



UNIVERSIDAD DE SEVILLA. FACULTAD DE FARMACIA



# Proteostasis y Degeneración Macular Asociada a la Edad

---

Revisión bibliográfica

**Gloria Mora Castaño**

Junio, 2017



**Universidad de Sevilla**

**Facultad de Farmacia**

**Trabajo Fin de Grado**

**Doble Grado en Farmacia y Óptica y Optometría**

**Proteostasis y Degeneración Macular**  
**Asociada a la Edad**

Gloria Mora Castaño

Facultad de Farmacia, Junio 2017

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Tutor: Diego Ruano Caballero

Revisión bibliográfica

## **Resumen**

En los últimos 100 años, la esperanza de vida ha aumentado, por tanto, hay un envejecimiento de la población que repercute en el incremento de la prevalencia de las enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la Degenaración Macular Asociada a la Edad (DMAE). Estas enfermedades son proteinopatías pues los mecanismos que mantienen la proteostasis están desregulados. Los mecanismos principales son el proteosoma, las chaperonas y la autofagia. En presencia de estrés estos mecanismos se activan. Sin embargo, con el estrés crónico y en edades avanzadas, se ven disminuidos. Así ocurre también en las enfermedades neurodegenerativas y en la DMAE, que es la principal causa de ceguera entre las personas mayores de 60 años. Su principal agente etiológico es el estrés oxidativo en el epitelio pigmentario (EPR) que puede ser tanto endógeno como exógeno. Debido a las elevadas exigencias metabólicas del EPR, se generan altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS). Existen factores que combaten el estrés oxidativo, destacando el Nrf2, que a su vez está regulado por otros factores como el p62. Sin embargo, estos mecanismos de defensa antioxidantes también están alterados en presencia de estrés oxidativo crónico. Todo ello tiene como consecuencia la desregulación de los sistemas que mantienen la proteostasis, siendo el sistema ubiquitina-proteosoma uno de los más importantes en el EPR, que no sólo afecta a la formación de agregados proteicos sino que también se estimulan factores proangiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Como resultado se obtienen un cúmulo de proteínas dañadas, el incremento de la inflamación y la angiogénesis, característicos de la DMAE.

Palabras clave: proteostasis, DMAE, ubiquitina-proteosoma, estrés oxidativo, EPR.

# **ÍNDICE**

|   |    |
|---|----|
| Introducción .....  | 5  |
| Objetivos de la revisión .....  | 6  |
| Metodología .....   | 7  |
| Resultados y discusión .....  | 8  |
| 1. Proteostasis .....   | 8  |
| 1.1 Maduración de las proteínas.....  | 8  |
| 1.2 Proteosoma .....  | 8  |
| 1.3 Inmunoproteosoma .....  | 10 |
| 1.4 Pérdida de la proteostasis.....   | 10 |
| 2. Degeneración Macular Asociada a la Edad .....  | 13 |
| 2.1 Tipos DMAE .....  | 15 |
| 2.2 Estrés oxidativo .....  | 16 |
| 2.2.1 Protección contra el estrés oxidativo.....  | 18 |
| 2.2.2 Cambios en los sistemas de protección contra el estrés oxidativo con la edad.....   | 20 |
| 2.3 Proteínas de choque térmico .....   | 21 |
| 2.4 Vía de la ubiquitina-proteosoma en el ojo.....  | 24 |
| 2.4.1 Importancia de la vía ubiquitina-proteosoma.....                                    | 26 |
| 2.4.2 Relación del estrés oxidativo con la vía ubiquitina-proteosoma.....                 | 27 |
| 2.4.3 Consecuencias de la desregulación de la vía ubiquitina-proteosoma en la retina..... | 28 |
| 2.5 Autofagia .....   | 28 |
| Conclusiones .....  | 31 |
| Bibliografía .....  | 32 |

## **Introducción**

En los últimos 100 años, la población ha experimentado un aumento en la esperanza de vida pasando de ser 40 años en la década de los 50 a los 80 años en la actualidad. Esto es debido a múltiples factores como los avances tecnológicos, mejoras en las condiciones higiénicas y el control de enfermedades infecciosas, sobre todo en los países industrializados (Garcés, 2016). El incremento de la esperanza de vida tiene como consecuencia el aumento del porcentaje de población de edad avanzada, que se traduce en un envejecimiento de la población (Fundación General CSIC., 2010; Garcés, 2016).

En el caso de España, el fenómeno de envejecimiento es acelerado, pues en menos de 30 años se ha duplicado el número de personas mayores de 65 años. Según las estimaciones realizadas por el Instituto Nacional de Estadística (INE), las personas mayores de 65 años representarán más del 30% de la población en el año 2050 (Fundación General CSIC., 2010).

Este cambio poblacional supone también un incremento de la prevalencia de las enfermedades neurodegenerativas, tales como el Alzheimer, pues los estudios estadísticos muestran una clara relación de algunas de ellas con la edad. Frente a esto, se han abierto líneas de investigación para comprender el origen de estas patologías. Hoy en día, la mayoría de estas enfermedades no tienen cura. Actualmente, el objetivo terapéutico respecto a las enfermedades neurodegenerativas se centra en prevenir o retrasar su aparición, y en alargar la supervivencia y mejorar la calidad de vida de los pacientes, llegando a convertirla en enfermedades crónicas (Garcés, 2016).

Así mismo, el envejecimiento de la población también implica un incremento de la prevalencia de la DMAE (Europa-Press, 2015), por ser una enfermedad neurodegenerativa también. La DMAE es una enfermedad que generalmente afecta a las personas mayores de 60 años, y es la principal causa de ceguera entre los ancianos (Handa, 2012; Wong et al., 2014). Mientras que la frecuencia de la DMAE en la población general es menos de 1 de cada 10 personas, a partir de los 85 años aumenta a 1 de cada 3 (Europa-Press, 2015). En la actualidad, esta enfermedad aflige al 30% de las personas mayores de 70 años, que supone una cifra de 60 millones de personas en todo el mundo. En EE.UU. hay 10 millones de personas afectadas por la DMAE, y se prevé que este número se duplique para el año 2050 (Mettu et al., 2012).

El impacto de la DMAE para el individuo es sorprendente. La disminución de la calidad de vida con la DMAE temprana es similar a la de una persona con VIH sintomático. Así mismo, la calidad de vida con la DMAE avanzada se puede compara con la de un paciente con cáncer de

próstata metastásico con un dolor incontrolable. Esta reducción en la calidad de vida se ve acentuada con la disminución de la actividad, la depresión y la ansiedad. El impacto de la DMAE también recae en salud pública pues supone 30.000 millones de dólares anuales, y se prevé que aumente, dado que las personas mayores de 60 años representan el segmento de la población que crece más rápidamente (Handa, 2012; Mettu et al., 2012).

Entre los factores que influyen en las enfermedades neurodegenerativas, la proteostasis juega un papel importante. La homeostasis de las proteínas o proteostasis es el proceso que regula el balance adecuado de proteínas dentro de la célula en función de las necesidades de éstas para mantener la salud tanto del proteoma celular como del propio organismo (Enzo Life Sciences, 2017). Este concepto abarca el estudio de las proteínas de manera individual, desde su síntesis, ubicación celular y función, hasta su vida media y degradación (Triana-Martínez et al., 2012). Mantener la homeostasis de las proteínas supone constantemente un desafío debido a una serie de circunstancias como son cambios en las condiciones ambientales de la célula, mutación genética, la capacidad limitada del correcto plegado de las proteínas, o el proceso de envejecimiento. Para mantener la proteostasis celular, las células cuentan con mecanismos que permiten un control de calidad de las proteínas nacientes a través de la eliminación de aquellas que están mal plegadas, evitar la formación de agregados proteicos y mecanismos que ayudan a un plegamiento correcto de las proteínas, puesto que una desregulación de la proteostasis puede conducir al desarrollo de enfermedades conocidas como proteinopatías (Dubnikov et al., 2017).

### **Objetivos de la revisión**

Dado que la DMAE es una proteinopatía, nos planteamos conocer, en primer lugar, los mecanismos que intervienen en la proteostasis, así como las disfunciones de los mismos durante el envejecimiento. Siendo tan alta la prevalencia de esta enfermedad y tan alto el impacto que supone para los que la padecen, es objeto de estudio cómo se desencadena el proceso patológico. Así mismo, se estudiará si los mecanismos que mantienen la proteostasis se encuentran alterados en la patología y, en su caso, de qué forma están alterados y las repercusiones que esto tiene para el desarrollo de la DMAE.

## **Metodología**

Esta revisión bibliográfica se ha hecho a partir tanto de trabajos originales como de otras revisiones sobre el tema. También se han consultado páginas web oficiales, como la de la Fundación General CSIC. Para todo ello, se ha buscado información en bases de datos internacionales. Se ha tratado de elaborar una estrategia de búsqueda amplia de información relacionada con la enfermedad tratada en el tema.

La búsqueda bibliográfica comenzó a finales de enero de 2017, y finalizó a finales de mayo del mismo año.

Las principales fuentes de información fueron PubMed, Medline y Scopus en menor medida, en las que se puso como condición que los artículos o revisiones tuviesen menos de 10 años, con el fin de encontrar la información más actual. Finalmente, se ha aceptado información anterior a 10 años, al considerarla necesaria para realizar esta revisión. Hemos partido, por tanto, de artículos y revisiones actuales, que nos han llevado en ocasiones a informaciones algo más antiguas.

La combinación de palabras clave y filtros ha sido vital para la búsqueda bibliográfica. “Proteostasis and age-related macular degeneration” ha sido la combinación más usada con frecuencia. Otras combinaciones y palabras han sido: “proteostasis”, “proteasome”, “chaperones and age related macular degeneration”, “autophagy”. Se ha realizado casi en su totalidad en inglés, por ser en el idioma en el que más información hay sobre este tema.

De todos los resultados obtenidos, se han escogido aquellos que se encontrasen dentro de unos criterios de inclusión preestablecidos, y se desecharon aquellos que no cumplían estos criterios: publicación realizada hace menos de 15 años, publicación en español, inglés, o francés, información asociada a la vía ubiquitina-proteosoma en especial, más que a la de otros mecanismos que intervienen en la proteostasis, artículos con relación directa entre la proteostasis y la DMAE.

## **Resultados y discusión**

### **1. Proteostasis**

#### **1.1 Maduración de las proteínas**

Los polipéptidos nacientes se someten a un proceso complejo de múltiples etapas de maduración para alcanzar su estructura espacial correcta, obtener adecuadas modificaciones postraduccionales y convertirse en proteínas funcionales. Por ejemplo, las proteínas que van a ser secretadas llevan una señal de localización de retículo endoplasmático (RE). Así, dichas proteínas entran en el retículo. A medida que se va sintetizando la proteína, entran en juego las chaperonas, proteínas que asisten en el proceso de plegamiento para evitar errores de conformación. Una vez alcanzado el plegamiento correcto, las proteínas pasan al aparato de Golgi, donde experimentan las últimas etapas de maduración, exceptuando las que no se hayan plegado correctamente que serán retro-translocadas al citosol para su degradación por el proteosoma (Sauer et al., 2008; Dubnikov et al., 2017).

