

# Uso de compuestos derivados del resveratrol para el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad

Ana Cristina Almansa García, Helena Lucena Padós (1), Adoración Montero Sánchez (1), Francisco Javier Díaz Corrales (1)  
(1)Department of Cell Therapy and Regenerative Medicine/ CABIMER (Andalusian Molecular Biology and Regenerative Medicine Centre). Américo Vespucio 24 Avenue. 41092-Seville, Spain

## Introducción

La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) es una enfermedad multifactorial causada por la combinación de efectos de variantes genéticas y los factores ambientales y de estilo de vida. Está caracterizada por la acumulación de depósitos llamados drusas entre el epitelio pigmentario de la retina (RPE) y la membrana de Bruch. En las etapas iniciales de la enfermedad la función visual no se altera en gran medida pero, a medida que la enfermedad progresa, se pueden dar dos casos: o bien se produce la degeneración gradual del RPE y la constricción de los vasos sanguíneos coroidales, lo que se conoce como DMAE seca, o bien se produce la infiltración de vasos sanguíneos desde el corioide hacia la retina, los cuales pueden romperse con facilidad y producir sangrado, lo que se conoce como DMAE húmeda [1].

Hoy en día, la DMAE no tiene un tratamiento efectivo, siendo la principal causa de ceguera de la población adulta a nivel mundial. Se espera que esta condición afecte a unos doscientos ochenta y ocho millones de personas, aproximadamente para 2040 [2].

El resveratrol ha demostrado poseer efectos neuroprotectores en otras patologías oftalmológicas, como la retinopatía diabética y aunque el mecanismo de acción no se conoce con certeza, probablemente ejerza su acción protectora mediante la regulación positiva de la expresión de la proteína sirtuina 1 (Sirt1) [3].

Sirt1 es una deacetilasa dependiente de nicotinamida-adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>) asociada a varios procesos fisiológicos como el estrés oxidativo, el metabolismo de la glucosa, la estabilidad del ADN o el envejecimiento [4]. Se ha comprobado que, en pacientes con retinopatía diabética, el aumento de la expresión de Sirt1 mediante el tratamiento con resveratrol es capaz de disminuir los niveles de factores proinflamatorios como IL-17 [5], lo que podría suponer una nueva línea de tratamiento para esta y otras enfermedades como la DMAE.

El propósito de este trabajo es testar algunas moléculas derivadas del resveratrol para comprobar la ausencia de efectos tóxicos y ver, en consiguientes investigaciones, si, efectivamente, poseen un efecto de sobreexpresión sobre Sirt1 y, por tanto, un efecto protector ante la progresión de la DMAE.

## Materiales y métodos

### Compuestos y cultivo celular

Los compuestos derivados del resveratrol: JC21, ERB109 y MMM24 han sido sintetizados en el Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra de Granada y han sido diluidos en una solución de PBS al 10% de DMSO. Se ha empleado la línea celular ARPE-19. Como medio de cultivo se ha usado el medio DMEM con F-12 (Sigma-Aldrich Corp. Ref: D6421) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, con L-glutamina al 1% y con penicilina/streptomina (1:1) al 1%.

### Estudio de citotoxicidad

Para estudiar los posibles efectos tóxicos de los compuestos RSV, JC21, ERB109 Y MMM24, se han sembrado las células en una placa blanca de 96 pocillos a una confluencia de 2500 células/pocillo. Para medir la viabilidad celular se ha utilizado el kit RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay (Promega). Se incubaron las células junto con los compuestos a concentraciones de 10µM, 25µM, 50µM, 100µM, 250µM y 500µM, y junto al RealTime-Glo™ reagent 2X. Se midió la luminiscencia a las 1, 6, 12, 24, 48 y 72 horas de incubación.

### Análisis del ciclo celular

Para determinar si los compuestos estudiados eran capaces de provocar una desregulación o arresto del ciclo celular, se han incubado las células ARPE-19 con los distintos compuestos a una concentración de 50µM durante 48h. Las células se han fijado con etanol al 70% en frío durante 5 min y se han teñido con una solución de yoduro de propidio (PI) (100µg/mL Rnasa, 40µg/mL PI, PBS 1X) durante 30 min a 37°C en oscuridad. El análisis de ciclo se ha realizado utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur.

