incluidos los tres tipos de lesiones precursoras del PDAC descritas: PanINs (*pancreatic intraepithelial neoplasias*), neoplasias papilares mucinosas intraductales y neoplasias quísticas mucinosas.¹⁷ La inactivación genética o farmacológica de la autofagia impide la tumorigenesis mediada por Kras. Previamente hemos demostrado que Kras induce la expresión de VMP1 (vacuole membrane protein 1) en células de cáncer de páncreas. VMP1 se expresa tempranamente durante numerosas patologías, incluyendo la diabetes mellitus, los procesos inflamatorios del páncreas (pancreatitis) y el cáncer de páncreas.^{18, 19}

Los flavonoides son compuestos fenólicos con un grupo funcional benzopirónico.²⁰ La hesperidina (hesperetin 7-*O*-rutinosido), que se encuentra en plantas del género citrus, está compuesta por la aglicona hesperetina y el disacárido rutinosa (6-*O*- α -L-ramnopiranosil- β -D-glucopiranososa).²¹⁻²³ Se ha demostrado que tiene actividades farmacológicas, incluyendo antioxidantes, vasoprotectoras, y efectos antitumorales.²⁴⁻³¹

La síntesis enzimática de enlaces glicosídicos ha sido objeto de estudio durante más de 60 años y se han desarrollado diferentes estrategias que evitan o complementan la síntesis química, que generalmente requiere múltiples etapas de protección y desprotección para obtener los oligosacáridos deseados.³² En la naturaleza, las glicosido transferasas (GT) son los principales catalizadores para la síntesis de uniones glicosídicas. Sin embargo, debido a

dificultades en su expresión y purificación, sumado al elevado costo económico para su obtención, sus aplicaciones son restringidas. Una alternativa es utilizar enzimas glicosido hidrolasas (GH) como catalizadores de enlaces glicosídicos, ya que son más abundantes, fáciles de obtener y presentan amplio rango de especificidad, además de ser más económicas.³³

En nuestro laboratorio se aisló y caracterizó una GH, denominada 6-*O*- α -ramnosil- β -glucosidasa proveniente del hongo *Acremonium* sp. DSM 24697. Esta enzima es capaz transferir el disacárido rutinosa, desde la hesperidina a diversos aceptores hidroxilados, como por ejemplo la hidroquinona.^{34, 35} En este trabajo nos propusimos evaluar el efecto del rutinosido de hidroquinona sobre células tumorales pancreáticas primarias.

Métodos

Muestras tumorales

Los protocolos a utilizar para la obtención de las muestras de los tumores, los criterios de inclusión y exclusión de pacientes en el estudio, y los modelos estadísticos a utilizarse fueron aprobados por el Comité de Ética e Investigación Independiente Patagónico (CEIP). Las muestras tumorales se obtuvieron a partir de PAAF (punciones aspirativas con aguja fina) guiadas por ecoendoscopia (EE) a partir de pacientes con diagnóstico de cáncer de páncreas sin haber recibido tratamiento previo a la punción. Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética Independiente Patagónico.

Criterios de elección de los pacientes

Criterios de inclusión: pacientes mayores de 18 años con sospecha de tumor o diagnóstico que conducen a un procedimiento quirúrgico o a una ecoendoscopia.

Criterios de exclusión: toda persona en situación de urgencia, o adulto sujeto a una medida de protección legal o toda aquella persona incapaz de dar su consentimiento, o diagnóstico final diferente a PDAC.

Se realizó el estudio del páncreas con un ecoendoscopia lineal (UCT-140 AL5; Olympus, Tokyo, Japón). Las lesiones tumorales fueron punzadas con agujas de 22 Gauge (EchoTip; Wilson Cook, Winston Salem, NC, EE.UU.) (Expect; Boston Scientific, Burlington, MA, EE.UU.). Luego de retirar el estilete y aplicar succión anejando una jeringa (20 cc con presión negativa), la aguja al vacío realizó al menos 20 pasajes dentro de la lesión, aplicando la técnica de *fanning*. Se retiró la aguja y el estilete fue reintroducido, el primer material protruido se posó sobre porta-vidrios y se fijó en alcohol 96% (citología). Luego con una jeringa con solución fisiológica se recuperó el material aspirado en un tubo con líquido de preservación

(BD CytoRich Red Preservative, destinado para el cultivo de células). Se realizó otra punción repitiendo los mismos pasos, dichas muestras se recuperaron, se fijaron en formol al 10% y se enviaron para estudio de anatomía patológica.

Cultivo celular

Dentro de un cuarto de cultivo seguridad 2 las muestras tumorales fueron tratadas de la siguiente manera: centrifugación de la pieza a 1200 rpm/ 7 minutos a R/T. Luego se resuspendió el pellet obtenido en 3 mL de colagenasa (1 mg/ml) (Sigma) y se incubó a 37°C en baño maría. Luego de 10' de incubación, las muestras se centrifugaron a 700 rpm 4' a temperatura ambiente (R/T). Se resuspendió el pellet celular en 5ml de Tapón de lisis para glóbulos rojos (1 x RBC Lisis Buffer, eBiosciences). Se agitaron suavemente 5' y se centrifugaron a 700 rpm 4' R/T. Finalmente se resuspendió el pellet en Medio DMEM F10 (Invitrogen) en una placa previamente cubierta con una matriz extracelular. Incubar las células a 37°C en un ambiente con 5% de CO₂.

Cada cultivo primario se mantuvo en medio de cultivo completo hasta la aparición de confluencia, que varió de 15 días a 30 días, según el tumor. Cuando las células alcanzaron un 70% de confluencia, se trataron con alfa-zima (PAA Laboratories) durante 20'. Este tratamiento permitió la eliminación de células estromales, obteniendo un cultivo primario de células tumorales mayormente.

Histología

Las muestras tumorales fueron embebidas en parafina 4% y teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) y analizadas con un Microscopio Nikon E200 trinocular acoplado a cámara digital.

Extracción y purificación de RNA

La extracción del RNA de cultivos celulares se realizó con el reactivo Trizol (Invitrogen). Las células se crecieron en un multiwell de 6 y luego se les realizó el tratamiento deseado. Para la purificación del RNA se lavaron las células con PBS, se agregó 1 ml de Trizol por well y se pipeteó para levantar las células. Luego se pasó el contenido de cada well a un tubo de 1,5 ml, en donde se agregaron 0,2 ml de cloroformo. A continuación, se centrifugó a 12.000 xg durante 15 min a 4°C. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo en donde se agregaron 0,5 ml de isopropanol. Se dejó incubando 10 min y después se centrifugó a 12.000 xg por 10 min a 4°C. El pellet de RNA obtenido luego de la centrifugación se lavó con etanol 75%, se centrifugó nuevamente y se suspendió en agua. Se determinaron las concentraciones de RNA midiendo la absorbancia a 260 nm. Para chequear su calidad se realizó una corrida en gel de agarosa y se visualizó por tinción con bromuro de etidio.

