



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ESTUDIO MOLECULAR DE LA MUERTE AUTOFÁGICA EN
OVOCITOS DE RATA PRE-PÚBER (1-28 DÍAS)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:
BIOL. ABRAHAM CASTRO CRUZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:
DRA. MARÍA LUISA ESCOBAR SÁNCHEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DRA. OLGA MARGARITA ECHEVERRÍA MARTÍNEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

DR. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ESTUDIO MOLECULAR DE LA MUERTE AUTOFÁGICA EN
OVOCITOS DE RATA PRE-PÚBER (1-28 DÍAS)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:
BIOL. ABRAHAM CASTRO CRUZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:
DRA. MARÍA LUISA ESCOBAR SÁNCHEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DRA. OLGA MARGARITA ECHEVERRÍA MARTÍNEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

DR. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
OFICIO FCIE/DAIP/0332/2022
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **02 de mayo de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del estudiante **CASTRO CRUZ ABRAHAM** con número de cuenta **414001730** con la tesis titulada **“Estudio molecular de la muerte autofágica en ovocitos de rata pre-púber (1-28 días)”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA LUISA ESCOBAR SÁNCHEZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: **DRA. SUSANA CASTRO OBREGÓN**
Vocal: **DR. HUGO LÓPEZ MUÑOZ**
Vocal: **DRA. MARÍA SANDRA CABRERA BENÍTEZ**
Vocal: **DRA. MARIA ISABEL SOTO CRUZ**
Secretario: **DRA. OLGA MARGARITA ECHEVERRÍA MARTÍNEZ**

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 03 de agosto de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al Posgrado en Ciencias Biológicas (PCBiol), UNAM, por permitirme el desarrollo de las actividades académicas y de investigación y formarme como Maestro en Ciencias.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT), por el apoyo otorgado a través de la beca no. 859417 para la realización de mis estudios de posgrado.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM, por los recursos económicos proporcionados para la adquisición de materiales y reactivos necesarios para desarrollar esta investigación a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), proyectos: IN227919, IN219221, IN215922.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Microscopía Electrónica, Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. María Luisa Escobar Sánchez.

A los integrantes de mi comité tutor, la Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez y el Dr. Luis Sánchez Sánchez, por sus valiosas aportaciones durante la realización de este proyecto.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la Dra. María Luisa Escobar Sánchez, por su total apoyo en mi formación como investigador, su paciencia, su dedicación. Gracias por compartir su experiencia y grandes conocimientos. Mil gracias.

A los miembros del jurado, la Dra. Susana Castro Obregón (presidenta), la Dra. María Sandra Cabrera Benítez (vocal), el Dr. Hugo López Muñoz (vocal), la Dra. María Isabel Soto Cruz (vocal) y la Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez (secretaria), por sus comentarios y sugerencias que ayudaron a enriquecer esta tesis.

Al M. en C. Christian Alan Cabello Hernández, por su asistencia y ayuda técnica en el bioterio de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Al Dr. Israel Muñoz Velasco, por su apoyo técnico durante la realización de este proyecto, asistencia en el procesamiento de imágenes, ayuda en los cortes de parafina y amistad.

A la M. en C. Silvia Juárez Chavero, por su apoyo técnico durante la realización de este proyecto y su ayuda en el procesamiento de material biológico.

A la Dra. Nayeli Torres Ramírez y a la Dra. Rosario Ortiz Hernández, por su invaluable apoyo intelectual y amistad.

A mis amigos del Laboratorio de Microscopía Electrónica, por hacer de mi estancia en el laboratorio una experiencia memorable.

Al Dr. Octavio Reyes Salas y al c. a Dr. Ulrich Briones Guerash Silva, por sus consejos y su fuente inagotable de ayuda en mi formación académica y personal.

A mis hermanos, gracias por todo su apoyo, valoro mucho cada palabra, cada abrazo y cada risa, gracias por todo eso que me da ánimos para seguir adelante.

A Soco, por su amor, paciencia y apoyo incondicional que siempre me ha brindado, especialmente para la conclusión de este trabajo.