### Inmunofluorescencia

Para comprobar mediante inmunofluorescencia el efecto del resveratrol sobre la mitosis, se fijaron las células crecidas sobre lamelas de cristal con paraformaldehído (PFA) al 4%, y se permeabilizaron durante 10 min con TPBS (0,2% de Tritón 100X en PBS). Se bloquearon durante 1h a tª ambiente con suero de burro al 2% en TPBS y se incubaron durante 1h con el anticuerpo primario anti-Tubulina acetilada mouse monoclonal diluido 1:1000 en la solución de bloqueo. Las lamelas se incubaron durante 45 min a tª ambiente con el anticuerpo secundario donkey anti-mouse 594 diluido 1:500 en la solución de bloqueo y se montaron con medio de montaje Vectashield con DAPI para marcar los núcleos celulares.

## Resultados

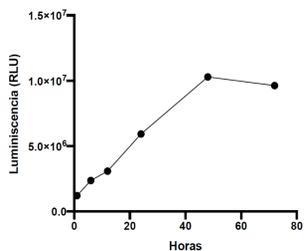


Figura 1. Calibración luminométrica del kit RealTime-Glo™ para establecer la curva normal de luminiscencia de las células ARPE-19 hasta las 72h.

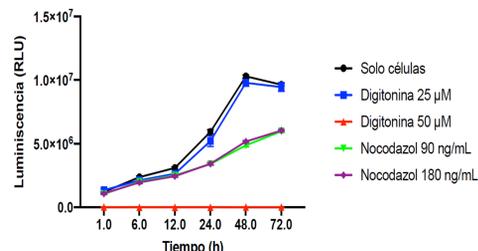


Figura 2. Citotoxicidad de las células ARPE-19 tras el tratamiento con digitonina y nocodazol, a distintas dosis y hasta 72h, para determinar el control de inhibición más adecuado para el estudio.

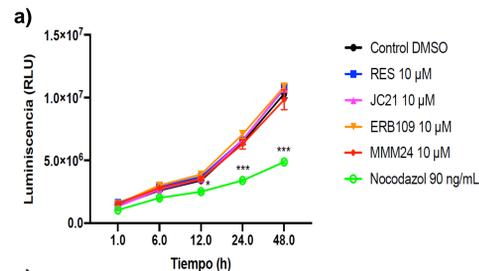


Figura 3. Viabilidad celular a distintos tiempos de incubación con RES, JC21, ERB109 y MMM24 a dosis de 10µM (a), 50µM (b), 100µM (c) y 500µM (d). Como control positivo de citotoxicidad se ha utilizado nocodazol a una dosis de 90 ng/mL. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

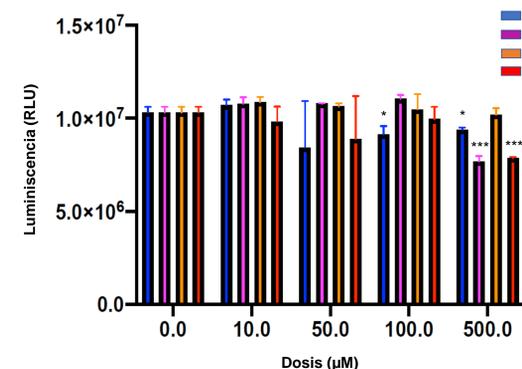
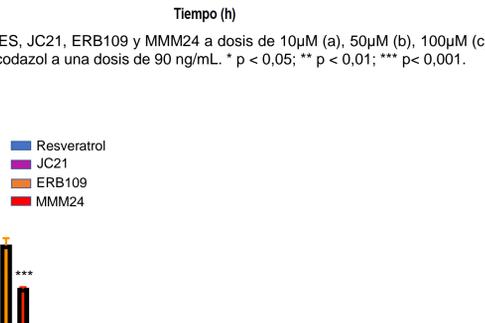
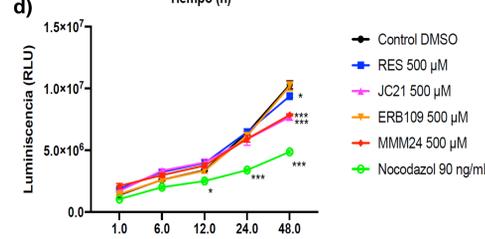
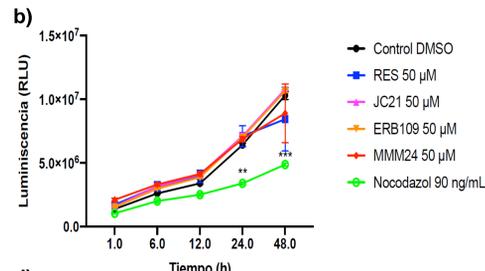