RT-PCR y Real-Time RT-PCR

Se utilizaron 2 µg del RNA purificado y se trataron con 1 µl de *RNase-free DNase I (Invitrogen)* en un volumen final de 10 µl conteniendo buffer de RNasa 1X. Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego se incubó a 65°C durante 10 min. A continuación, se incubaron los 10 µl del tratamiento DNasa con 100 nM random primers (N6) a 70°C durante 5 min. A continuación, se utilizó la mezcla de RNA más random primers y se agregó 1 mM dNTPs y 1 µl de la enzima transcripasa reversa MMLV (Promega) en un volumen final de 20 µl conteniendo buffer MMLV 1X. La mezcla se incubó a 25°C durante 5 min y luego a 37°C durante 1 hora. Para la reacción de PCR se utilizaron 0,5 µl de reacción de RT en una mix con 200 µM dNTPs, 4 mM MgCl₂, 200 nM de primer Forward y Reverse y 1 µl de la enzima Go Taq (Promega) en un volumen de 25 µl conteniendo buffer Go Taq 1X. Las condiciones de la PCR y los primers utilizados fueron desarrollados en la subsección de fisiopatología del IBIMOL.

Síntesis de compuestos

Hidroquinona (HQ) (benzene-1,4-diol) fue obtenida de Sigma-Aldrich (St. Louis, EE.UU.). HQ- rutinósido fue sintetizada enzimáticamente a 30°C durante 24 hs en buffer fosfato de sodio 50 mM pH 6. La mezcla de reacción contenía: 1,8 mM de hesperidina, 1,8 mM de HQ, 0,02 U ml⁻¹ de 6-O- α -ramnosil- β -glucosidasa, y 2%v/v de DMSO. La reacción se finalizó en baño maría hirviente a 100°C por 10 min. Los productos de la reacción fueron purificados utilizando la columna Sephadex LH20 (1,5 x 150 cm; flujo 0,1 ml min⁻¹). El producto de transglucosilación fue identificado mediante resonancia magnética nuclear (RMN) como 4-hidroxifenil β -rutinósido (HQ-rutinósido).

Curvas de viabilidad

La quimiosensibilidad se evaluó realizando cruvas de proliferación celular. 5x10³ células por pocillo fueron plaqueadas en una multiplaca de 96 pocillos en SFDM. 24 hs después el medio fue suplementado con 200 µM de Gemcitabina (Lilly), y se incubaron por 4 h. Luego, se adicionaron dosis crecientes (0 a 1000 µM) de HQ-rutinósido y a las 24 h se evaluó la citotoxicidad. Cada experimento se realizó por duplicado. La proliferación celular se estimó luego de la incubación con el agente PrestoBlue (Life Technologies) por 3 h, según protocolo del manufactor.

Análisis estadísticos

Los datos fueron expresados como la media \pm ES (error estándar). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA)

factorial para comparar las muestras. Las diferencias se consideraron significativas cuando $*p < 0,05$; $**p < 0,01$ vs. control o $\$ p < 0,05$; $\$\$ p < 0,001$ vs. GEM.

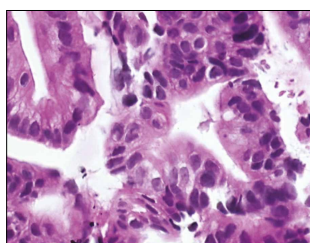
Resultados

Datos clínico-patológicos de los pacientes

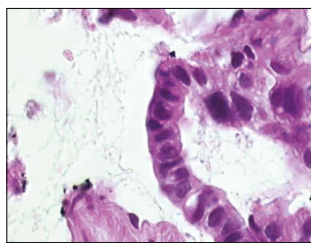
En la Tabla 1 se detallan las características de los pacientes y la evolución del tumor. La Figura 1 muestra la histología de los tumores. El tumor 1 presentó una diferenciación glandular y algunas formas tubulares. En la foto del tumor 2 observamos un estroma desmoplásmico y formaciones glandulares.

Figura 1. Tinción con hematoxilina-eosina de los tumores obtenidos por ecoendoscopia (A) Tumor 1; (B) Muestra tumoral 2; (HE, 1000X).

Tumor 1



Tumor 2



Establecimiento de líneas tumorales pancreáticas

Con el fin de corroborar la tumorigenicidad de las líneas celulares primarias, realizamos la caracterización del estado mutacional de Kras por PCR (121). Los resultados de PCR fueron seguidos por la secuenciación del ADN. Ha sido previamente publicado que la mutación de Kras se encuentra entre el 75-95% de los adenocarcinomas pancreáticos. Las líneas celulares estudiadas portaron la mutación Kras, en el cromosoma 12, exón 1 a nivel de los

codones 12 (mutación más frecuente). Las formas mutadas contienen GAT (ácido aspártico) y GTT (valina) (Tabla 2). La presencia de estas mutaciones en las líneas celulares establecidas indica el origen epitelial de un proceso tumoral pancreático.

Expresión de VMP1 en las líneas tumorales

Se ha descrito la presencia de VMP1, proteína involucrada en las primeras etapas del proceso autofágico en líneas celulares establecidas. VMP1 es una proteína de estrés, que se expresa luego de someter a las células a un estrés como pancreatitis o cáncer de páncreas.

Con el objetivo de evaluar la expresión de VMP1 en las líneas celulares establecidas a partir de muestras humanas, se determinó la expresión del mRNA de VMP1 en las líneas tumorales y se la comparó con la expresión en células HeLa utilizando la técnica de RT-PCR Real Time. Como control interno se amplificó la β -actina. Los niveles de mRNA de VMP1 fueron relativizados al mRNA de β -actina. Los resultados mostraron que la expresión basal del mRNA de VMP1 de las células tumorales pancreáticas es significativamente mayor que el de las células HeLa (Figura 2). Estos resultados sugieren que las células primarias de cáncer pancreático podrían presentar mayores niveles de autofagia, indicados por una mayor expresión de la proteína VMP1.

Evaluación de la quimiosensibilidad de las líneas tumorales

Se analizó la sensibilidad de las células de cáncer pancreático primarias al tratamiento con gemcitabina. Las líneas celulares primarias fueron tratadas con 200 μ M de gemcitabina. Luego de 4 horas, se adicionaron de 0 a 1000 μ M de HQ-rutinósido y a las 24 h se evaluó la

Tabla 1. Historia clínica y características clínico-patológicas de los pacientes.

Tumor	Edad (años) /sexo	Factores de riesgo	Comienzo de síntomas	Patología	Estadio (TNM)	Sobrevida sin recidiva/progresión	Sobrevida global	Evolución global
1	77/M	Tabaq.	Icteria y dolor de 4 meses de evolución	Cáncer de páncreas no resecable situado en la porción cefálica, con invasión de la arteria hepática con extensión hacia retroperitoneo	pT3N1M0	1 mes	2 meses	Deceso
2	62/F	Tabaq.	Icteria de 1 mes de evolución	Cáncer de páncreas no resecable situado en la porción cefálica, con invasión del tronco mesentérico-porta.	pT3N1M0	3 meses	8 meses	Deceso

citotoxicidad y se determinó el porcentaje de células viables. En la Figura 3A se detalla la estructura química de la HQ-rutinósido sintetizada enzimáticamente. Luego del tratamiento con HQ-rutinósido por 24 h, observamos que la administración de 15 μM HQ-rutinósido combi-

Figura 2. El mRNA de VMP1 fue evaluado mediante RT-PCR Real Time. Se observó que la expresión de VMP1 es mayor en las líneas celulares primarias (LT1 y LT2) proveniente de tumores pancreáticos. $**p < 0,001$ versus células control HeLa.