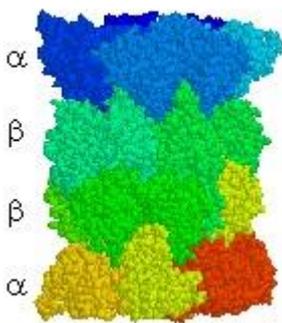
#### **1.2 Proteosoma**

El proteosoma es un complejo multiproteico cuyas funciones son destruir proteínas malformadas, tiene un papel regulador como parte del sistema ubiquitina-proteosoma, interviene en la diferenciación celular, regula el ciclo celular y es defensa contra toxinas, entre otras. Debido a todo esto, podemos entender la importancia que tiene para la célula (Franco et al., 2008). Este complejo multiproteico lo componen 3 partículas estructurales: una partícula 20S con función catalítica y dos partículas 19S con función reguladora. La subunidad 20S tiene forma de barril y está compuesta a su vez por 4 anillos que son idénticos dos a dos: 2 anillos alfa ( $\alpha$ ) y 2 anillos beta ( $\beta$ ) (Franco et al., 2008; Medicina molecular, 2008) (Figura 1). Uno de los anillos  $\alpha$  se encuentra en la parte superior del proteosoma 20S y el otro en la parte inferior. Cada uno de estos anillos está formado por 7 subunidades. Los anillos  $\beta$  se encuentran en la parte interior del proteosoma 20S y también están formados cada anillo por 7 subunidades (Franco et al., 2008). La actividad catalítica la desempeñan las subunidades  $\beta$ 1 (actividad caspasa),  $\beta$ 2 (actividad tripsina) y  $\beta$ 5 (actividad quimotripsina) (Angosto, 2005). La subunidad 19S se une a los extremos de la subunidad 20S (Medicina molecular, 2008). Esta subunidad está formada por una tapa y una base que se une al proteosoma 20S (Angosto, 2005) (Figura 2).

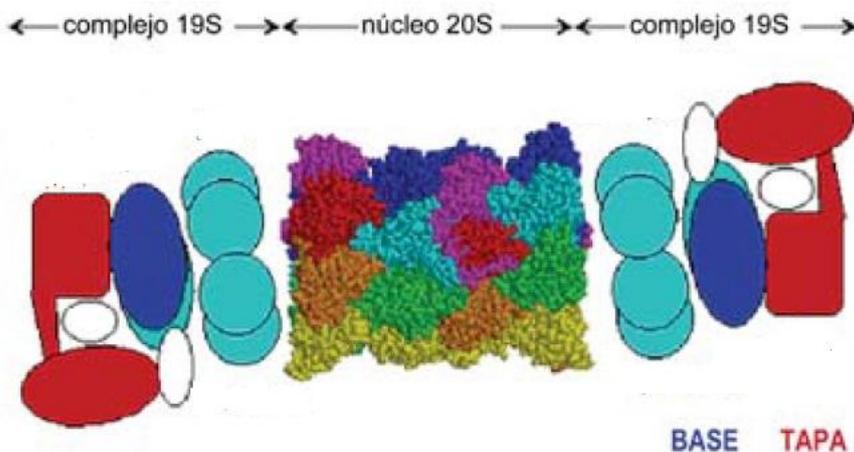
Para que una proteína sea reconocida y sufra degradación en el proteosoma 26S, debe estar marcada previamente con ubiquitina. El proceso de degradación de las proteínas ubiquitinadas

empieza por el reconocimiento de las mismas a través del receptor de ubiquitina de la subunidad 19S. Le sigue la función ATPasa de la subunidad 19S que emplea la energía para desplegar la proteína sustrato y continúa con la introducción de la proteína en la subunidad 20S previamente desubiquitinada por acción de las isopeptidasas. Dentro del proteosoma, la proteína se rompe en fragmentos que saldrán por el extremo 19S opuesto (Angosto, 2005).

Una de las funciones del proteosoma es degradar proteínas mal formadas o aquellas que necesitan un recambio por antigüedad. El proteosoma cobra especial importancia en la degradación de proteínas de vida media muy corta como las ciclinas del ciclo celular, las proteínas que participan en la cascada de señalización intracelular en respuesta a señales externas o las que participan en la reparación del daño en el ADN. El proteosoma puede ser regulado mediante distintas vías. Una de ellas es a través de la proteína Rpn4 que es capaz de estimular la inducción de los genes que codifican el proteosoma. A su vez, el gen que codifica Rpn4 está sujeto a una compleja regulación en la que participan varios factores de transcripción en respuesta a los distintos estímulos y tipos de estrés celular que requieran un aumento en los niveles de proteosoma (Medicina molecular, 2008).



**Figura 1. Representación de la partícula 20S. Modificado de Hispano-300, 2015.**



**Figura 2. Representación del proteosoma 26S. Modificado de Angosto, 2005.**

### **1.3 Inmunoproteosoma**

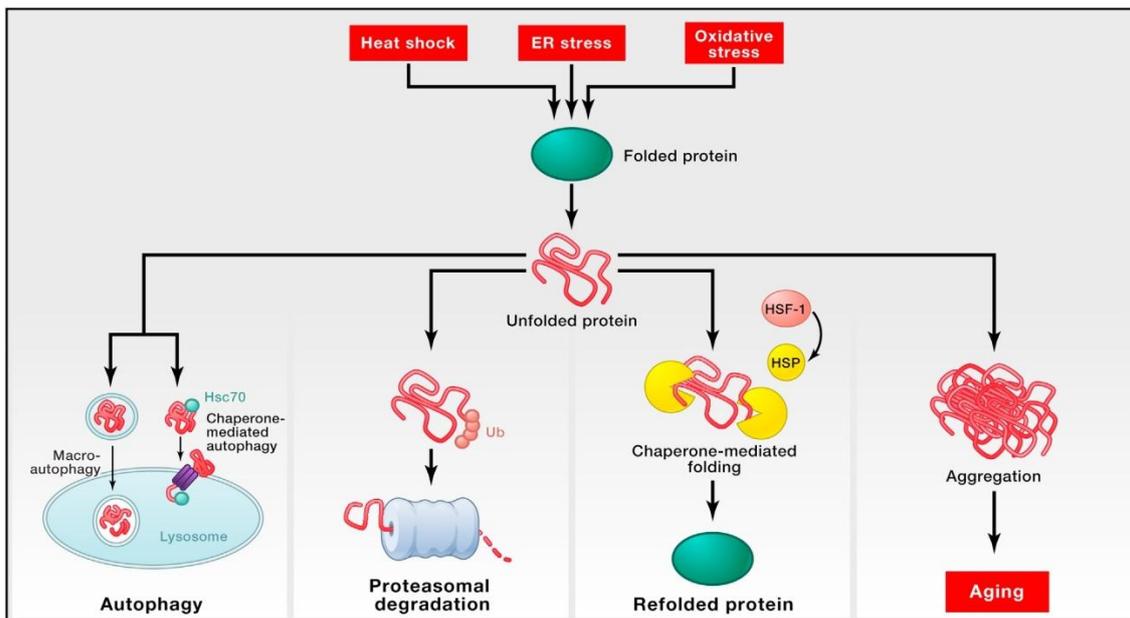
La exposición a citoquinas como el interferón gamma, puede llevar a la sustitución de las subunidades  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 5$  del proteosoma 20S por las subunidades inducibles  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  y  $\beta 5i$ . Este cambio supone la formación del inmunoproteosoma (Ethen et al., 2007). El inmunoproteosoma (20Si) es un tipo de proteosoma localizado mayoritariamente en monocitos y células dendríticas y ausentes en el resto de las células. El inmunoproteosoma genera péptidos con un extremo C terminal hidrofóbico, que encaja mejor en las moléculas del MHC de clase I. Así, estos péptidos se presentan en la superficie celular para la presentación de antígenos y su reconocimiento por las células CD8 del sistema adaptativo inmune. Sin embargo, durante un proceso inflamatorio se puede inducir la síntesis del inmunoproteosoma en células que generalmente no lo expresan. En la mayoría de células, el estrés oxidativo y las citoquinas proinflamatorias son estímulos que conducen a la producción elevada de inmunoproteosomas. Concretamente, en enfermedades neurodegenerativas, los procesos inflamatorios inducen la síntesis de inmunoproteosomas en las neuronas (Kloetzel, 2004).

### **1.4 Pérdida de la proteostasis**

Bajo condiciones normales y sin estrés, el plegado, el control de calidad y los mecanismos de degradación son capaces de mantener la homeostasis de las proteínas. Sin embargo, ante la presencia de estrés (ya sea endógeno o exógeno), tanto en etapas tardías de la vida por el envejecimiento o cuando una carga de proteínas mutadas y propensas a la agregación desafían a la red de proteostasis, las moléculas mal plegadas evaden los mecanismos de regulación celular (Dubnikov et al., 2017) y forman agregados de proteínas ubiquitinadas que constituyen placas amiloides; es decir, se acumulan proteínas que han sufrido alguna mutación espontánea o adquirida de manera que contienen mayor cantidad de aminoácidos apolares y láminas  $\beta$  plegadas de lo normal, haciéndolas proteínas aberrantes con tendencia a unirse entre sí para evitar su contacto con el líquido celular, formando lo que se conoce como pentámeros SAP (Serum Amiloid Fosfate). De esta forma se originan placas que se acumulan en el citosol interfiriendo en las rutas celulares que lleva a un mal funcionamiento de las mismas, llegando incluso a la apoptosis celular. Ante un exceso de acumulación de estas proteínas aberrantes, el proteosoma queda desbordado no pudiendo eliminar el exceso de éstas ya bien sea por mal funcionamiento del proteosoma (mutaciones puntuales, inhibición...) o por alta concentración de proteínas aberrantes, imposibles de degradar (Franco et al., 2008).

Puesto que la acumulación de estos agregados presenta riesgos para la funcionalidad y viabilidad celular y orgánica, las células han desarrollado varios mecanismos de defensa para

responder a esta acumulación y restaurar la proteostasis (Figura 3). Estos mecanismos modulan la expresión génica reduciendo la expresión de varios genes para aliviar la carga de agregación e inducir la producción de chaperonas, que actúan en consonancia para restaurar la proteostasis. Se ha descubierto que hay una correlación entre la carga de chaperonas y la edad, pues existen evidencias científicas que avalan que las chaperonas disminuyen con la edad, y que la sobreexpresión de las mismas aumenta la longevidad de los animales (Morrow et al., 2004). La respuesta de choque térmico (HSR) es el primer mecanismo que se identificó como una respuesta celular a la acumulación de proteínas mal plegadas en el citosol (Dubnikov et al., 2017). Situaciones de estrés, tales como el calor, isquemia, estrés oxidativo y otros, elevan la concentración intracelular de proteínas de choque térmico (Hsp) a través de la HSR. La misión de estas proteínas es proteger las células frente a los agentes estresantes. Las Hsp funcionan principalmente como carabinas moleculares implicadas en el transporte, plegamiento, acoplamiento y degradación de proteínas lesionadas o mal plegadas, de manera que parece que evitan que se acumulen proteínas lesionadas en células afectadas por situaciones de estrés (Angosto, 2005).