CONTENIDO

I.	ABREVIATURAS.....	1
II.	ÍNDICE DE FIGURAS.....	3
III.	RESUMEN.....	5
IV.	ABSTRACT.....	7
V.	INTRODUCCIÓN.....	9
	MUERTE CELULAR	9
	APOPTOSIS	9
	NECROSIS	16
	NECROPTOSIS	16
	PARAPTOSIS	18
	AUTOFAGIA	20
	Regulación del inicio de la autofagia.....	24
	Vías de señalización dependientes de mTOR.....	25
	Vías de señalización independientes de mTOR.....	30
	Inicio de la autofagia.....	34
	Formación del fagóforo.....	35
	Elongación del fagóforo y formación de autofagosomas.....	37
	Maduración del autofagosoma.....	40
	Fusión del autofagosoma con lisosomas.....	41
	OVARIO	44
	FOLICULOGÉNESIS	45
	ATRESIA FOLICULAR	46
VI.	ANTECEDENTES RELEVANTES.....	50
VII.	HIPÓTESIS.....	50
VIII.	OBJETIVO GENERAL.....	50
IX.	OBJETIVOS PARTICULARES.....	51
X.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	51
	PARTE I ANÁLISIS “ <i>IN SITU</i> ”.....	51
	PARTE II ANÁLISIS “ <i>IN VITRO</i> ”.....	56
XI.	RESULTADOS.....	58
XII.	DISCUSIÓN.....	87
XIII.	CONCLUSIONES.....	90
XIV.	PERSPECTIVAS.....	92
XV.	REFERENCIAS CITADAS.....	93
XVI.	ANEXOS.....	105

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AKT/ PKB: Akt cinasa/Proteína cinasa B (*Akt kinase/Protein kinase B*)

AMH: Hormona antimülleriana (*Anti-Müllerian hormone*)

AMPK: Proteína cinasa activada por AMP (*Protein Kinase AMP-Activated*)

ATG: Genes Relacionados con Autofagia

ATP: Adenosín Trifosfato (*Adenosine Triphosphate*)

BECN1/ATG6: Beclina 1/Gen Relacionado con Autofagia 6

BMP15: Proteína morfogenética ósea 15 (*Bone morphogenetic protein 15*)

DAPI: 4', 6-diamino-2-fenilindol (*4',6-Diamidino-2-Phenylindole*)

DMEM: Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

FITC: Isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein IsoTioCyanate*)

FSH: Hormona folículo estimulante (*Follicle-stimulating hormone*)

GAR: Región rica en residuos de glicina, arginina, y fenilalanina

GDF9: Factor de Diferenciación del Crecimiento 9 (*Growth differentiation factor 9*)

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropina (*Gonadotropin-releasing hormone*)

HHO: Hipotálamo-Hipófisis-ovario

IGF-I, II: Factor de Crecimiento similar a Insulina I, II (*Insulin-like growth factor-I, II*)

LAMP1/2: Proteínas 1/2 de membrana asociada a lisosomas (*Lysosomal-associated membrane proteins 1/2*)

LC3A: Proteína 1A de Cadena Ligera 3 Asociada a Microtúbulos (*Microtubule associated protein 1A light chain 3*)

LC3-I: LC3 soluble en el citoplasma

LC3-PE/LC3-II: LC3 lipidado con fosfatidiletanolamina

LH: Hormona Luteinizante (*Luteinizing hormone*)

MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos (*Mitogen-activated protein kinases*)

mTOR: Blanco de Rapamicina de mamíferos (*Mammalian target of rapamycin*)

mTORC1: Blanco de Rapamicina de mamíferos Complejo 1 (*Mammalian target of rapamycin complex 1*)

p-mTOR: Blanco de Rapamicina de mamíferos fosforilado (*Phosphorylated Mammalian target of rapamycin*)

PBS: Solución salina amortiguadora con fosfatos (*Phosphate buffered saline*)

PI3-K-III/ Vps34: Complejo Clase III Fosfatidilinositol 3-cinasa/ Clasificación de proteínas vacuolares 34 (*phosphatidylinositol 3-kinase Class III/ mammalian vacuolar protein sorting 34*)

PVDF: Membrana de transferencia de difluoruro de polivinilideno (*polyvinylidene difluoride transfer membrane*)

P62/SQSTM1: Proteína secuestrosoma 1 (*sequestosome 1*)

RT: Rojo Texas (fluorocromo)

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

TBS-T: Solución salina amortiguadora con Tris más detergente Tween 0.1% (*Tris-buffered saline with 0.1% Tween*).