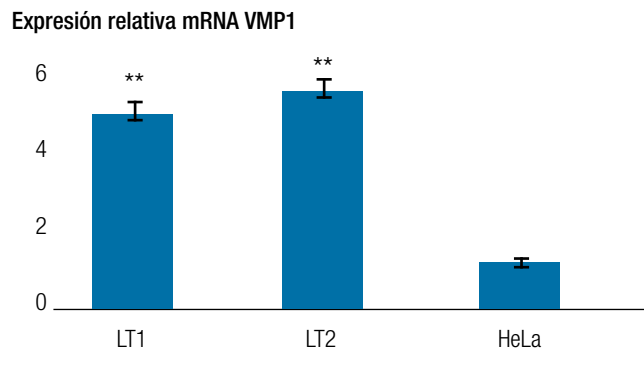
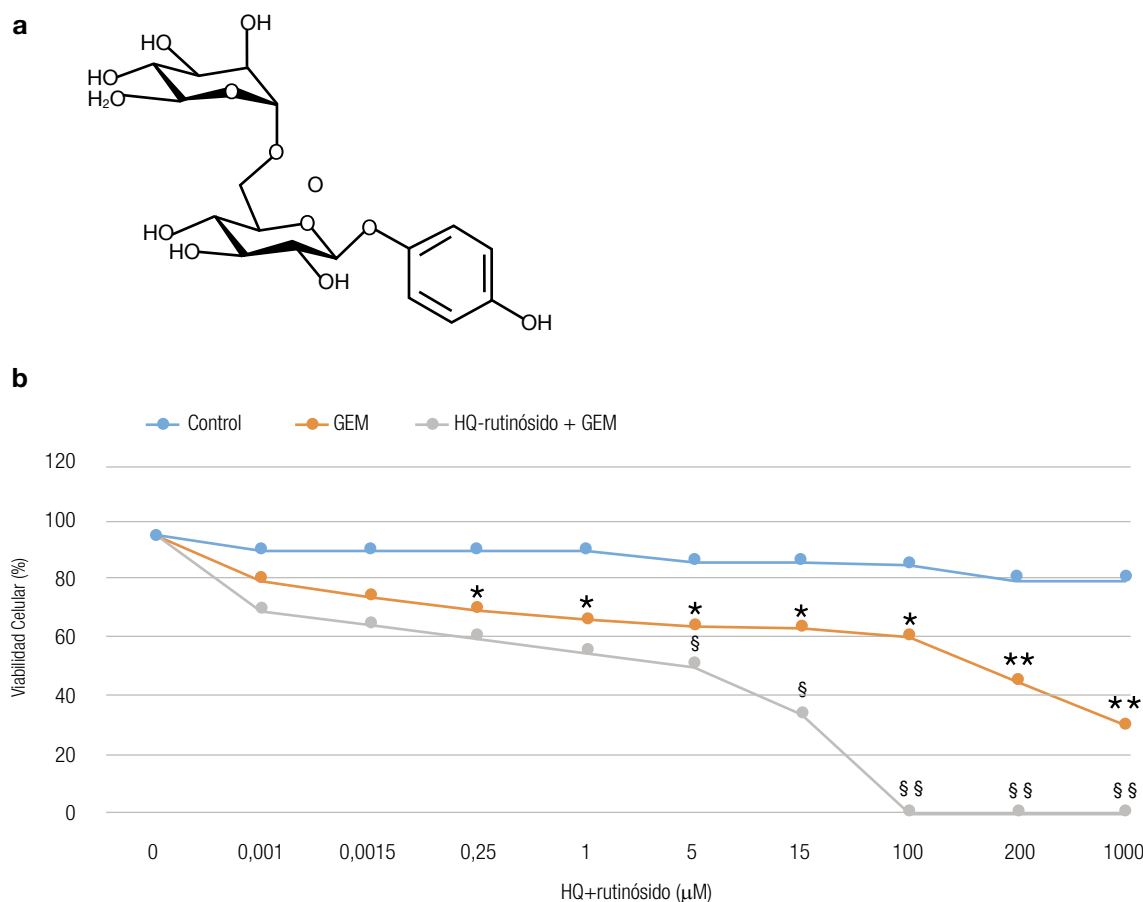


Tabla 2. Secuenciación del estado de Kras de las dos líneas celulares primarias (LT1 y LT2). Se observa que en ambos tumores Kras se encuentra mutado.

Nombre	Morfología celular	Secuenciamiento Kras	Codón	Estado
LT1	Redondeada	G(G>A)TGGC	12	mutado
LT2	Prismática	G(G>A)TGGC	12	mutado

Figura 3. A) Estructura de la HQ-rutinósido sintetizada enzimáticamente. B) Líneas tumorales primarias humanas de PDAC tratadas con diferentes dosis (0 a 1000 μM) de HQ-rutinósido y 200 μM gemcitabina (GEM). Se comparó con células sin tratar (control) y tratadas solo con 200 μM GEM. El porcentaje de viabilidad se obtuvo por absorbancia a 490 nm. Cada punto representa duplicados (\pm SD). $*p < 0,05$; $**p < 0,001$ versus células control; $\$ p < 0,0$, $\$\$ p < 0,001$ vs. tratamiento con GEM.



nado con 10 μM gemcitabina afectó significativamente la sobrevivencia celular comparada con el tratamiento con gemcitabina únicamente. Podemos concluir que el efecto citotóxico de un glicocompuesto como segunda línea de terapia a la gemcitabina mejora significativamente la efectividad del tratamiento contra el PDAC.

Discusión

El cáncer de páncreas es una de las enfermedades más letales en el mundo, y debido a su mal pronóstico se necesita un tratamiento más efectivo. Las causas del PDAC son aún desconocidas, y muchos pacientes con PDAC se encuentran en un estadio avanzado de la enfermedad en el momento de ser diagnosticados. Aun si el tumor es resecado, la recuperación postoperatoria es insatisfactoria, y el pronóstico continúa siendo pobre. La gemcitabina, un nucleósido análogo de base, es el tratamiento que se utiliza en la actualidad para el PDAC. Sin embargo, debido a la alta resistencia a la gemcitabina que presentan las células tumorales pancreáticas, se requiere el descubrimiento de agentes que aumenten la sensibilidad a la droga, buscando mejorar el pronóstico del PDAC.³⁶

Desarrollamos una estrategia en la que biopsias de tumores de páncreas provenientes de 2 pacientes fueron recolectadas y sus células fueron mantenidas en cultivo primario. Este cultivo nos permitió analizar la sensibilidad a la gemcitabina de los dos tumores y ensayar nuevas drogas como segundo tratamiento. Metodológicamente, debe destacarse que fuimos capaces de obtener muestras provenientes de PAAF-EE. Esta estrategia es importante ya que nos permite pensar en aplicaciones clínicas, dado que si se pueden cultivar células a partir de PAAF-EE accedemos a la posibilidad de realizar una biopsia del tumor, estudiar la sensibilidad de las células tumorales a las drogas y de esta manera aplicar un tratamiento personalizado.

Estudiamos además la expresión del RNA del gen VMP1 por RT-PCR, y observamos un aumento de la expresión de este gen en células tumorales pancreáticas. Estudios previos experimentales en que se muestran que la expresión de VMP1 en células tumorales se relaciona con la resistencia tumoral.^{37, 38} Estos datos de expresión aumentada de VMP1 en las células de tumores portando Kras oncogénicos puede sugerir un rol de esta proteína en la resistencia de las células al tratamiento.