Figura 4. Cambios en la viabilidad celular con respecto al control (dosis 0) tras la incubación durante 48h con distintas dosis de RES, JC21, ERB109 y MMM24. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

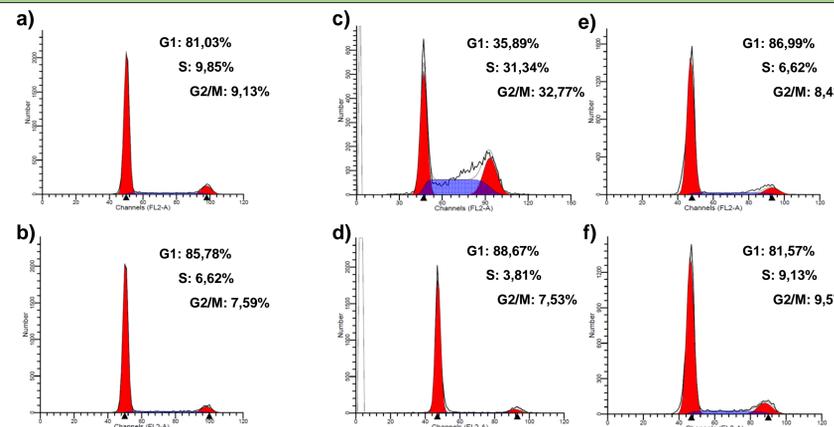


Figura 5. Análisis, mediante citometría de flujo, de la distribución en las distintas fases del ciclo celular de las muestras de células ARPE-19 incubadas 48h sin nada (control) (a), con 0,05% de DMSO (control vehículo) (b), resveratrol (c), ERB109 (d), JC21 (e) y MMM24 (f).

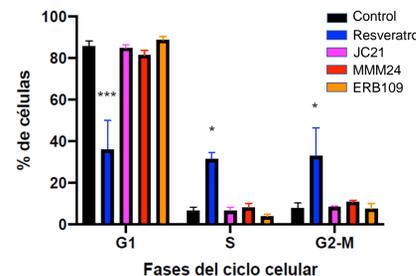


Figura 6. Porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular tras 48h de incubación con DMSO al 0,05% (control vehículo), resveratrol, JC21, ERB109 y MMM24. \* p < 0,05; \*\*\* p < 0,001.

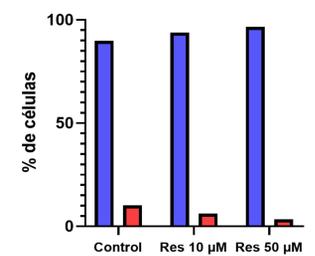


Figura 7. Porcentaje de células en interfase y mitosis, observadas tras 48h de incubación con 10 µM y 50 µM de resveratrol.