TSC1/2: Complejo de Esclerosis Tuberosa 1/2 (*Tuberous sclerosis complex 1/2*)

ULK1: Cinasa activadora de autofagia Similar a Unc-51 (*UNC-51-like kinase complex 1*)

VPS15: Clasificación de proteínas vacuolares 15 (*Vacuolar protein sorting 15*)

ZP1, 2,3,4: Zona pelúcida glicoproteína 1,2,3,4 (*Zona Pellucida Glycoprotein 1,2,3,4*)

ÍNDICE DE FIGURAS

No. De Figura	Pie de Figura
Figura 1	Estructura de los dominios de las caspasas.
Figura 2	Activación de la caspasa 8.
Figura 3	Vías de señalización que desencadenan la apoptosis.
Figura 4	Ruta de activación de la necroptosis.
Figura 5	Características morfológicas de la paraptosis.
Figura 6	Resumen del proceso de autofagia.
Figura 7	Esquema de las posiciones de los dominios y sitios fosforilados de mTOR.
Figura 8	Componentes y funciones de los complejos mTORC1 y mTORC2.
Figura 9	Componentes reguladores río arriba del complejo TSC1/2.
Figura 10	Regulación de la autofagia por vías independientes de mTOR.
Figura 11	Esquema sobre la regulación del complejo ULK1 por mTORC1 y AMPK.
Figura 12	Receptor de autofagia p62/SQSTM1.
Figura 13	Esquema de la estructura del ovario en mamíferos.
Figura 14	Representación esquemática de las etapas de la foliculogénesis de los mamíferos, los tipos de folículos y la atresia.
Figura 15	Cambios en la reserva ovárica de los folículos primordiales a lo largo de la vida en humanos.
Figura 16	Morfología de folículos viables y atrésicos.
Figura 17	Ovario de 1 día de edad.
Figura 18	Ovario de 5 días de edad.
Figura 19	Ovario de 19 días de edad.
Figura 20	Ovario de 28 días de edad.
Figura 21	Inmunodetección de mTOR en ovocitos con autofagia basal en ovarios de rata de 1, 5, 19 y 28 días de edad.
Figura 22	Inmunodetección de mTOR en ovocitos con autofagia excesiva en ovarios de rata de 1, 5, 19 y 28 días de edad.
Figura 23	Inmunodetección de p-mTOR en ovocitos con autofagia basal en ovarios de rata de 1, 5, 19 y 28 días de edad.
Figura 24	Inmunodetección de p-mTOR en ovocitos con autofagia excesiva en ovarios de rata de 1, 5, 19 y 28 días de edad.
Figura 25	Inmunodetección de LC3A en ovocitos con autofagia basal en ovarios de rata de 1, 5, 19 y 28 días de edad.
Figura 26	Inmunodetección de LC3A en ovocitos con autofagia excesiva en ovarios de rata de 1, 5, 19 y 28 días de edad.
Figura 27	Inmunodetección de LAMP1 en ovocitos con autofagia basal en ovarios de rata de 1, 5, 19 y 28 días de edad.
Figura 28	Inmunodetección de LAMP1 en ovocitos con autofagia excesiva en ovarios de rata de 1, 5, 19 y 28 días de edad.
Figura 29	Inmunodetección de p62/SQSTM1 en ovocitos con autofagia basal en ovarios de rata de 1, 5, 19 y 28 días de edad.
Figura 30	Inmunodetección de p62/SQSTM1 en ovocitos con autofagia excesiva en ovarios de rata de 1, 5, 19 y 28 días de edad.
Figura 31	Representación gráfica de los niveles de intensidad de fluorescencia en ovocitos con autofagia basal y con autofagia excesiva de ovarios de ratas de 1, 5, 19 y 28 días edad.