Por otro lado, estudiamos la sensibilidad al tratamiento de las células tumorales provenientes de biopsias humanas. Obtuvimos un perfil de resistencia asociada al tratamiento. Observamos que la IC₅₀ de la gemcitabina fue cuando se utilizó 200 μM de droga.³⁹ Notablemente, la IC₅₀ de gemcitabina disminuyó a 5 μM luego del tratamiento con una segunda línea de terapia, como HQ-

rutinosido. Este resultado sugiere que el tratamiento con HQ-rutinosido mejora significativamente la efectividad de la gemcitabina para el tratamiento de PDAC. A pesar de las numerosas investigaciones y los esfuerzos realizados en los últimos años, las estrategias convencionales para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, incluyendo la cirugía, radioterapia, quimioterapia, han tenido un impacto moderado en el pronóstico de los tumores y en especial en los cánceres gastrointestinales. La mayor parte de los medicamentos comercializados presentan la gran desventaja de no tener sistemas que los dirijan al órgano o tejido blanco, de manera que gran parte del fármaco que se mantiene circulante en el torrente sanguíneo incrementa los efectos secundarios causando toxicidad en los pacientes. Una estrategia interesante de direccionamiento la constituyen las moléculas glicosiladas debido a la alta especificidad de la interacción con los carbohidratos y la amplia gama de receptores celulares a los que pueden ser dirigidos de manera específica, permitiendo la administración selectiva de fármacos en los sitios activos deseados.⁴⁰ Por otro lado, la glicosilación de moléculas bioactivas puede modificar su farmacocinética y modular su toxicidad. Se demostró que no solo es importante el número de residuos, sino también el tipo de azúcar que es adicionado para producir efectos sobre la toxicidad, actividad biológica o sobre la solubilidad de la molécula original.⁴¹ Esto resulta de interés, ya que el perfil de sensibilidad puede detectar el porcentaje de células resistentes a las drogas, y por tanto servir como herramienta en la selección de la segunda línea de terapia.

En conclusión, en este trabajo mostramos que es posible realizar cultivos primarios de muestras obtenidas por PAAF-EE. Aunque promisorios, estos resultados demuestran la posibilidad de obtener una muestra en la que podría predecirse la sensibilidad de las células tumorales al tratamiento. Asimismo, el modelo de estudio, utilizando muestras de tejido tumoral humano, nos da la posibilidad de detectar proteínas que servirían como marcadores de resistencia. Finalmente, describimos una segunda línea de terapia promisoriosa para el tratamiento del PDAC a utilizarse en combinación con gemcitabina. Estos resultados sugieren la posible utilización de compuestos glicoconjugados como terapias complementarias contra el cáncer de páncreas.

Agradecimientos. Los autores agradecen a la Revista *Acta Gastroenterológica Latinoamericana*, a su editor en jefe Dr. Horacio Vázquez y al Comité Editorial por el Premio al mejor Proyecto Científico 2016, que permitió iniciar este ambicioso proyecto y publicar los resultados obtenidos hasta el momento.

Conflicto de intereses. Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Financiamiento. Subsidio otorgado en el año 2016 por Acta Gastroenterológica Latinoamericana al mejor proyecto de Investigación en Gastroenterología Clínica o Endoscopia; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Universidad Nacional de La Pampa y Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica de la Argentina.

Referencias

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; 136: E359-E386.
2. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res* 2014; 74: 2913-2921.
3. Yadav D, Lowenfels AB. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology* 2013; 144: 1252-1261.
4. Garrido-Laguna I, Hidalgo M. Pancreatic cancer: from state-of-the-art treatments to promising novel therapies. *Nat Rev Clin Oncol* 2015; 12: 319-334.
5. Hidalgo M. Pancreatic Cancer. *New England Journal of Medicine* 2010; 362: 1605-1617.
6. O'Reilly EM. Refinement of adjuvant therapy for pancreatic cancer. *JAMA* 2010; 304: 1124-1125.
7. Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N. Pancreatic adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2014; 371: 2140-2141.
8. Waddell N, Pajic M, Patch AM, Chang DK, Kassahn KS, Bailey P, Johns AL, Miller D, Nones K, Quek K, Quinn MC, Robertson AJ, Fadlullah MZ, Bruxner TJ, Christ AN, Harliwong I, Idrisoglu S, Manning S, Nourse C, Nourbakhsh E, Wani S, Wilson PJ, Markham E, Cloonan N, Anderson MJ, Fink JL, Holmes O, Kazakoff SH, Leonard C, Newell F, Poudel B, Song S, Taylor D, Waddell N, Wood S, Xu Q, Wu J, Pinese M, Cowley MJ, Lee HC, Jones MD, Nagrial AM, Humphris J, Chantrill LA, Chin V, Steinmann AM, Mawson A, Humphrey ES, Colvin EK, Chou A, Scarlett CJ, Pinho AV, Giry-Laterriere M, Rooman I, Samra JS, Kench JG, Pettitt JA, Merrett ND, Toon C, Epari K, Nguyen NQ, Barbour A, Zeps N, Jamieson NB, Graham JS, Niclou SP, Bjerkvig R, Grützmann R, Aust D, Hruban RH, Maitra A, Iacobuzio-Donahue CA, Wolfgang CL, Morgan RA, Lawlor RT, Corbo V, Bassi C, Falconi M, Zamboni G, Tortora G, Tempero MA; Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative, Gill AJ, Esleman JR, Pilarsky C, Scarpa A, Musgrove EA, Pearson JV, Biankin AV, Grimmond SM. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature* 2015; 518: 495-501.
9. Kroemer G, Jaattela M. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nature Rev Cancer* 2005; 5: 886-897.
10. Codogno P, Meijer AJ. 2005. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ* 12: 1509-1518.
11. Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 2004; 6: 463-477.
12. Choi AM, Ryter SW, Levine B. 2013. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med* 14; 368: 651-662.
13. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Parker M, Schneider MD, Levine B. 2005. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin1-dependent autophagy. *Cell* 2005; 122: 927-939.
14. Ogier-Denis E and Codogno P. 2003. Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochim Biophys Acta* 1603: 113-128.
15. Abedin M, Wang D, McDonnell M, Lehmann U, Kelekar A. 2007. Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage. *Cell Death Differ* 14: 500-510.
16. Galluzzi L, Pietrocola F, Bravo-San Pedro JM, Amaravadi RK, Baehrecke EH, Cecconi F, Codogno P, Debnath J, Gewirtz DA, Karantza V, Kimmelman A, Kumar S, Levine B, Maiuri MC, Martin SJ, Penninger J, Piacentini M, Rubinsztein DC, Simon HU, Simonsen A, Thorburn AM, Velasco G, Ryan KM, Kroemer G. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J* 2015; 34: 856-880.
17. Hidalgo M, Cascinu S, Kleeff J, Labianca R, Löhr JM, Neoptolemos J, Real FX, Van Laethem JL, Heinemann V. Addressing the challenges of pancreatic cancer: Future directions for improving outcomes. *Pancreatol* 2015; 15: 8-18.
18. Ropolo A, Grasso D, Pardo R, Sacchetti ML, Archange C, Lo Re A, Seux M, Nowak J, Gonzalez CD, Iovanna JL, Vaccaro MI. The pancreatitis-induced vacuole membrane protein 1 triggers autophagy in mammalian cells. *J Biol Chem* 2007; 282: 37124-37133.
19. Grasso D, Sacchetti ML, Bruno L, Lo Ré A, Iovanna JL, Gonzalez CD, Vaccaro MI. Autophagy and VMP1 expression are early cellular events in experimental diabetes. *Pancreatol* 2009; 9: 81-88.
20. Guardia T, Rotelli AE, Juarez AO, Pelzer LE. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Farmacol* 2001; 56: 683-687.
21. Grdina DJ, Murley JS, Kataoka Y. Radioprotectants: current status and new directions. *Oncology* 2002; 63: 2-10.
22. Weiss JF, Landauer MR. Protection against ionizing radiation by antioxidant nutrients and phytochemicals. *Toxicology* 2003; 189: 1-20.
23. Arora R, Gupta D, Chawla R, Sagar R, Sharma A, Kumar R, Prasad J, Singh S, Samanta N, Sharma RK. Radioprotection by plant products: present status and future prospects. *Phytother Res* 2005; 19: 1-22.
24. Javed H, Khan MM, Ahmad A, Vaibhav K, Ahmad ME, Khan A, Ashafaq M, Islam F, Siddiqui MS, Saffi MM, Islam F. Rutin prevents cognitive impairments by ameliorating oxidative stress and neuroinflammation in rat model of sporadic dementia of Alzheimer type. *Neuroscience* 2012; 210: 340-352.
25. Quercetin and rutin prevent scopolamine-induced memory impairment in zebrafish. Richetti SK, Blank M, Capiotti KM, Piatto AL, Bogo MR, Vianna MR, Bonan CD. *Behav Brain Res* 2011; 217: 10-15.
26. Nassiri-Asl M, Mortazavi SR, Samiee-Rad F, Zangivand AA, Safdari F, Saroukhani S, Abbasi E. The effects of rutin on the development of pentylenetetrazole kindling and memory retrieval in rats. *Epilepsy Behav* 2010; 18: 50-53.
27. Mellou F, Lazari D, Skaltsa H, Tselepis AD, Kolisis FN, Stamatias H. Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity. *J Biotechnol* 2005; 116: 295-304.
28. Trumbeckaite S, Bernatoniene J, Majiene D, Jakstas V, Savickas A, Toleikis A. The effect of flavonoids on rat heart mitochondrial function. *Biomed Pharmacother* 2006; 60: 245-248.
29. Schwedhelm E, Maas R, Troost R, Böger RH. Clinical pharmacokinetics of antioxidants and their impact on systemic oxidative stress. *Clin Pharmacokinet* 2003; 42: 437-459.