**Figura 3. Pérdida de la proteostasis. Tomada de López-Otín et al., 2013.**

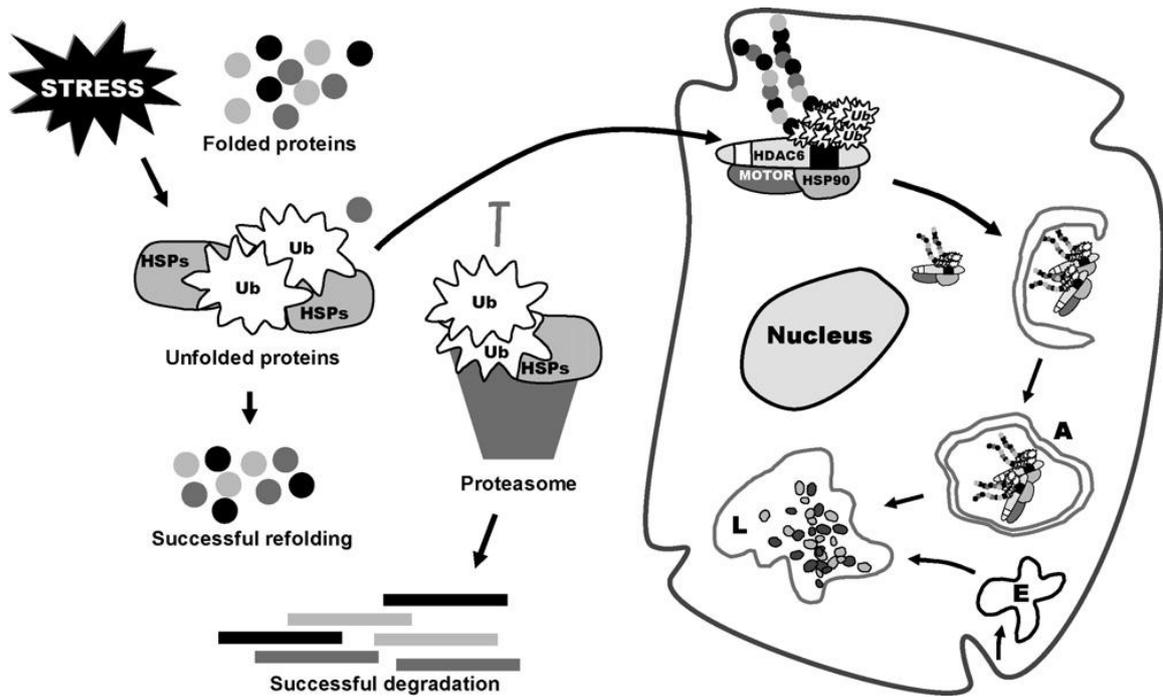
Otro de los mecanismos de restauración de la proteostasis nombrado anteriormente es la degradación en el proteosoma de proteínas mal plegadas, pero también éstas pueden ser degradadas por los lisosomas. Estas dos vías proteolíticas, actuando independientemente, tienen sustratos distintos (Korolchuk et al., 2009). En general, las proteínas reguladoras de vida corta, incluyendo proteínas dañadas o proteínas parcialmente desplegadas se degradan por la

vía proteosómica. Las proteínas degradadas por esta vía normalmente contienen señales de degradación intrínsecas, denominadas degrones, que son muy diversas, desde secuencias de péptidos unidos a dominios específicos o residuos de aminoácidos individuales en el extremo N de las proteínas. Ciertas modificaciones de residuos internos tales como la oxidación de metionina también aumenta la susceptibilidad de ciertas proteínas a la degradación por el proteosoma (Shang y Taylor, 2012).

Por otro lado, muchas proteínas asociadas a membrana o asociadas a orgánulos celulares son degradadas por los lisosomas, ya sea por endocitosis o mecanismos autofágicos. Aún así, hay estudios recientes que indican que las vías de degradación del proteosoma y la de lisosoma también pueden funcionar de manera coordinada, en situaciones de estrés celular (Korolchuk et al., 2009; Uchiki et al., 2012).

Existe una estrecha relación entre la función de las chaperonas y la vía de degradación del proteosoma. El proteosoma utiliza chaperonas moleculares como Hsp90 y Hsp70 para reconocer proteínas anormales. Además una co-chaperona con actividad de ubiquitina ligasa (CHIP), puede dirigirse a sustratos unidos a chaperonas promoviendo la degradación de éstos. Al interactuar con chaperonas moleculares (Hsp90 o Hsp70) y enzimas de conjugación de ubiquitina, esta co-chaperona cataliza la ubiquitinación de proteínas ligadas a chaperonas. Así, funciona como un puente o interruptor molecular entre la posibilidad de replegamiento o de degradación. Una misma proteína puede ser llevada paralelamente o competitivamente por estos dos sistemas de proteostasis. De esta forma, se piensa que el destino de la proteína dañada depende de la cinética y afinidad entre las proteínas dañadas y las chaperonas moleculares o el proteosoma, así como de la disponibilidad de la maquinaria proteolítica (Figura 4) (Shang y Taylor, 2012).

Estas proteínas entonces forman agregados que pueden ser eliminados por procesos autofágicos. Hay tres tipos de autofagia: macroautofagia, microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas (AMC). Todas ellas llevan material citoplasmático hacia la degradación lisosomal (Kaarniranta et al., 2009). Tanto la macroautofagia como la microautofagia envían a los lisosomas porciones de citoplasma u orgánulos, mientras que la autofagia mediada por chaperonas es un sistema proteolítico que requiere la acción de chaperonas citosólicas para seleccionar, desplegar y dirigir proteínas mal plegadas que llevan una etiqueta específica al interior del lisosoma (Zhang y Cuervo, 2008). La chaperona de choque térmico 70 (Hsc70) es un regulador central de esta vía de degradación (Kaarniranta et al., 2009).



**Figura 4. Procesamiento de proteínas en presencia de estrés. Tomada de Kaarniranta et al., 2009**

La autofagia eficiente depende de un equilibrio entre la formación y eliminación de autofagosomas. La interrupción de cualquier parte de esta vía causará disfunción autofágica (Shang y Taylor, 2012). Al igual que pasaba con las chaperonas, la actividad tanto de la autofagia como del proteosoma disminuye con la edad (Zhang y Cuervo, 2008).

Diferentes estudios demuestran que existe una comunicación intertisular que coordina la activación de los mecanismos de mantenimiento de la proteostasis a nivel del organismo. Estos hallazgos presentan nuevas oportunidades de investigación para tratamientos de las proteinopatías basadas en la orquestación de la proteostasis (Dubnikov et al., 2017).

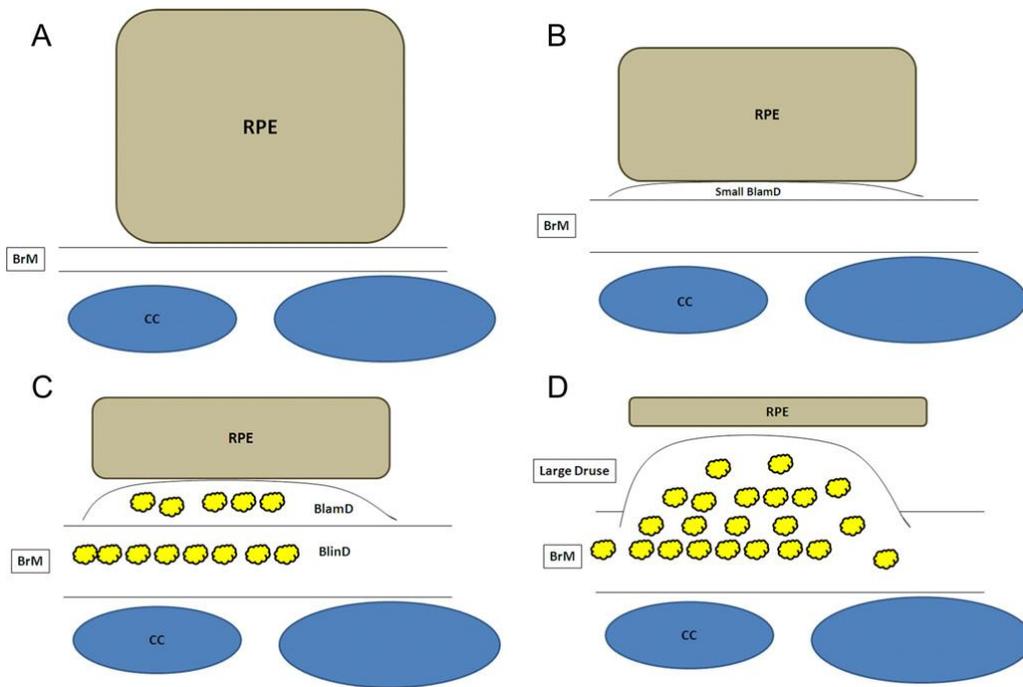
## **2. Degeneración Macular Asociada a la Edad**

La DMAE es un tipo de proteinopatía. Para entender esta enfermedad y los mecanismos implicados en ella, primero es necesario hacer un breve resumen de la anatomía de las capas más importantes del globo ocular posterior. En la retina existe una región llamada mácula que corresponde a la visión central, más concretamente dentro de ella, la fovea, que está compuesta exclusivamente por uno de los dos tipos de fotorreceptores: los conos (Verdaguer, 2010). En estrecha proximidad y comunicación con los fotorreceptores, se encuentra el EPR, un complejo altamente especializado que mantiene la salud de los fotorreceptores, células que transducen la energía lumínica en química y después en eléctrica que es mandada al cerebro

para crear la visión (Bhutto y Lutty, 2012; Taylor, 2012). El EPR está junto a una matriz llamada membrana de Bruch. Se trata de una barrera semipermeable a través de la cual tiene lugar el intercambio entre el EPR y la coriocapilar. Bajo la membrana de Bruch, está la coriocapilar, un plexo capilar que nutre a los fotorreceptores (conos y bastones) ya que la fóvea es avascular (requisito importante para una máxima transparencia). Los nutrientes deben ser transportados de la coriocapilar a través de la membrana de Bruch y el epitelio pigmentario (Mettu et al., 2012; Verdaguer, 2010). Además, la demanda metabólica de la retina y el EPR es alta. Por ello, para satisfacer las demandas metabólicas del EPR, la circulación coroidea tiene el flujo sanguíneo más alto por unidad de perfusión tisular en el cuerpo, con un flujo 7 veces mayor en la mácula que en la retina periférica (Handa, 2012).

Entre las múltiples funciones del EPR se encuentran la absorción de luz, intercambio de calor, metabolismo de la vitamina A, barrera retiniana, mantenimiento de la corioides y la fagocitosis diaria de los segmentos externos de los fotorreceptores (Bhutto y Lutty, 2012; Handa, 2012). Respecto a la fagocitosis, el EPR juega un papel importante. Los bastones desprenden los discos usados gastados al alba y los conos lo hacen al atardecer. Estos discos son fagocitados por el epitelio pigmentario por acción de una serie de enzimas para ser reciclados. Sin embargo, con el paso de los años, este mecanismo tan perfecto de renovación circadiana empieza a fallar de tal forma que moléculas alteradas por el daño oxidativo no son reconocidas por las enzimas y comienzan a acumularse en el EPR formando gránulos de lipofuscina (Handa, 2012; Verdaguer, 2010). La lipofuscina es una mezcla de agregados de proteínas y lípidos no degradables derivados, precisamente, de la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores (Shang y Taylor, 2012). Durante el envejecimiento, la lipofuscina se acumula en los lisosomas, debido a una disminución de la capacidad celular para degradar (Kaarniranta et al., 2009).