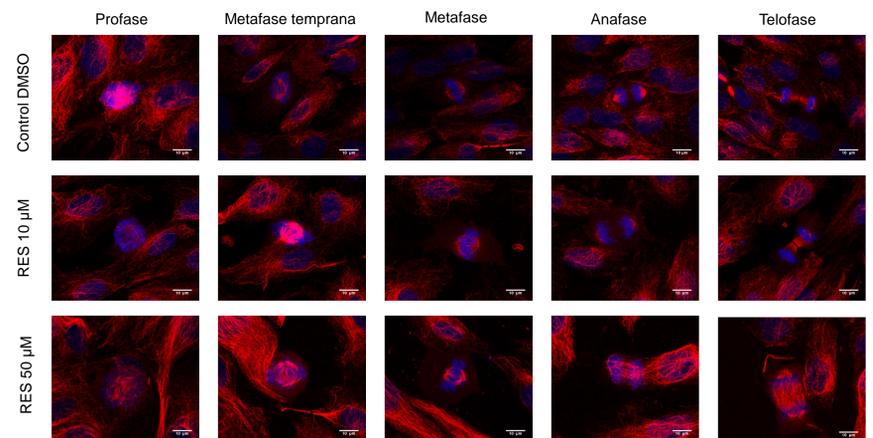


Figura 8. Análisis mediante inmunofluorescencia del efecto sobre las fases de la mitosis del resveratrol a 10 µM y 50 µM. Se han teñido los núcleos celulares de azul mediante marcaje con DAPI y de rojo los microtúbulos mediante marcaje con anti-Tubulina acetilada, como anticuerpo primario, y anti-mouse 594, como anticuerpo secundario.

## Discusión

Tal y como se muestra en los resultados, los compuestos estudiados no presentan efectos citotóxicos especialmente relevantes. En las figuras 3 y 4 podemos observar que, solamente el resveratrol a dosis de 100 µM y 500 µM, así como JC21 y MMM24 a 500 µM, presentan toxicidad de forma estadísticamente significativa a las 48 h de seguimiento de la viabilidad celular, no llegando, en ningún caso, a alcanzar la dosis letal 50 (DL50). Así mismo, se quiso comprobar que los compuestos no producían ninguna alteración en el ciclo celular y, tal y como muestran las figuras 5 y 6, los compuestos no muestran ninguna diferencia apreciable con respecto al control, salvo en el caso del resveratrol, que parece producir un arresto del ciclo en la fase S y G2/M del mismo. Mediante inmunofluorescencia se ha podido observar que, a diferentes dosis de resveratrol, aunque todas las fases de la mitosis están igualmente representadas, parece haber un menor número de células en mitosis a medida que aumenta la dosis de resveratrol, tal y como muestra la figura 7. Además, a 50 µM de resveratrol, se observa menor número de células y estas parecen tener un mayor tamaño. En conclusión, los compuestos derivados del resveratrol parecen ser seguros a las dosis estudiadas y se deberá seguir investigando para comprobar si, efectivamente, son capaces de regular positivamente la proteína Sirt1, resultando en un efecto protector frente a la progresión de la DMAE.

BIBLIOGRAFÍA:  
[1] de Jong, E. K., Geerlings, M. J., & den Hollander, A. I. (2020). Age-related macular degeneration. In Genetics and Genomics of Eye Disease (pp. 155-180). Academic Press.  
[2] Wong, W. L., Su, X., Li, X., Cheung, C. M. G., Klein, R., Cheng, C. Y., & Wong, T. Y. (2014). Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. The Lancet Global Health, 2(2), e106-e116.  
[3] Li, J., Yu, S., Ying, J., Shi, T., & Wang, P. (2017). Resveratrol prevents ROS-induced apoptosis in high glucose-treated retinal capillary endothelial cells via the activation of AMPK/Sirt1/PGC-1α pathway. Oxidative medicine and cellular longevity, 2017.  
[4] Longo, V. D., & Kennedy, B. K. (2006). Sirtuins in aging and age-related disease. Cell, 126(2), 257-268.  
[5] Liu, S., Lin, Y. U., & Liu, X. (2016). Protective effects of SIRT1 in patients with proliferative diabetic retinopathy via the inhibition of IL-17 expression. Experimental and therapeutic medicine, 11(1), 257-262.