30. Janbaz KH, Saeed SA, Gilani AH. Protective effect of rutin on paracetamol- and CCl₄-induced hepatotoxicity in rodents. *Fito-terapia* 2002; 73: 557-563.
31. La Casa C, Villegas I, Alarcón de la Lastra C, Motilva V, Martín Calero MJ. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *J Ethnopharmacol* 2000; 71: 45-53.
32. Danby PM, Withers SG. Advances in Enzymatic Glycoside Synthesis. *ACS Chem. Biol.* 2016; 11 (7): 1784-1794.
33. Bissaro B, Monsan P, Fauré R, O'Donohue MJ. Glycosynthesis in a waterworld: new insight into the molecular basis of transglycosylation in retaining glycoside hydrolases. 2015 Apr 1; 467 (1): 17-35.
34. Mazzaferro L, Piñuel L, Erra-Balsells R, Giudicessi SL, Breccia JD. Transglycosylation specificity of *Acremonium* sp. α -rhamnosyl- β -glucosidase and its application to the synthesis of the new fluorogenic substrate 4-methylumbelliferyl-rutinoside. *Carbohydr Res* 2012; 347: 69-75.
35. Minig M, Mazzaferro LS, Erra-Balsells R, Petroselli G, Breccia JD. α -Rhamnosyl- β -glucosidase Catalyzed Reactions for Analysis and Biotransformations of Plant-Based Foods. *J Agric Food Chem* 2011; 59: 11238-11243.
36. Calvaresia EC, Paul J. Hergenrother. Glucose conjugation for the specific targeting and treatment of cancer. *Chem Sci* 2013; 4: 2319-2333.
37. Rodríguez ME, Catrinacio C, Ropolo A, Rivarola VA, Vaccaro MI. A novel HIF-1 α /VMP1-autophagic pathway induces resistance to photodynamic therapy in colon cancer cells. *Photochem Photobiol Sci.* 2017 Nov 8; 16 (11): 1631-1642. doi: 10.1039/c7pp00161d.
38. Gilabert M, Vaccaro MI, Fernández-Zapico ME, Calvo EL, Turriani O, Secq V, García S, Moutardier V, Lomberk G, Dusetti N, Urrutia R, Iovanna JL. Novel role of VMP1 as modifier of the pancreatic tumor cell response to chemotherapeutic drugs. *J Cell Physiol* 2013; 228: 1834-1843.
39. Gemcitabine induces the VMP1-mediated autophagy pathway to promote apoptotic death in human pancreatic cancer cells. Pardo R, Lo Ré A, Archange C, Ropolo A, Papademetrio DL, González CD, Álvarez EM, Iovanna JL, Vaccaro MI. *Pancreatology* 2010; 10 (1): 19-26.
40. Garnier P, Wang XT, Robinson MA, Kasteren S, Perkins AC, Frier M, Fairbanks AJ, Davis BG. Lectin-directed enzyme activated prodrug therapy (LEAPT): Synthesis and evaluation of rhamnose-capped prodrugs. *J Drug Target* 2010; 18: 794-802.
41. Kim HJ, Kang SH, Choi SS, Kim ES. Redesign of antifungal polyene glycosylation: engineered biosynthesis of disaccharide-modified NPP. *App Microbiol Biotechnol* 2017; 101: 5131-5137.

Antitumoral effects of glycoconjugates on primary cultures of human pancreatic cancer cells obtained by echoendoscopy

María Inés Molejon,^{1,2} Gisela Weiz,¹ Juan Ignacio Tellechea,³ Javier Breccia,¹ María Inés Vaccaro²

¹ INCITAP-CONICET (Institute of Earth and Environmental Sciences of La Pampa - National Scientific and Technical Research Council), Department of Chemistry, Faculty of Exact and Natural Sciences, National University of La Pampa. Santa Rosa, La Pampa.

² IBIMOL-CONICET (Institute of Biochemistry and Molecular Medicine - National Scientific and Technical Research Council), Department of Pathophysiology, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Buenos Aires. Autonomous City of Buenos Aires.

³ Institución Médica Profensa. Santa Rosa, La Pampa. Argentina.

Acta Gastroenterol Latinoam 2019;49(3):208-221

Recibido: 14/11/2018 / Aceptado: 19/02/2019 / Publicado online: 17/09/2019

Summary

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), which constitutes 90% of pancreatic cancers, is the fourth leading cause of cancer-related deaths in the world. PDAC belongs to one of the most chemo resistant cancers, in part due to its molecular and genetics features. Currently, available therapeutic options are surgery, radiation, chemotherapy, and immunotherapy. Most of the available treatments are palliative, with the objective of relieving disease-related symptoms. Our aim was to evaluate the antitumoral effect as a second line therapy, of enzymatically glycosylated compounds, hydroquinone-rutinoside, on primary pancreatic tumoral cells. We found that glycoconjugates combined with antitumor agents,

such as gemcitabine, improved single-treatment effects. These findings suggest that emerging trends towards glycoconjugates could be a promising approach for cancer therapies.

Key words. Pancreatic adenocarcinoma, hydroquinone, vacuole-membrane protein 1, fine needle aspirate, biopsy.

Abbreviations

PDAC: Pancreatic ductal adenocarcinoma.

HQ: Hydroquinone.

VMP1: Vacuole-membrane protein 1.

FNA: Fine-needle aspiration biopsy.