En algunos individuos, este proceso de envejecimiento se transforma en patológico en el momento en el que la lipofuscina se acumula de forma masiva dentro del epitelio pigmentario dañando el funcionamiento de la célula y finalmente, el material de degradación incompleta es expulsado fuera de la célula y se acumula entre el epitelio pigmentario y la membrana de Bruch, constituyendo las drusas, primera manifestación visible oftalmoscópicamente de este proceso (Figura 5) (Verdaguer, 2010).



**Figura 5. Desarrollo de la DMAE. Tomada de Handa, 2012.**

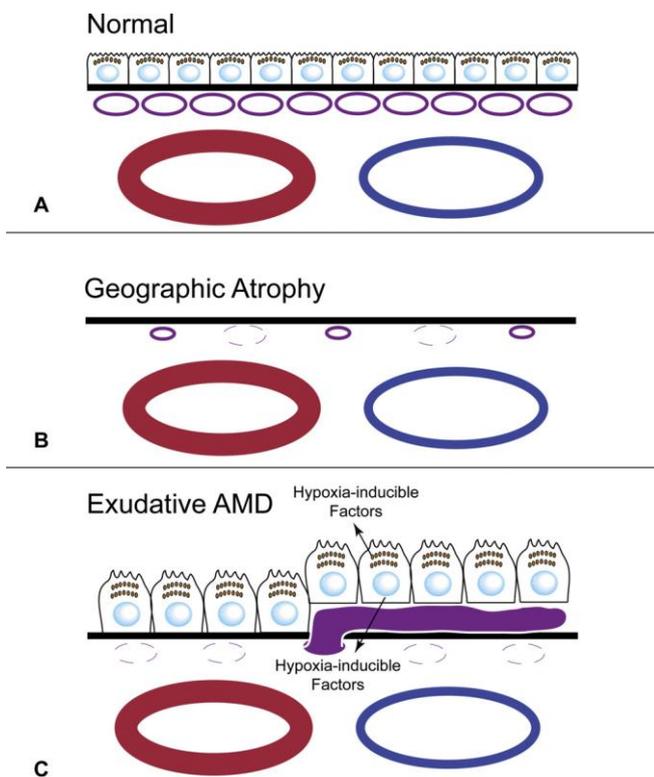
### 2.1 Tipos DMAE

La DMAE se puede presentar de dos formas: seca o húmeda (Figura 6). La forma seca o atrófica (85-90% de los casos) (Bhutto y Luty, 2012) se caracteriza por una pérdida de pigmentación del EPR debido a que los depósitos que se han creado lo separan de la coriocalilar impidiendo que llegue la cantidad suficiente de nutrientes desde la coriocalilar al EPR. De esta forma, los individuos van perdiendo la visión. La forma seca podríamos decir que es la forma precoz de la enfermedad pero la atrofia que se produce es progresiva (Verdaguer, 2010; Monés, 2017).

La forma húmeda o exudativa (10-15% de los casos) comienza por una pérdida de la vasculatura coroidea debido a la estenosis de los vasos. Además, el ambiente de la coriocalilar es un medio proinflamatorio con acumulación de componentes del complemento, así como moléculas proinflamatorias durante la DMAE. En este medio tóxico, las células de la coriocalilar mueren o pierden su función haciendo que no lleguen los nutrientes necesarios al EPR y da lugar a células hipóxicas (Bhutto y Luty, 2012).

Llegados a este punto, los macrófagos son reclutados a sitios de lesión del EPR y se forman drusas. El reclutamiento de macrófagos puede ser beneficioso o nocivo dependiendo de su estado de activación en el momento del reclutamiento. Los macrófagos no activados pueden eliminar los depósitos sin lesiones adicionales. Por el contrario, los macrófagos activados o reparadores pueden promover complicaciones y progresión a las formas tardías de la enfermedad mediante la liberación de mediadores inflamatorios y factores de crecimiento,

como el VEGF (Taylor, 2012). Este factor favorece el crecimiento de neovasos subyacentes al EPR que se originan en la coriocapilar que, a través de roturas de la membrana de Bruch, llegan al epitelio. El papel de la inflamación en la progresión de la DMAE se conoce de muchos años atrás. Diversos estudios identifican una relación entre macrófagos y la formación de membranas neovasculares en la DMAE húmeda. Las quimioquinas desempeñan un papel importante en la quimiotaxis del reclutamiento y activación de macrófagos. Es sabido que la expresión de genes relacionados con quimioquinas es notable en todas las formas (húmeda y seca) de la DMAE (Rutar y Provis, 2016). La pérdida de vasos en la coriocapilar también podría ser un estímulo para la formación de drusas, ya que el sistema de eliminación de desechos retinales y material excitado del EPR sería limitado (Bhutto y Lutty, 2012). Debido a la presencia de nuevos vasos anormales, se pueden producir hemorragias que invaden la retina, especialmente la zona central, impidiendo la visión de los individuos. La forma húmeda podríamos decir que es la forma grave de la enfermedad (Verdaguer, 2010; Monés, 2017).



**Figura 6. Formas de DMAE. Tomada de Bhutto y Lutty, 2012.**

### 2.2 Estrés oxidativo

Entre los muchos factores que hacen que la investigación de la DMAE sea tan desafiante es que la enfermedad es claramente multifactorial. Se han propuesto muchas hipótesis para explicar la etiología y mecanismos de la DMAE, y la mayoría de las investigaciones presentan

datos para apoyar al menos una hipótesis: incluyen el estrés oxidativo como una de las causas más importantes en la DMAE (Chen et al., 2014; Handa, 2012; Taylor, 2012).

Como ya hemos dicho, la mácula tiene una alta demanda metabólica y esto se traduce en altos niveles de ROS. También es sabido que el EPR se encarga de fagocitar los extremos más externos de los fotorreceptores. De hecho, el EPR fagocita casi 30.000 segmentos externos cada día. Durante la fagocitosis del segmento externo, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular resultante de la NADPH oxidasa en el fagosoma o de la β-oxidación de los lípidos en los peroxisomas se genera en la misma proporción con la que se produce en otras células fagocíticas como los macrófagos (Handa, 2012). Así podemos hacernos una idea del nivel de estrés oxidativo al que está sometido el EPR, que se traduce en la acumulación de proteínas alteradas, lípidos y/o material genético que puede ser citotóxico y puede acumularse en formas o en sitios que dan lugar a un EPR disfuncional (Taylor, 2012). Las células del EPR se protegen de un exceso de estrés oxidativo en parte, mediante la regulación catalasa durante este proceso (Handa, 2012; Mettu et al., 2012). Además, la acumulación de lipofuscina promueve el mal plegamiento de proteínas intracelulares, produciendo un estrés oxidativo adicional en las células del EPR, puesto que se ha demostrado que inhibe la respiración mitocondrial (Mettu et al., 2012; Jarrett y Boulton, 2012; Kaarniranta et al., 2009).

También hay factores exógenos que son fuente adicional de estrés oxidativo. La mácula procesa la luz para la visión y el estrés fotooxidativo se ha relacionado con el daño oxidativo a la retina, el EPR y la coroides, y múltiples trabajos han corroborado esta observación. Estos datos se correlacionan con el vínculo epidemiológico de la exposición a la luz solar y el riesgo de DMAE (Mettu et al., 2012).

El humo del cigarrillo sería otra de las fuentes de estrés oxidativo pues genera más de 4.700 componentes químicos, algunos de los cuales son oxidantes fuertes (Rangasamy et al. 2004). De hecho, cada bocanada de humo de cigarrillo contiene 1.015 radicales libres. Mientras el papel exacto del daño oxidativo causado por el tabaquismo en la DMAE es desconocido, está claro que los oxidantes químicos en el humo de los cigarrillos agotan los niveles del ácido ascórbico en los tejidos y de los grupos sulfidrilos de las proteínas, causando la oxidación del ADN, de los lípidos y de las proteínas. Muchos de estos cambios moleculares tales como malondialdehído, 4-hidroxinonenal, y los productos finales de glicación avanzada (AGE), se han identificado en la DMAE, e indican que el daño producido por la oxidación es un factor importante en el mecanismo de desarrollo de la enfermedad (Chen et al., 2014; Handa, 2012). Muchos de los oxidantes del humo del cigarrillo tienen preferencia por dirigirse a las células

del EPR produciendo lesiones en él y finalmente dar lugar a la apoptosis celular. Estos oxidantes en el EPR suprimen la expresión de la proteína quimioatrayente de monocitos 1 resultando en la reducción del reclutamiento de los macrófagos eliminadores y como consecuencia, acumulación de desechos proinflamatorios en el EPR. Entre los oxidantes del humo de cigarrillo destaca la hidroquinona, que provoca estrés en el retículo endoplásmico, encargado de la biosíntesis y modificaciones postraduccionales de proteínas de membrana. Así, este estrés conduce a la apoptosis de las células del epitelio pigmentario. Esto es debido a la supresión por parte de la hidroquinona de XBP1, una proteína esencial para la supervivencia celular en el EPR (Chen et al., 2014).

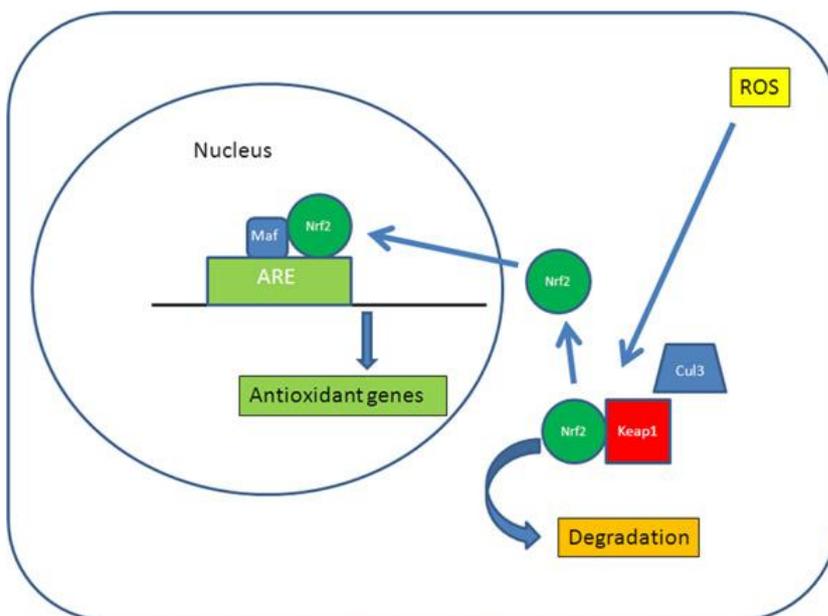
En resumen, la combinación de un flujo muy alto de sangre oxigenada y la exposición a fotosensibilizadores y la luz en la retina crea un ambiente ideal para la generación de ROS y el resultante daño oxidativo. Además, hay elevadas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados que son extremadamente propensos a la peroxidación de lípidos. Este estrés oxidativo, combinado con capacidades antioxidantes disminuidas al envejecer, da como resultado un aumento de la carga citotóxica. La disminución de las capacidades proteolíticas debida a la edad y al estrés exacerba la acumulación de disfunciones dentro del EPR. En conjunto, estas disminuciones y la deficiencia de los sistemas reparativos dan lugar a una disfunción retiniana asociada con la DMAE (Taylor, 2012).