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) involves the 90% of pancreatic tumors. PDAC is one of the deadliest cancers worldwide, with an estimation of 367.000 new cases worldwide during 2015, and with 359.000 deaths in the same year.¹ Nowadays pancreatic cancer constitutes the fourth leading cause of cancer in developing countries, however, if there are no improvement in the therapies, the disease will be the second cause of death in the next decade.² The reason of this prognostic is due, in part, to the characteristic stromal composition of these cells, which acts as a mechanical barrier, and the subsequent reduced vascularization of the cellular environment, both of which, interfere with the ability of drugs to reach the target cells.³ Furthermore, biological, molecular

Correspondencia: María I Vaccaro
Junín 954 (C1113AAD). Ciudad Autónoma de Buenos Aires,
Argentina / Tel.: +5411 4964 8268
Correo electrónico: mvaccaro@ffyb.uba.ar

and genetic features of pancreatic cancer cells, which impair drug entry into the cells, or affect cellular metabolism, may increase the chemo-resistance of PDAC. Thus, although surgical resection has shown survival rates of up to 40%, 85% of patients with PDAC are not eligible for surgery. Of the 15% who undergo surgery, 85% present with tumor relapse.⁴⁻⁸

Autophagy is an evolutionarily preserved degradation process of cytoplasmic cellular constituents, which serves as a survival mechanism in starving cells. Autophagy is characterized by the sequestration of bulk cytoplasm and organelles in double - membrane vesicles called autophagosomes, which eventually acquire lysosomal-like features completing the autophagy flow with the degradation of the sequester material.^{9, 10} Autophagy plays important physiological roles in human health and disease. This catabolic process is involved in the turnover of long-lived proteins and the elimination of damage/old organelles, thus maintains quality control of essential cellular components. In addition to its role in cellular homeostasis, a cytoprotective role is playing when cells encounter environmental stresses such as nutrient starvation, hypoxia, oxidative stress, pathogen infection, radiation or anticancer drug treatment, the level of autophagy can be dramatically augmented resulting in adaptation and survival.^{11, 12} The role of the autophagic process in human health and disease has been described as a double-edge sword.¹³ This decision depends on the carcinogenesis status, cell-tissue context, molecular characteristics of the target and nature of the stress.¹⁴⁻¹⁶ Yang and coworkers have demonstrated that autophagy is constitutively activated in tumors bearing the KRAS mutation. KRAS is involved in almost all pancreatic cancers, including the three preneoplastic lesions: PanINs, *pancreatic intraepithelial neoplasias*, papillary mucinoses neoplasias and quistic mucinoses neoplasia.¹⁷

The genetic or pharmacological inactivation of autophagy prevents KRAS-mediated tumorigenesis. We have previously shown that KRAS induces the expression of VMP1 (vacuole membrane protein 1) in pancreatic cancer cells. VMP1 is expressed early during numerous pathologies, including diabetes *mellitus*, inflammatory processes of the pancreas (pancreatitis) and pancreatic cancer.^{18, 19}

Flavonoids are phenolic compounds with a benzopyronic functional group.²⁰ Hesperidin (hesperetin 7-O-rutinoside), which is found in plants of the citrus genus, is composed of the aglycone hesperetin and the disaccharide rutinose (6-O- α -L- rhamnopyranosyl- β -D-glucopyranose).²¹⁻²³ It has been shown to have pharmacological activities, including antioxidant, vasoprotective, and antineoplastic effects.²⁴⁻³¹

The enzymatic synthesis of glycosidic bonds has been studied for more than 60 years and different strategies have been developed to avoid or complement the chemical synthesis, which generally requires multiple stages of protection and desprotection to obtain the desired oligosaccharides.³² In nature, glycoside transferases (GTs) are the main catalysts for the synthesis of glycosidic bonds. However, due to difficulties in its expression and purification, combined with the high economic cost to obtain it, its applications are restricted. An alternative is to use glycoside hydrolases (GHs) enzymes as catalysts for glycosidic bonds, since they are more abundant, easier to obtain, and have a wide range of specificity, as well as being more economical.³³

In our laboratory, a GH was isolated and characterized, called 6-O- α -rhamnosyl-glucoisidase from the fungus *Acremonium* sp. DSM 24697. This enzyme is capable of transferring the rutin disaccharide, from hesperidin, to various hydroxylated receptors, such as hydroquinone.³⁴⁻³⁵ In this work we aimed to evaluate the effect of the hydroquinone-rutinoside on primary pancreatic tumor cells.

Methods

Tumoral Samples

The protocols to be used to obtain tumor samples, the inclusion and exclusion criteria of patients in the study, and the statistical models were approved by the Ethics and Independent Patagonic Research Committee (Ceip). The tumor samples were obtained from FNA (Fine-needle aspiration biopsy) guided by echoendoscopy (EE) from patients diagnosed with pancreatic cancer without having received treatment prior to the puncture. This project was approved by the Independent Patagonian Ethics Committee.

Criteria for choosing patients

Inclusion criteria: patients older than 18 years with suspicion of tumor or diagnosis that lead to a surgical procedure or endoscopic ultrasound.

Exclusion criteria: any person in an emergency situation, or an adult subject to a legal protection measure or any person incapable of giving their consent, or a final diagnosis other than PDAC.

The study of the pancreas was performed with a linear echoendoscope (UCT-140 AL5, Olympus, Tokyo, Japan). Tumor lesions were punctured with 22 Gauge needles (EchoTip, Wilson Cook, Winston Salem, NC, USA) (Expect, Boston Scientific, Burlington, MA, USA). Applying the fanning technique after removing the stylet and applying suction by attaching a syringe (20 cc with negative pressure), the needle under vacuum made at least

20 passages inside the lesion. The needle was removed and the stylet was reintroduced, the first protruded material was placed on glass holders and fixed in 96% alcohol (cytology). Then with a syringe with physiological solution, the aspirated material was recovered in a tube with preservation fluid (BD CytoRich Red Preservative, destined for cell culture). Another puncture was performed repeating the same steps; some samples were recovered, fixed in 10% Formol and sent for pathological anatomy study.

Cell culture

Within a safety culture room, the tumor samples were treated as follows: Centrifugation of the piece at 1200 rpm/7 minutes at room temperature (R/T). The pellet obtained was then resuspended in 3 mL of collagenase (1 mg/ml) (Sigma) and incubated at 37°C in a water bath. After 10' of incubation, the samples were centrifuged at 700 rpm 4' at R/T. The cell pellet was resuspended in 5ml of lysis plug for red blood cells (1 x RBC Lysis Buffer, eBiosciences). They were gently shaken 5' and centrifuged at 700 rpm 4' R/T. Finally, the pellet was resuspended in DMEM F10 medium (Invitrogen) in a plate previously covered with an extracellular matrix. Incubate the cells at 37°C in an environment with 5% CO₂.

Each primary culture was maintained in complete culture medium until the appearance of confluence, which varied from 15 days to 30 days, depending on the tumor. When the cells reached 70% confluence, they were treated with alphazime (PAA Laboratories) for 20'.

Histology

The tumor samples were embedded in 4% paraffin and stained with hematoxylin and eosin (H&E) and analyzed with a Nikon E200 trinocular Microscope attached to a digital camera.