### **2.2.1 Protección contra el estrés oxidativo**

Existen diversas moléculas antioxidantes cuya función es combatir el estrés oxidativo. Estos sistemas están regulados por factores de transcripción como NF- $\kappa$ B, AP1, la familia FoxO, o PGC-1 $\alpha$  (Handa, 2012). El NF- $\kappa$ B está implicado en procesos inflamatorios, inmunes, de estrés y del desarrollo. Este factor sufre un proceso de dos etapas para su activación. En primer lugar, la proteína precursora p105 se rompe y forma la proteína p50 activa. Ésta se une a p65 formando un heterodímero con el inhibidor I $\kappa$ B. Después de un estímulo celular (citoquinas, componentes víricos, bacterianos o situaciones de estrés), se induce la fosforilación del inhibidor I $\kappa$ B que conduce a la rápida ubiquitinación de dicho inhibidor y posterior degradación por el proteosoma. Así el heterodímero (p50-p65) NF- $\kappa$ B queda libre y activo y puede translocarse al núcleo, donde inicia la transcripción específica de genes proinflamatorios. La activación del NF- $\kappa$ B juega un importante papel en muchos aspectos del desarrollo tumoral, progresión y terapia, así como en la activación de genes que codifican para IL-1 y otras citoquinas que promueven la inflamación y genes necesarios para proliferación celular, adhesión celular y angiogénesis (Angosto, 2005).

No obstante, el sistema de transcripción más potente está mediado a través del Nrf2. El Nrf2 regula un programa transcripcional coordinado que mantiene la homeostasis celular redox y protege a la célula de lesiones oxidativas (Rangasamy et al., 2004). El Nrf2 es normalmente secuestrado en el citosol mediante la interacción con Keap1, que funciona como una proteína de adaptador de sustrato de Nrf2 para que se degrade por la vía ubiquitina-proteosoma, ayudando a mantener los niveles de estado estacionario de Nrf2. Así, en ausencia de estrés, Keap1 hace que se degrade Nrf2 y así prevenir su translocación al núcleo, lo que resulta en una baja expresión basal de genes antioxidantes (Handa, 2012).

Sin embargo, tras la exposición a ROS, Keap1 sufre un cambio conformacional cuando sus múltiples residuos de cisteína interactúan con ROS, que libera Nrf2 e inhibe a Keap1. El Nrf2 liberado se transloca entonces al núcleo, donde se dimeriza con Maf, y se une al elemento de respuesta antioxidante (ARE) en los promotores de sus genes diana para iniciar la transcripción (Figura 7). La respuesta derivada de esto es una regulación de enzimas como la catalasa o superóxido dismutasa (SOD) que neutralizan  $H_2O_2$  y superóxido, respectivamente, el mantenimiento de glutatión celular y tiorredoxina, y las enzimas del metabolismo xenobiótico que producen equivalentes reductores, tales como NADPH quinina oxidoreductasa (NQO - 1). Cuando las ROS agotan el glutatión celular, las células pueden morir por apoptosis mediada oxidativamente. Es importante destacar que Nrf2 juega un papel antioxidante esencial en el EPR (Jarrett y Boulton, 2012; Handa, 2012).



**Figura 7. Regulación de moléculas antioxidantes por Nrf2. Tomado de Handa, 2012.**

Además, diversos estudios han demostrado la relación de la proteína p62 con la regulación de Nrf2. Esta proteína interactúa con diversos factores de señalización y regula una variedad de funciones celulares incluyendo inflamación, apoptosis y autofagia. Se ha revelado en el EPR que p62 promueve la autofagia en él y simultáneamente mejora una respuesta antioxidante mediada por Nrf2 para proteger contra el estrés oxidativo agudo. También se ha observado que p62 contribuye a la inflamación mediada por NF- $\kappa$ B. Esto lleva a plantearnos si p62 protege o agudiza la lesión tisular (Wang et al., 2016).

Como ya hemos dicho, la eliminación de las proteínas oxidadas o mal plegadas depende del proteosoma y la autofagia. Pues el estrés agudo inhibe el proteosoma, pero regula los genes antioxidantes, como ya sabemos, y también de la autofagia, incluyendo p62. También se ha confirmado el papel protector de p62 en el EPR, a través tanto de la autofagia como de la activación de la señalización antioxidante Nrf2 (Wang et al., 2016).

Una de las funciones de p62 es unirse a proteínas poliubiquitinadas y guiarlas hacia el autofagosoma. Hay estudios que confirman que el silenciamiento de p62 en el EPR produce una autofagia ineficiente, y que la sobreexpresión de la misma produce una eficiente autofagia. Sin embargo, se ha observado que la influencia de p62 en la autofagia sólo se da cuando las células están bajo estrés oxidativo. Esto lleva a pensar que en condiciones basales, las células del EPR dependen de sistemas como el proteosoma, y que la influencia de p62 en la autofagia se reserva para situaciones de mucho estrés. Además favorece la transcripción del antioxidante Nrf2. Por tanto, p62 produce dos mecanismos de citoprotección del EPR, via autofagia de proteínas insolubles y la activación de Nrf2 (Wang et al., 2016).

### **2.2.2 Cambios en los sistemas de protección contra el estrés oxidativo con la edad**

Con la edad, p62 sufre daño oxidativo. En ratones de edad avanzada se observa una expresión reducida de p62, por lo que se podría pensar que ratones e incluso pacientes con DMAE también tuvieran reducidos los niveles de p62. Pero se ha observado lo contrario. Observaciones similares aparecen en pacientes con enfermedades neurodegenerativas. Esta contradicción puede deberse a la desregulación postranscripcional de la p62 para rescatar células dañadas. Pero es cuestionable si p62 es capaz de eliminar las proteínas agregadas cuando la maquinaria de autofagia está dañada (Wang et al., 2016).

Dado que el fallo de la autofagia y una respuesta debilitada de Nrf2 en el EPR es un componente de la DMAE, el p62 acumulado en el área de la enfermedad posiblemente ejerce

un efecto dañino agravando la inflamación crónica, una característica común de las enfermedades neurodegenerativas (Wang et al., 2016).

También con la edad se ha observado una disminución de Nrf2 así como en la enfermedad. No obstante, la respuesta antioxidante alterada podría revertirse disminuyendo la expresión de Keap1 o aumentando la de Nrf2. En la DMAE, el equilibrio entre el estrés oxidativo fisiológico y el inicio del estrés oxidativo patológico se altera, dando lugar a daño tisular. La capacidad de defenderse contra el estrés oxidativo mediante la regulación de la respuesta antioxidante es probable que sea un acontecimiento central que medie la iniciación y la progresión de la DMAE (Handa, 2012).

La señalización deficiente de Nrf2 predispone al desarrollo de inflamación, que es uno de los factores que inciden en la DMAE. Por el contrario, la activación de Nrf2 impide el estrés oxidativo mediado por la inflamación. Además, se ha observado que en el EPR de ratones deficientes de Nrf2 hay segmentos de fotorreceptores no digeridos, autofagosomas, autolisosomas y agregados de proteínas poliubiquitinadas (Handa, 2012).

Ante la deficiente capacidad de combatir el estrés oxidativo, se generan lípidos oxidados altamente reactivos. En la mácula destaca el ácido docosohexanoico (DHA), que es el ácido graso más abundante en las puntas de los fotorreceptores, y es también el ácido graso más oxidable en el cuerpo debido a su estructura insaturada. Estos lípidos oxidados pueden modificar proteínas, lípidos y ADN. Estas modificaciones pueden activar la respuesta inmune. Si la producción de estas modificaciones supera la capacidad de los sistemas de eliminación de estos daños, puede dar como resultado la apoptosis del EPR y la acumulación de desechos inflamatorios dentro de la membrana de Bruch que favorece la formación de drusas. Esta acumulación de restos citotóxicos compromete la maquinaria de edición de proteínas celulares que promoverán aún más la biogénesis de drusas. La pérdida de la función del EPR lleva también a una pérdida de la función de los fotorreceptores y por tanto, pérdida de la visión (Handa, 2012).

### **2.3 Proteínas de choque térmico**

La expresión de las proteínas de choque térmico se induce para prevenir la desnaturalización y agregación de proteínas. Estas proteínas ayudan en el repliegue de proteínas dañadas y su translocación a su correcta localización intracelular (Bukau et al., 2006). También interactúan de forma no covalente con las superficies hidrófobas expuestas de proteínas no nativas y las estabilizan para evitar una agregación irreversible (Kaarniranta et al., 2009).

La Hsp90 es una de las proteínas de choque térmico más conservadas y desempeña un papel en la regulación de la fisiología celular tanto en condiciones normales como en situaciones de estrés (Aguilà y Cheetham, 2016). Regula la estabilidad y activación de ciertas proteínas así como participar en el etiquetado de las mismas para proceder a su degradación por el proteosoma (Kaarniranta et al., 2009).

En condiciones de reposo, Hsp90 se une al factor de transcripción sensible al estrés, el factor de choque térmico 1 (HSF-1), para silenciar la actividad del mismo. Esto es una forma de regulación de los niveles de chaperonas moleculares según las necesidades de plegamiento de las proteínas. Por tanto, la inhibición de Hsp90 conduce a la liberación de HSF-1 y consecuentemente, esto supone una activación de la respuesta al estrés y un aumento de chaperones moleculares. Así mismo, esta inhibición de Hsp90 puede conducir a la degradación de las proteínas mediada por el proteasoma. También lleva a un aumento del nivel de chaperonas como las Hsp70 y Hsp40. En conjunto, tenemos un efecto protector mejorado contra la agregación de proteínas y una toxicidad proteica reducida (Aguilà y Cheetham, 2016).

Recientemente, se ha observado que Hsp90 regula la agregación yuxtannuclear de proteínas que son dirigidas por la red de microtúbulos. Los agregados de proteínas formados en la periferia de la célula son transferidos a lo largo de los microtúbulos a un lugar yuxtannuclear donde forman agregosomas. Una forma de prevenir estos agregosomas sería despolimerizar los microtúbulos mediante fármacos o prevenir la función Hsp90 (Kaarniranta et al., 2009).

Hsp90 desempeña un papel indispensable en la homeostasis de la retina puesto que una inhibición prolongada de Hsp90 conduce a la muerte de células fotorreceptoras. Hsp90 se expresa también en las células del EPR y aumenta su expresión durante el desarrollo de la DMAE. Hsp90 de células necrosadas del EPR estimula la inflamación de células adyacentes sanas del EPR. Para evitar esta inflamación sería necesaria la inhibición de Hsp90. Uno de estos inhibidores, geldanamicina, es inhibidor también del VEGF inducido por hipoxia en células del EPR. De esta forma podemos deducir que la inhibición de Hsp90 podría evitar la inflamación y angiogénesis que se da en la DMAE (Aguilà y Cheetham, 2016).

Por otro lado, la chaperona Hsc70 tiene como una de sus funciones participar en la autofagia mediada por chaperonas y la inhibición de la agregación de proteínas durante condiciones de estrés (Bukau et al., 2006). La forma citosólica de Hsc70 reconoce la secuencia KFERQ en el sustrato y lo dirige para su degradación por autofagia. Hsc70 se unen a la membrana lisosomal. Otra forma de Hsc70 también existe en la luz lisosomal. Si tratamos con anticuerpos

inhibidores de lisosomas, esto conduce también a la inhibición de la autofagia indirectamente por la inhibición de la función lisosomal de Hsc70 lisosomal (Kaarniranta et al., 2009).

Además, la síntesis de Hsp está estrechamente conectada al sistema ubiquitina-proteosoma, ya que la inhibición de la maquinaria del proteosoma y la acumulación de proteínas altamente ubiquitinadas inducen HSF-1 y una posterior respuesta del gen Hsp. Si la capacidad de las Hsp para reparar daños en proteínas es insuficiente o la degradación por parte del proteosoma se ve comprometida, se formarán agregados de proteínas en la periferia celular que serán transferidos a una ubicación yuxtannuclear y se formarán los agregosomas (Kaarniranta et al., 2009).

Por último cabe destacar por su relevancia en el ojo un tipo de chaperonas denominadas  $\alpha$ -cristalinas. Estas son proteínas importantes en la retina con diversas funciones. Entre ellas está su función de chaperonas además de propiedades antiinflamatorias, antifibrilares y antiapoptóticas, protección contra el estrés, implicación en la autofagia, modulación de la angiogénesis, así como interacciones proteína-proteína con una gran variedad de proteínas (Kannan et al., 2016).

Como función chaperona, se une para corregir proteínas mal plegadas y prevenir agregaciones de proteínas. En la misma línea y relacionándolo con sus propiedades antiapoptóticas, su función de plegamiento de proteínas previene la activación de la apoptosis así como de factores tales como el NF- $\kappa$ B (Kannan et al., 2016).

En cuanto a su implicación en la protección contra el estrés oxidativo, se ha demostrado que las células del EPR que sobreexpresan las  $\alpha$ -cristalinas son resistentes a la muerte celular inducida por  $H_2O_2$ . Además, contienen GSH aumentado. Sin embargo, el estrés prolongado disminuye los niveles de  $\alpha$ -cristalinas, de manera que las células serán más susceptibles a muerte celular inducida por estrés (Kannan et al., 2016).

Como sabemos, uno de los mecanismos que mantienen la proteostasis es la autofagia, que se encuentra aumentada en situaciones de daño celular y que facilita la eliminación de agregados de proteínas. Uno de las formas de autofagia es la mediada por chaperonas. Es aquí donde las  $\alpha$ -cristalinas entran en juego. Ciertamente, en presencia de estrés oxidativo agudo, se aumenta la expresión de las  $\alpha$ -cristalinas y como consecuencia también hay un aumento de la autofagia. Sin embargo, ante estrés oxidativo crónico se reduce tanto las  $\alpha$ -cristalinas como la autofagia y así se ha corroborado en ojos de pacientes donantes con DMAE (Kannan et al., 2016).

## 2.4 Vía de la ubiquitina-proteosoma en el ojo

La observación de que la retina, como otros muchos tejidos, acumula proteínas durante el envejecimiento, indica que el control de calidad de proteínas es esencial para la salud de la retina. Entre los sistemas de degradación de proteínas dañadas encontramos la vía ubiquitina-proteosoma. Respecto a los otros sistemas proteolíticos como la autofagia, existe poca información sobre su papel en las enfermedades de la retina, pero parece ser que una disminución tanto de la autofagia como de la actividad lisosómica se asocian con el envejecimiento de la retina y DMAE (Shang y Taylor, 2012; Mettu et al., 2012).

Las proteínas dañadas o modificadas en los ojos se degradan selectivamente por la vía ubiquitina-proteosoma y la disfunción de ésta puede contribuir a enfermedades relacionadas con la edad, como la opacidad del cristalino (catarata) y la DMAE. Sin embargo, también la vía proteolítica lisosomal juega un papel importante en la degradación de proteínas en el EPR. Aunque la primera vía sea más eficiente en la degradación de proteínas citoplásmicas solubles y la segunda degrade principalmente proteínas unidas a orgánulos o a la membrana, puede haber superposición para algunos sustratos entre las dos vías. Parece que se complementan y respaldan entre ellas en la eliminación de las proteínas dañadas (Kaarniranta et al., 2009; Shang y Taylor, 2012).

Tal mecanismo de respaldo fue indicado en un estudio sobre la degradación de proteínas glicadas en cultivos de EPR. La glicación es una modificación postraduccional que puede tener consecuencias adversas en relación con enfermedades oculares. Las proteínas glicadas y los productos finales de glicación avanzada se acumulan de forma acelerada al envejecer en la retina, específicamente en drusas, y el proceso se acelera aún más en condiciones diabéticas (Handa, 2012). El consumo de dietas de alto índice glucémico, uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de la DMAE en los seres humanos, también acelera la acumulación de AGE en los tejidos de los ojos. La glicación induce cambios irreversibles en las estructuras proteicas y conduce a la pérdida de actividad o agregación y toxicidad. Además, parece ser que las proteínas glicosiladas son resistentes a la degradación por la vía ubiquitina-proteosoma. Existen datos en cultivos de EPR que indican que las proteínas glicosiladas y ubiquitinadas llegan al lisosoma cuando el proteosoma no es funcional. Además, el deterioro de la vía ubiquitina-proteosoma en el EPR activa la vía autofágica (Shang y Taylor, 2012; Taylor, 2012).

Como ya dijimos, en condiciones homeostáticas normales, las vías del proteosoma y del lisosoma funcionan independientemente o en concierto para mantener la proteostasis. Sin embargo, sobre el estrés crónico y el envejecimiento estas capacidades son insuficientes para

mantener la proteostasis. Esto da lugar a la acumulación de proteínas dañadas llevando al desarrollo de lesiones similares a la DMAE (Shang y Taylor, 2012).

Es sabido que las proteínas oxidadas debido al estrés oxidativo se degradan preferentemente por la vía ubiquitina-proteosoma. Un aumento transitorio en los niveles de estas proteínas que se ubiquitinan se correlaciona con el aumento de la proteólisis intracelular durante la recuperación de un estrés oxidativo leve, también implica que la vía ubiquitina-proteosoma participa en la restitución de la proteostasis durante la recuperación del estrés oxidativo (Shang y Taylor, 2012).

Aunque en la actualidad hay escasos datos sobre la degradación de las proteínas oxidadas en la retina o el EPR por el proteosoma, los resultados canónicos de las funciones de esta vía en la mayoría de los tejidos sugieren que esto es extrapolable también al tejido retiniano. Además, dada la destacada relación etiológica entre la oxidación, el aumento de los niveles de proteínas oxidadas en la retina y en el EPR, acumulación de agregados y retinopatía, el papel del proteosoma en la retina representa un desafío para estudios futuros (Zhang et al., 2008).

#### **2.4.1 Importancia de la vía ubiquitina-proteosoma en la retina**

La vía de degradación ubiquitina-proteosoma juega un papel importante en diversas funciones en la retina. Esta vía participa activamente en el buen desarrollo y formación de la retina. En la formación de los conos deben eliminarse por apoptosis una serie de células pigmentarias. Muchos mutantes que causan apoptosis anormal y ojos anormales se encuentran relacionados con aberraciones en la función de ubiquitina-proteosoma, lo que indica que esta vía desempeña un papel importante en la regulación de la apoptosis (Shang y Taylor, 2012).

Por otro lado, la señalización celular eficiente y adecuada es esencial para la salud de la retina. Y una de las funciones más importantes de la vía ubiquitina-proteosoma es regular el proceso de señalización intracelular a través de la degradación de reguladores de las vías de señalización tales como la vía NF- $\kappa$ B o la vía de señalización inducida por hipoxia. La regulación adecuada de estas vías es esencial para el desarrollo y las funciones visuales y su desregulación pueden conducir a la degeneración retiniana. Concretamente, la activación de NF- $\kappa$ B en células oculares depende de la actividad del proteosoma, como ya sabemos (Angosto, 2005). Pues si el proteosoma está dañado o tiene una actividad deficiente se inhibe la activación de NF- $\kappa$ B, por tanto en condiciones de recuperación del estrés oxidativo, se reduce la viabilidad celular (Wu et al., 2009).

También participa en la regulación de la angiogénesis, característica de la DMAE húmeda. Ante condiciones de hipoxia se activa el factor inducible de hipoxia (HIF). Esto da lugar a la formación de nuevos vasos sanguíneos así como a la transcripción de una serie de factores proangiogénicos, tales como VEGF. Existen dos subunidades de HIF (HIF-a y HIF-b), siendo HIF-a regulado a través de su degradación en el proteosoma. Las enzimas desubiquitinantes también están implicadas en la regulación de la estabilidad de HIF-1a eliminando la ubiquitina del sustrato. El fracaso de la degradación de HIF-1a aumenta la expresión y secreción de VEGF y otros factores proangiogénicos, como los observados en la DMAE y la retinopatía diabética (Shang y Taylor, 2012; Bhutto y Luty, 2012).

#### **2.4.2 Relación del estrés oxidativo con la vía ubiquitina-proteosoma**

La capacidad de esta vía para degradar proteínas se altera en respuesta al estrés oxidativo. Puesto que el estrés oxidativo da lugar a un aumento de proteínas dañadas, esto supone también un aumento de la degradación de las mismas por parte de la vía ubiquitina-proteosoma (Shang y Taylor, 2012).

Sin embargo, este aumento solo se observa cuando el estrés oxidativo es leve o medio. Al tiempo en el que se aumenta la actividad de la vía, sus componentes están expuestos al daño por estrés oxidativo puesto que tienen grupos sulfhidrilos en sus sitios activos. Esto es, el estrés oxidativo reduce rápidamente un antioxidante, el glutatión reducido (GSH), y eleva los niveles de glutatión oxidado (GSSG). Éste último reacciona con los residuos de cisteína en el sitio activo de enzimas que catalizan la ubiquitinación, formando enlaces disulfuro y bloqueando su unión a ubiquitina (Shang y Taylor, 2012).

Por lo tanto, ante el estrés oxidativo moderado aumenta la susceptibilidad de las proteínas a la degradación y aumenta la capacidad proteolítica. Por el contrario, el estrés oxidativo elevado pero no letal afecta las funciones de la vía ubiquitina-proteosoma, reduciendo así la degradación intracelular de las proteínas que lleva a la agregación de proteínas anormales, potencialmente citotóxicas (Wu et al., 2009).

Debido a una elevación de los niveles de GSSG, las enzimas de ubiquitinación sufren una S-tiolación reversible. Esto puede tener un papel protector previniendo la ubiquitinación y degradación de proteínas esenciales, modificadas reversiblemente. También serviría para evitar la oxidación irreversible de los residuos de cisteína de los centros activos de estas enzimas permitiendo la recuperación de actividad cuando se restaura el estado redox (Shang y Taylor, 2012).

A su vez, el proteosoma es más susceptible de ser dañado por el estrés oxidativo que las enzimas que catalizan la ubiquitinación. Esto explica por qué los niveles de conjugados de ubiquitina aumentan en respuesta al estrés oxidativo en diversos tipos de células (Shang y Taylor, 2012).