RNA extraction and purification

RNA extraction from cell cultures was carried out with Trizol reagent (Invitrogen). The cells were grown in a 6-multiwell and then the desired treatment was performed. For purification of the RNA the cells were washed with PBS, 1 ml of Trizol was added per well and pipetted to lift the cells. The content of each well was then passed to a 1.5 ml tube, where 0.2 ml of chloroform was added. Next, it was centrifuged at 12,000 xg for 15 minutes at 4°C. The aqueous phase was transferred to a new tube where 0.5 ml of isopropanol was added. It was left incubating 10 min and then centrifuged at 12000 xg for 10 min at 4°C. The RNA pellet obtained after the centrifugation was washed with 75% ethanol, centrifuged again and suspended in water. The RNA concentrations were determined by measuring the absorbance at 260 nm. To check its quality, an agarose gel run was performed and visualized by Etidio Bromide staining.

RT-PCR and Real-Time RT-PCR

2 µg of the purified RNA was used and treated with 1 µl of RNase-free DNase I (Invitrogen) in a final volume of 10 µl containing 1X RNase buffer. It was incubated for 15 minutes at R/T and then incubated at 65°C for 10 minutes. Next, 10 µl of DNase treatment was incubated with 100 nM random primers (N6) at 70°C for 5 minutes. Following, the mixture of RNA plus random primers was used and 1 mM dNTPs and 1 µl of reverse transcriptase enzyme MMLV (Promega) were added in a final volume of 20 µl containing 1X MMLV buffer. The mixture was incubated at 25°C for 5 minutes and then at 37°C for 1 hour. For the PCR reaction, 0.5 µl of RT reaction was used in a mix with 200 µM dNTPs, 4 mM MgCl₂, 200 nM of first Forward and Reverse and 1 µl of Go Taq enzyme (Promega) in a volume of 25 µl containing Go Taq 1X buffer. The conditions of the PCR and the primers used were developed in the Physiopathology subsector of the IBIMOL.

Synthesis of Compounds

Hydroquinone (HQ) (benzene-1,4-diol) was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). HQ-rutinoside was synthesized enzymatically at 30°C using 50 mM sodium phosphate buffer pH 6. The reaction mixture contained: 1.8 mM of hesperidin, 1.8 mM of HQ, 0.02 U ml⁻¹ of 6-O- α -rhamnosyl- β -glucosidase, and 2% v/v of DMSO. The reaction was finished in a boiling water bath at 100°C for 10 minutes. The products of the reaction were purified using the Sephadex LH20 column (1.5 × 150 cm; flow 0.1 ml min⁻¹). The transglycosylation product was identified by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) as 4-hydroxyphenyl β -rutinoside (HQ-rutinoside).

Chemograms

Chemosensitivity was evaluated by performing cell proliferation curves. 5 × 10³ cells per well were plated in a 96-well multiplate in SFDM. 24 hours later the medium was supplemented with 200 M Gemcitabine (Lilly), and incubated for 4 hours. Then, increasing doses (0 to 1000 µM) of HQ-rutinoside were added and after 24 hours the cytotoxicity was evaluated. Each experiment was performed in duplicate. Cell proliferation was estimated after incubation with the Presto Blue agent (Life Technologies) for 3 hours, according to the manufacture protocol.

Statistical analysis

The data were expressed as the mean ± ES (standard error). A factorial analysis of variance (ANOVA) was performed to compare the samples. The differences were considered significant when **p* < 0.05; ***p* < 0.01 vs. control or § *p* < 0.05; §§ *p* < 0.001 vs. GEM.

Results

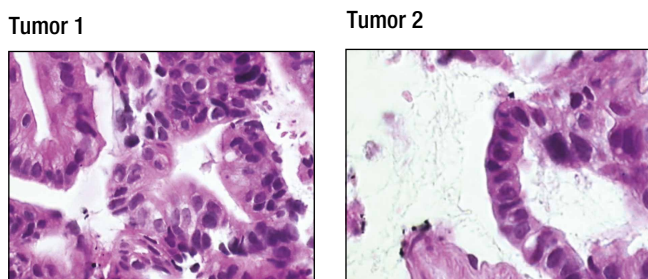
Clinic-pathological data of patients

Table 1 shows the characteristics of the patients and the evolution of the tumor. Figure 1 shows the histology of the tumors. Tumor 1 presented a glandular differentiation and some tubular forms. In the picture of tumor 2 we observed a desmoplastic stroma and glandular formations.

Establishment of pancreatic tumor lines

In order to corroborate the tumorigenicity of the primary cell lines, we performed the characterization of the KRAS mutational state by PCR. PCR results were followed by DNA sequencing. It has been previously published, that the KRAS mutation is present in 75-95% of pancreatic adenocarcinomas. The cell lines studied carried the Kras mutation, on chromosome 12, exon 1 at the level of codons 12 (most frequent mutation). The mutated forms contain GAT (aspartic acid) and GTT

Figure 1. Hematoxylin-Eosin staining of the tumors obtained by Echoendoscopy. (A) Tumor 1; (B) Tumor 2; (HE, 1000X).



(valine) (Table 2). The presence of these mutations in the established cell lines indicates the epithelial origin of a pancreatic tumor process.

Expression of VMP1 in the tumor lines

The presence of VMP1, a protein involved in the early stages of the autophagy process in established cell lines, has been described. VMP1 is a stress protein, which is over expressed after subjecting the cells to stress such as pancreatitis or pancreatic cancer.

In order to evaluate the expression of VMP1 in the established cell lines from human samples, the expression of the mRNA of VMP1 in the tumor lines was determined and compared with the expression in HeLa cells by Real Time RT-PCR. The mRNA levels of VMP1 were relativized to the β -actin mRNA. The results showed that the basal expression of VMP1 mRNA of pancreatic tumor cells was significantly higher than that of HeLa cells (Figure 2). These results suggested that the primary pancreatic cancer cells could present higher levels of autophagy, indicated by a higher expression of the VMP1 protein.

Evaluation of chemo sensitivity of tumor lines

The sensitivity of primary pancreatic cancer cells to gemcitabine therapy was analyzed. The primary cell lines were treated with 200 μ M of gemcitabine. After 4 hours, 0 to 1000 μ M of HQ-rutinoside were added and at 24 hours the cytotoxicity was evaluated and the percentage of viable cells was determined. Figure 3A shows the chemical structure of enzymatically synthesized HQ-rutinoside. After treatment with HQ-rutinoside for 24 hours, we observed that the administration of 15 μ M HQ-ruti-

Table 1. Clinical history and clinical-pathology characteristics of the patients.

Tumor	Age (years) /Sex	Risk factors	Early symptoms	Pathology	Tumor Stage (TNM)	Survival without recurrence/ progression	Global Survival	Global Evolution
1	77/M	Tabaq.	Jaundice and pain 4 months of evolution	Pancreatic cancer, not resectable; Located in the cephalic portion, with invasion of the hepatic artery and extension towards retroperitoneum.	pT3N1M0	1 month	2 months	Death
2	62/F	Tabaq.	Jaundice and pain of 1 month of evolution	Pancreatic cancer, not resectable; Located in the cephalic portion, with invasion of the trunk Mesenteric-porta.	pT3N1M0	3 months	8 months	Death

Table 2. Sequencing of the *Kras* mutational state of the two primary cell lines (LT1 and LT2). It is observed that in both tumors *Kras* is mutated.

Name	Cellular Morphology	<i>Kras</i>	Codon	State
LT1	Rounded-Spherical	G(G>A)TGGC	12	mutated
LT2	Prismatic	G(G>A)TGGC	12	mutated

noside combined with 200 μM gemcitabine significantly affected cell survival compared to treatment with gemcitabine alone. We can conclude that the cytotoxic effect of a glycocompound as the second line of therapy to gemcitabine, significantly improves the effectiveness of the treatment against PDAC.

Figure 2. *VMP1* mRNA was measured by RT-PCR Real Time. It was observed that expression of *VMP1* is higher in the primary cell lines (LT1 and LT2) from pancreatic tumors. ** $p < 0.001$ versus HeLa control cells.

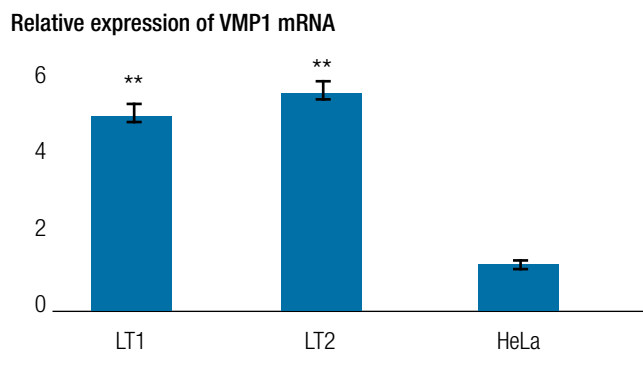
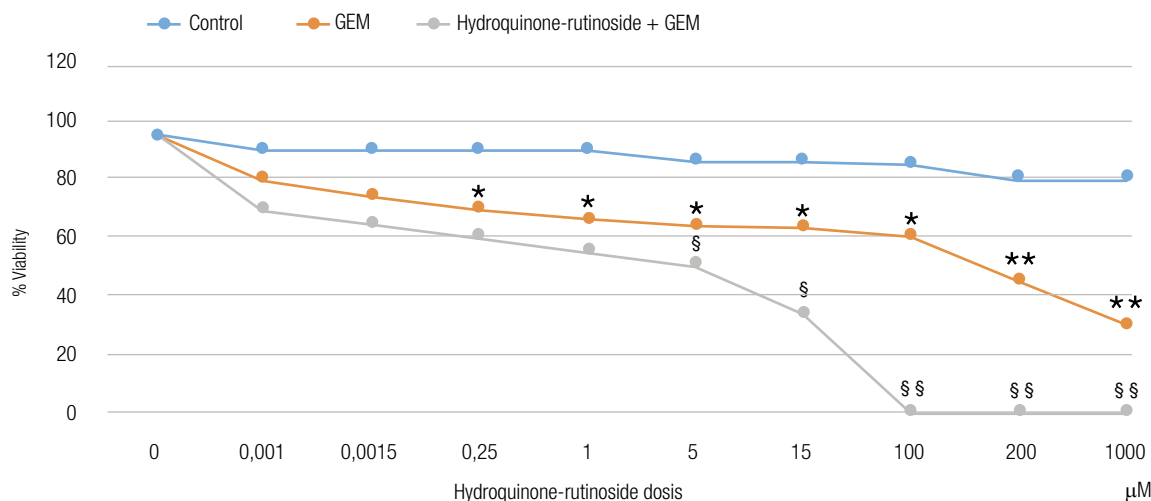


Figure 3. Primary tumor cell lines were treated with 200 μM Gemcitabine (GEM) alone or combined with increased doses (0 to 1000 μM) of Hydroquinone-rutinoside. It was compared with untreated cells (control). The viability percentage was obtained by absorbance at 490 nm. Each point represents duplicates (± SD). * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$ versus control cells; § $p < 0.0$, §§ $p < 0.001$ vs. treatment with GEM.



Discussion

Pancreatic cancer is one of the most lethal diseases in the world, and due to its poor prognosis, more effective treatments are needed. The causes of PDAC are still unknown, and many patients with PDAC are at an advanced stage of the disease at the time of diagnosis. Even if the tumor is resected, the postoperative recovery is unsatisfactory, and the prognosis continues to be poor. Gemcitabine, a base analogue nucleoside, is the currently treatment for PDAC. However, due to the high resistance to gemcitabine presented by pancreatic tumor cells, the

discovery of agents that increase sensitivity to the drug is required, seeking to improve the PDAC prognosis.³⁶

We developed a strategy in which biopsies of pancreatic tumors from 2 patients were collected and their cells were maintained culture. This culture allowed us to analyze the sensitivity to gemcitabine of the two tumors and to test new drugs as a second treatment. Methodologically, it should be noted that we were able to obtain samples from FNAP-EE. This strategy is important since it allows us to think about clinical applications, if we can grow cells from FNAP-EE we have access to the possibility of performing a tumor biopsy,

studying the sensitivity of tumor cells to drugs and in this way apply a personalized treatment.

We also studied the expression of the RNA of the VMP1 gene by RT-PCR. We observed an increase in the expression of this gene in pancreatic tumor cells. Previous experimental studies showing that the expression of VMP1 in tumor cells is related to tumor resistance.^{37, 38} These data of increased expression of VMP1 in tumor cells bearing oncogenic Kras may suggest a role for this protein in resistance from the cells to the treatment.

On the other hand, we studied the sensitivity of tumor cells from human biopsies to treatment. We obtained a resistance profile associated with the treatment. We observed that the IC₅₀ of gemcitabine was when 200 μM of drug was used.³⁹ Notably, the IC₅₀ of gemcitabine decreased to 5 μM after treatment with a second line of therapy, such as HQ-rutinoside. This result suggests that treatment with HQ-rutinoside significantly improves the effectiveness of gemcitabine for the treatment of PDAC. Despite the numerous investigations and efforts made in recent years, conventional strategies for the treatment of various types of cancer, including surgery, radiotherapy, chemotherapy, have had a moderate impact on the prognosis of tumors and especially on gastrointestinal cancers. Most commercial drugs have the great disadvantage of not having systems that direct them to the target organ or tissue, so much of the drug that remains circulating in the bloodstream increases side effects causing toxicity in patients. An interesting targeting strategy is the glycosylation of molecules due to the high specificity of the interaction with carbohydrates and the wide range of cellular receptors to which they can be specifically directed, allowing the selective administration of drugs to the desired active sites.⁴⁰ On the other hand, the glycosylation of bioactive molecules can modify their pharmacokinetics and modulate their toxicity. It was shown that not only the number of residues is important, but also the type of sugar that is

added to produce effects on the toxicity, biological activity or on the solubility of the original molecule.⁴¹ This is of interest, since the profile of sensitivity can detect the percentage of drug resistant cells, and therefore serve as a tool in the selection of the second line of therapy.

In conclusion, in this work we show that it is possible to perform primary cultures of samples obtained by FNAB-EE. Although, promising these results demonstrate the possibility of obtaining a sample in which the sensitivity of the tumor cells to the treatment could be predicted. Also, the study model, using samples of human tumor tissue, gives us the possibility of detecting proteins that would serve as resistance markers. Finally, we describe a second line of promising therapy for the treatment of PDAC to be used in combination with gemcitabine. These results suggest the possible use of glycoconjugate compounds as complementary therapies against pancreatic cancer.

Acknowledgments. *The authors are grateful to the journal Acta Gastroenterológica Latinoamericana, its Editor-in-Chief Dr. Horacio Vázquez and the Editorial Committee for the Prize for the Best Scientific Project 2016, which made possible to start this ambitious project and publish the results obtained so far.*

Conflict of Interest. *The authors have declared that no conflict of interest exists.*

Fundings. *This work was supported by Acta Gastroenterológica Latinoamericana, award to the best Investigation Project 2016 in Clinical Gastroenterology or Endoscopy; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Universidad Nacional de La Pampa and Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica of Argentina.*

References

- On page 214.