### **2.4.3 Consecuencias de la desregulación de la vía ubiquitina-proteosoma en la retina**

El deterioro de la función de la ubiquitina-proteosoma puede contribuir a la acumulación y la agregación de diversas formas de proteínas dañadas, como las observadas en depósitos subretinianos. Sin embargo, el aumento de actividad de la misma ante estrés oxidativo moderado puede promover la degradación de las proteínas funcionales y perjudicar las funciones de la visión. Por ejemplo, la degradación de la rodopsina causa deficiencia de esta proteína crítica de fototransducción y altera la función anormal de la retina (Ozawa et al. 2008).

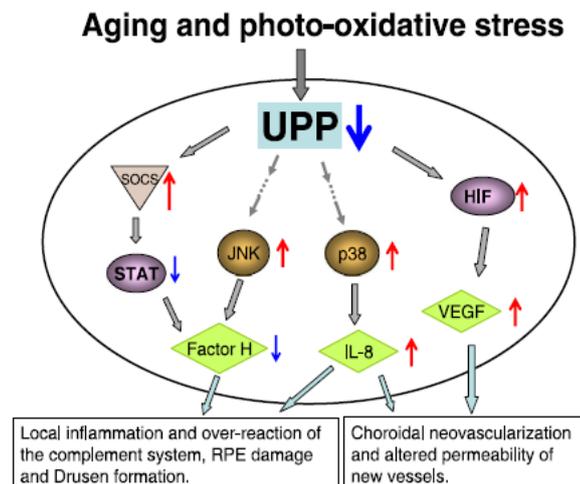
Por otro lado, la acumulación de ubiquitina o conjugados de ubiquitina es prominente en los depósitos que se forman debajo del EPR y que constituyen las drusas. La presencia de estos depósitos de ubiquitina respalda la inactividad del proteosoma. Varias "enfermedades amiloides" están asociadas a esta acumulación. Algunos ejemplos concretos de depósitos que contienen ubiquitina son los cuerpos de Lewy que aparecen en muchos síndromes neurológicos relacionados con el envejecimiento. Además, los estudios muestran que la  $\alpha$ -sinucleína, una molécula neuronal específica de funciones desconocidas, es un sustrato para la ubiquitina-proteosoma y podemos encontrarla dentro de depósitos neurofibrilares en cerebros de pacientes con Parkinson y con función anormal de los ojos. Esto corrobora el concepto de que la actividad limitada de la vía ubiquitina-proteosoma está causalmente relacionada con las "enfermedades amiloides". La influencia de estos depósitos sobre las funciones fisiológicas aún se desconocen, pero las drusas características de la DMAE podrían hacer incluir esta enfermedad entre las "enfermedades amiloides" relacionadas con la edad (Shang y Taylor, 2012).

El deterioro de la vía ubiquitina-proteosoma en el EPR también aumenta la proangiogénesis y la expresión de factores proinflamatorios. Se acumulan factores como el HIF-1a y, consecuentemente, aumenta la expresión de VEGF que lleva a angiogénesis retiniana y coroidea, como la observada en la DMAE húmeda. La inhibición prolongada del proteosoma en EPR también favorece la expresión de IL-8, que es proinflamatorio y proangiogénico. La inhibición de la señalización de NF- $\kappa$ B por inhibición del proteosoma también está relacionada con una disminución de la expresión de MCP-1, una proteína quimiotáctica. La deficiencia de

MCP-1 se ha estudiado en ratones y causa lesiones similares a las que se produce en la DMAE, como acumulación de lipofuscina en EPR, atrofia de fotorreceptores y crecimiento de neovasos. Por tanto, esta disminución de MCP-1 debida a la disfunción del proteosoma puede estar relacionada con la patogénesis de la DMAE (Shang y Taylor, 2012).

Sin embargo, se ha comparado la actividad del proteosoma en la retina de los ojos de donantes con diferentes grados de DMAE y se encontró que la actividad quimotripsina del proteosoma aumenta en la retina con la progresión de la enfermedad (Ethen et al., 2007). Igualmente también se ha observado un aumento de inmunoproteosomas. Esto sugiere que el proteosoma constitutivo está siendo reemplazado por el inmunoproteosoma en la retina de pacientes con DMAE, probablemente debido a la inflamación local o estrés oxidativo. Este aumento del inmunoproteosoma en respuesta a la lesión retiniana y cerebral sugiere que el inmunoproteosoma pueda tener un papel protector neuronal o reparador de daños en la primera etapa del desarrollo de la DMAE. No obstante, a la larga, la respuesta del sistema inmune aumentaría la inflamación que agravaría la patología (Shang y Taylor, 2012; Ethen et al., 2007).

Tomados en conjunto, estos datos implican que el deterioro de la vía ubiquitina-proteosoma relacionado con la edad o el estrés puede contribuir a la patogénesis de la DMAE y otras enfermedades oculares relacionadas con la edad (Figura 8) (Shang y Taylor, 2012).



**Figura 8. Consecuencias de la desregulación de la vía ubiquitina-proteosoma. Tomada de Shang y Taylor, 2012.**

### 2.5 Autofagia

Se han descrito tres rutas autofágicas distintas: macroautofagia (o simplemente autofagia), microautofagia y autofagia mediada por chaperonas (AMC). En la macroautofagia, una porción

del citoplasma que se va a degradar se envuelve primero dentro de un orgánulo especializado, el autofagosoma, que luego se fusiona con las vesículas lisosómicas para su degradación. En la microautofagia, la propia membrana lisosomal secuestra una parte del citoplasma. En la AMC, las proteínas que poseen una señal de una secuencia específica son transportadas hasta el lisosoma. La microautofagia no es común en células mamíferas. Por tanto, nos centraremos en las otras dos rutas autofágicas (Kaarniranta et al., 2009).

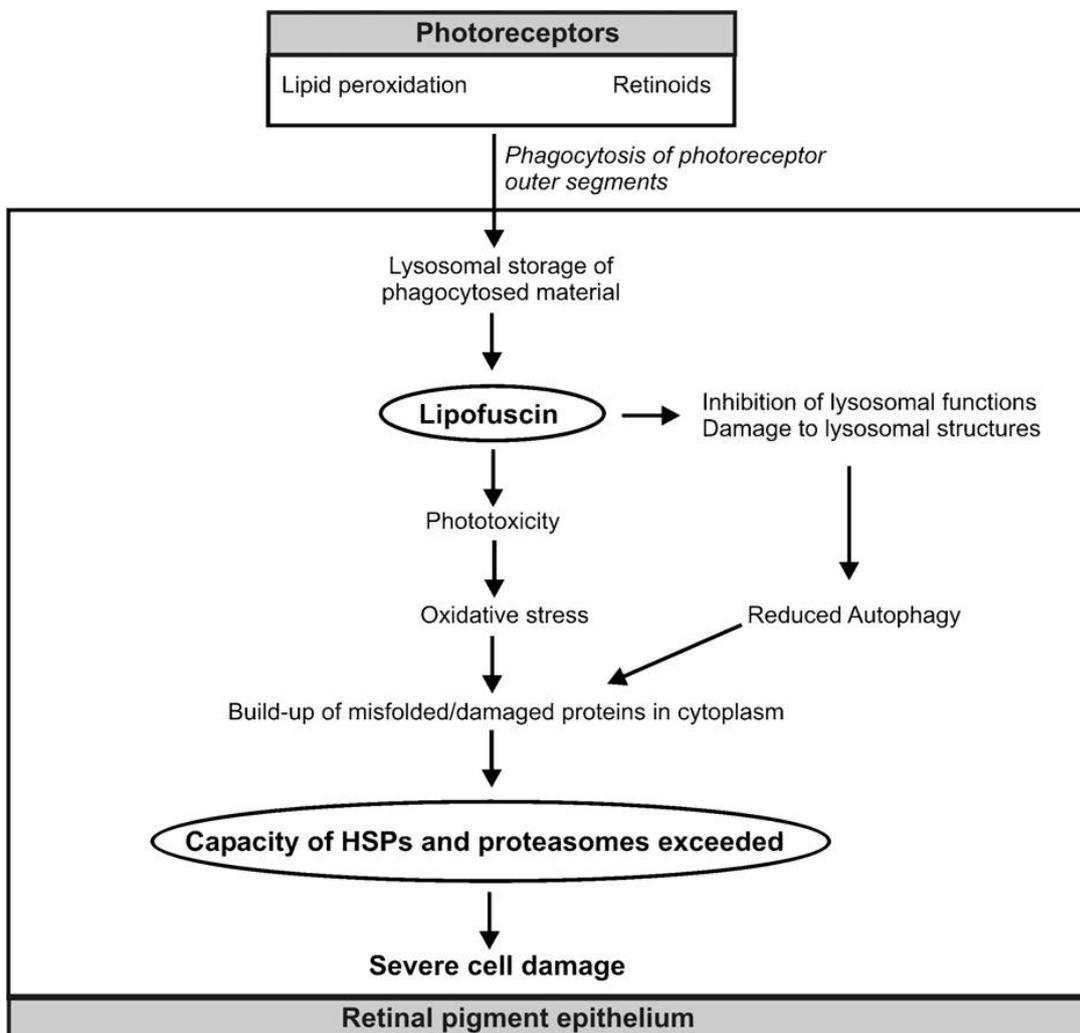
La macroautofagia se activa en condiciones de estrés. La disminución de la autofagia en tejido nervioso lleva a acumulación de proteínas ubiquitinadas y neurodegeneración (Kaarniranta et al., 2009; Mettu et al., 2012).

La AMC se vale de chaperonas citosólicas que reconocen proteínas señalizadas para su degradación en los lisosomas. La proteína de membrana asociada a los lisosomas 2A (LAMP-2A) actúa como un receptor para la AMC, uniéndose a las proteínas diana. El nivel de LAMP-2A repercute en la actividad de la AMC de forma directa, es decir, una disminución de LAMP-2A supone una disminución de la AMC, sin embargo, la macroautofagia se aumenta en compensación. La proteína Hsc70 favorece la translocación de los sustratos a través de las membranas de los lisosomas. Se piensa que Hsc70 es necesario para dirigir a las proteínas dianas hacia el lumen de los lisosomas de igual forma que las Hsp70 lo hacen para arrastrar a las proteínas a la luz del retículo endoplásmico. Parece ser que Hsp70 está presente en las fracciones lisosómicas de células del EPR. Por lo tanto, se podría prever que el papel de Hsp70 en la proteólisis lisosómica se reflejaría en autofagia en las células del EPR. Además, parece que Hsp70 es un importante factor citoprotector en las células del EPR, especialmente cuando la proteólisis es perturbada (Kaarniranta et al., 2009).

La AMC se activa durante el estrés oxidativo. En un estudio se demostró que la exposición aguda al  $H_2O_2$  conduce a la activación autofágica (Mitter et al., 2014). Las proteínas diana de esta vía son aún más susceptibles a ser reconocidas por las chaperonas después de haber sido oxidadas. Esto se debe, al menos parcialmente, al hecho de que las proteínas oxidadas son más fáciles de desplegar, requisito para su translocación a través de la membrana lisosomal (Kaarniranta et al., 2009).

También se estudió si el estrés oxidativo crónico, implicado en la patogénesis de la DMAE y otros trastornos neurodegenerativos, afectaba a la autofagia en cultivos de EPR. Se demostró que una exposición repetida a  $H_2O_2$  producía una disminución de la autofagia en células del EPR (Mitter et al., 2014).

Sin embargo, la actividad de la AMC disminuye con la edad. Por tanto, esto también contribuye a la acumulación de proteínas alteradas. La disminución en la actividad de la AMC con la edad se debe a la reducción de los niveles de LAMP-2A en la membrana lisosomal. Un estudio mostró que la actividad de la AMC se puede mantener en el hígado de ratón de edad avanzada si se evita la disminución de LAMP-2A. De esta forma, no sólo se restaura la actividad de la AMC, sino también las vías macroautofágica y proteosomal. Además, los niveles de proteínas oxidadas y agregados de proteínas poliubiquitinadas se redujeron. Estos hallazgos sugieren que el aumento de la actividad de la AMC también podría prevenir la degeneración relacionada con la edad en células del EPR (Kaarniranta et al., 2009).



**Figura 9.** Proceso de desregulación de los mecanismos que mantienen la proteostasis en el EPR. Tomada de Kaarniranta et al., 2009.

Cada día, las células del EPR funcionan como componentes fagocíticos digiriendo los fragmentos externos de los fotorreceptores. Sin embargo, el envejecimiento del EPR provoca una disminución de la proteólisis por parte de los lisosomas que lleva a la acumulación de

lipofuscina (Kaarniranta et al., 2009; Mettu et al., 2012). Se estudió que inhibiendo la autofagia se formaban acúmulos de lipofuscina (Mitter et al., 2014). Por tanto, el aumento de los depósitos de lipofuscina se asocia con la gravedad de la DMAE (Figura 9) (Kaarniranta et al., 2009).

### **Conclusiones**

Considerando las publicaciones recientes podemos concluir que los mecanismos implicados en la proteostasis celular son el proteosoma, las chaperonas (destacando las proteínas de choque térmico) y la autofagia. Estos mecanismos se encuentran disminuidos con la edad y por el estrés oxidativo.

La DMAE se caracteriza por la pérdida de visión por la degeneración del EPR y llegando incluso a la formación de neovasos que agravan la enfermedad. Concluimos que la principal causa de la DMAE es el estrés oxidativo y que el principal factor que regula el balance redox parece ser el Nrf2. A su vez, este factor se encuentra regulado por p62. Con la edad, los niveles de p62 aumentan, sin embargo, esto puede agravar la DMAE ya que favorece la inflamación.

Al igual que en las demás enfermedades neurodegenerativas, los mecanismos que mantienen la proteostasis se encuentran disminuidos en la DMAE. Aunque el estrés leve active estos mecanismos, el estrés crónico los disminuye. El sistema principal de degradación de proteínas dañadas parece ser la vía ubiquitina-proteosoma. Su desregulación origina agregados de estas proteínas que pueden llevar a la constitución de las drusas características de la DMAE. Además, esta disminución del sistema ubiquitina-proteosoma hace que se sobreexpresen VEGF dando lugar a la angiogénesis. Por otro lado, como en las enfermedades neurodegenerativas, donde la inflamación es un marcador característico, hay una sobreexpresión del inmunoproteosoma, que parece tener un papel protector al inicio de la enfermedad, pero que a la larga puede agravar el desarrollo de la misma. Así mismo, las  $\alpha$ -cristalinas del EPR también se encuentran disminuidas así como la actividad autofágica.

Todo ello, desencadena un cúmulo de proteínas, el incremento de la inflamación y la proangiogénesis, característicos de la DMAE.

Sería necesario, por tanto, trabajar en la investigación de posibles dianas terapéuticas que actúen en la regulación de los mecanismos que mantienen la proteostasis para lograr frenar el desarrollo de la DMAE.

## **Bibliografía**

Aguilà M, Cheetham ME. Retinal Degenerative Diseases. *Adv Exp Med Biol* . 2016;854:161-7.

Angosto M. Vía de la ubiquitina-proteosoma. *Anal. Real Acad. Nac. Farm.* 2005;71:45-82.

Bhutto I, Luty G. Understanding age-related macular degeneration (AMD): Relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex. *Mol. Aspects Med. Elsevier Ltd*; 2012;33(4):295-317.

Bukau B, Weissman J, Horwich A. Molecular Chaperones and Protein Quality Control. *Cell. Elsevier Inc.*; 2006;125(3):443-51.

Chen C, Cano M, Wang JJ, Li J, Huang C, Yu Q, et al. Role of unfolded protein response dysregulation in oxidative injury of retinal pigment epithelial cells. *Antioxid. Redox Signal.* 2014;20(14):2091-106.

Dubnikov T, Ben-gedalya T, Cohen E. Protein Quality Control in Health and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017;9(3):1-14.

Enzo Life Sciences. Proteostasis. 2017 [citado 13 de marzo de 2017]. Recuperado a partir de: <http://www.enzolifesciences.com/platforms/proteostasis/>

Ethen CM, Hussong SA, Reilly C, Feng X, Olsen TW, Ferrington DA. Transformation of the proteasome with age-related macular degeneration. *FEBS Lett.* 2007;581(5):885-90.

Franco JD, Fagundo E, Gómez-Antúnez R G-DR. El proteosoma. *Docplayer.* 2008 [citado 20 de febrero de 2017]. Recuperado a partir de: <http://docplayer.es/14266814-El-proteosoma-jd-franco-e-fagundo-r-gomez-antunez-r-gomez-dominguez.html>

Fundación General CSIC. El envejecimiento de la población. *Lychnos Cuad. la Fund. Gen. CSIC. Fundación General CSIC*; 2010 [citado 15 de febrero de 2017]. Recuperado a partir de: [http://www.fgcsic.es/lychnos/es\\_es/articulos/envejecimiento\\_poblacion](http://www.fgcsic.es/lychnos/es_es/articulos/envejecimiento_poblacion)

Garcés M. Estudio Sobre Las Enfermedades Neurodegenerativas En España Y Su Impacto Económico Y Social. *Neuroalianza Madrid. Madrid*; 2016.

Handa JT. How does the macula protect itself from oxidative stress? *Mol. Aspects Med. Elsevier Ltd*; 2012;33(4):418-35.

Hispano-300. Bioquímica del Metabolismo: La degradación de Proteínas. 2015 [citado 14 de junio de 2017]. Recuperado a partir de: [http://ayudahispano-3000.blogspot.com.es/2015/05/bioquimica-del-metabolismo\\_48.html](http://ayudahispano-3000.blogspot.com.es/2015/05/bioquimica-del-metabolismo_48.html)

Jarrett SG, Boulton ME. Consequences of oxidative stress in age-related macular degeneration. *Mol. Aspects Med.* Elsevier Ltd; 2012;33(4):399-417.

Kaarniranta K, Salminen A, Eskelinen EL, Kopitz J. Heat shock proteins as gatekeepers of proteolytic pathways-Implications for age-related macular degeneration (AMD). *Ageing Res. Rev.* 2009;8(2):128-39.

Kannan R, Sreekumar PG HD. Alpha Crystallins in the Retinal Pigment Epithelium and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Age-Related Macular Degeneration. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1860(100):258-68.

Kloetzel P-M. The proteasome and MHC class I antigen processing. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 2004;1695(1-3):225-33.

Korolchuk VI, Mansilla A, Menzies FM, Rubinsztein DC. Autophagy Inhibition Compromises Degradation of Ubiquitin-Proteasome Pathway Substrates. *Mol. Cell.* Elsevier Ltd; 2009;33(4):517-27.

López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013;153(6):1194-217.

Medicina molecular. Proteolisis intracelular (Proteasoma). 2008 [citado 12 de febrero de 2017]. Recuperado a partir de: <http://medmol.es/temas/79/>

Mettu PS, Wielgus AR, Ong SS, Cousins SW. Retinal pigment epithelium response to oxidant injury in the pathogenesis of early age-related macular degeneration. *Mol. Aspects Med.* Elsevier Ltd; 2012;33(4):376-98.

Mitter SK, Song C, Qi X, Mao H, Rao H, Akin D, et al. Dysregulated autophagy in the RPE is associated with increased susceptibility to oxidative stress and AMD. *Autophagy.* 2014;10(11):1989-2005.

Monés J. DMAE exudativa o húmeda. *Inst. la Màcula.* 2017 [citado 16 de marzo de 2017]. Recuperado a partir de: <http://www.institutmacula.com/patologia/dmae-exudativa-o-humeda/>

Ozawa Y, Nakao K, Kurihara T, Shimazaki T, Shimmura S, Ishida S, et al. Roles of STAT3/SOCS3 pathway in regulating the visual function and ubiquitin-proteasome-dependent degradation of rhodopsin during retinal inflammation. *J. Biol. Chem.* 2008;283(36):24561-70.

Rangasamy T, Cho CY, Thimmulappa RK, Zhen L, Srisuma SS, Kensler TW, et al. Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J. Clin. Invest.* 2004;114(9):1248-59.

Rutar M, Provis JM. Role of chemokines in shaping macrophage activity in AMD. En: Al. CBR et, editor. *Adv. Exp. Med. Biol.* Canberra: Springer International Publishing; 2016. p. 11-6.

Sauer T, Patel M, Chan C-C, Tuo J. Unfolding the Therapeutic Potential of Chemical Chaperones for Age-related Macular Degeneration. *Expert Rev. Ophthalmol.* 2008;3(1):29-42.

Shang F, Taylor A. Roles for the ubiquitin-proteasome pathway in protein quality control and signaling in the retina: Implications in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Mol. Aspects Med.* Elsevier Ltd; 2012;33(4):446-66.

Taylor A. Introduction to the issue regarding research regarding age related macular degeneration. *Mol. Aspects Med.* 2012;33:291-4.

Triana-Martínez F, Gómez-Quiroz LE, Fainstein MK. El Flujo de la Información y la Proteostasis: Consecuencias Fisiológicas. *REB.* 2012;31(4):136-44.

Uchiki T, Weikel KA, Jiao W, Shang F, Caceres A, Pawlak D, Handa JT, Brownlee M, Nagaraj R TA. Glycation-altered proteolysis as a pathobiologic mechanism that links dietary glycemic index, aging, and age-related disease (in non diabetics). *Aging Cell.* 2012;11(1):1-13.

Verdaguer J. Degeneración macular relacionada a la edad. *Rev. Médica Clínica Las Condes.* Elsevier; 2010;21(6):949-55.

Wang L, Ebrahimi KB, Chyn M, Cano M, Handa JT. Biology of p62/sequestosome-1 in age-related macular degeneration (AMD). En: Al. CBR et, editor. *Adv. Exp. Med. Biol.* Baltimore: Springer International Publishing; 2016. p. 17-22.

Wong WL, Su X, Li X, Cheung CMG, Klein R, Cheng CY, et al. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob. Heal.* 2014;2(2):106-16.

Wu M, Bian Q, Liu Y, Fernandes AF, Taylor A, Pereira P SF. Sustained Oxidative Stress Inhibits NF- $\kappa$ B Activation Partially via Inactivating the Proteasome. *Free Radic Biol Med.* 2009;46(1):62-9.

Zhang C, Cuervo AM. Restoration of chaperone-mediated autophagy in aging liver improves cellular maintenance and hepatic function. *Nat. Med.* 2008;14(9):959-65.

Zhang X, Zhou J, Fernandes AF, Sparrow JR, Pereira P, Taylor A, et al. the Proteasome Is a Target of Oxidative Damage in. *Nutr. Res.* 2009;49(8):3622-30.