Figura 32	Dobles inmunolocalizaciones de LAMP1/p-mTOR y LC3A/p-mTOR en ovario de rata de 1 día de edad.
Figura 33	Dobles inmunolocalizaciones de LAMP1/p-mTOR y LC3A/p-mTOR en ovario de rata de 5 días de edad.
Figura 34	Dobles inmunolocalizaciones de LAMP1/p-mTOR y LC3A/p-mTOR en ovario de 19 días de edad.
Figura 35	Dobles inmunolocalizaciones de LAMP1/p-mTOR y LC3A/p-mTOR en ovario de rata de 28 días de edad.
Figura 36	<i>Western Blot</i> representativo que muestran la presencia de mTOR, p-mTOR, Beclina 1, ATG14, ATG4B, LC3A, LAMP1, p62 durante la autofagia en ovocitos de ovario de 19 y 28 días de edad.
Figura 37	Representación gráfica de la cuantificación densitométrica de <i>Western Blot</i> de proteínas autofágicas de ovario de 19 y 28 días de edad.
Figura 38	Señalización de AKT y MAPK en proteínas totales de ovocitos de 19 y 28 días.
Figura 39	Modelo Hipotético de la autofagia en células germinales de ratas pre-púber (19 y 28 días).

RESUMEN

La autofagia juega un papel importante en el desarrollo folicular y la atresia. Los ovarios están en su punto más dinámico antes de la pubertad, cuando el 99 % de los folículos se degradan a través de un proceso conocido como atresia folicular.

En el presente trabajo, se analizó el mecanismo molecular de la autofagia en ovocitos durante su eliminación en folículos atrésicos de ratas Wistar en la etapa pre-púber. Para ello, se realizó una primera etapa "*in situ*", en donde se analizó la morfología de los folículos de ovarios aislados de ratas de 1, 5, 19 y 28 días de edad. Así mismo, se realizó una evaluación de la distribución celular de proteínas relacionadas con el proceso de autofagia, por lo que se inmunodetectaron las proteínas mTOR total y p-mTOR Ser2448 (para determinar la abundancia y la actividad de mTOR, respectivamente), LC3A (indica la presencia de autofagosomas y su localización predominante en la región perinuclear y nuclear), LAMP1 (permite observar la abundancia de lisosomas-autofagolisosomas) y p62/SQSTM1 (receptor autofágico que cuando disminuye es indicador de flujo autofágico). Encontramos que existen diferencias entre la abundancia de mTOR y p-mTOR Ser2448, en donde se reduce p-mTOR Ser2448 en los ovocitos de folículos atrésicos de todas las edades comparada con los ovocitos viables, lo que nos indica que la actividad de mTOR se está disminuyendo durante la autofagia excesiva, y esto coincidió con un aumento de autofagosomas (LC3A), de autofagolisosomas (LAMP1) y la disminución del indicador del flujo autofágico (p62/SQSTM1) en los ovocitos de folículos atrésicos.

Para identificar la relación de mTOR con otras proteínas autofágicas en los ovocitos de 19 y 28 días, analizamos a nivel poblacional "*in vitro*" la abundancia de las proteínas de la ruta de las MAPK y AKT, ya que ambas vías promueven la supervivencia celular y están involucradas en la regulación de la autofagia en células de mamíferos; así como BECN1, ATG14, ATG4B, LC3A, LAMP1, p62/SQSTM1, mTOR y p-mTOR Ser2448. Se encontró una alta cantidad de BECN1 y ATG14, sugiriendo que el complejo PI3-K-III podría tener influencia sobre el evento. Por otra parte, se corroboró una baja presencia de p-mTOR Ser2448 a nivel poblacional. Adicionalmente, se encontró una alta abundancia de p-ERK1/2, por lo tanto, ERK1/2 podría estar participando en la regulación de la muerte celular mediada por autofagia en ovocitos; por el contrario, no se encontró activa la vía de AKT ya que no se observó la presencia tanto de p-AKT1 S473 como de p-RPS6 S235/236, y esto coincide con que esta vía de señalización no está inhibiendo el proceso autofágico en ovocitos de folículos atrésicos.

En conclusión, la atresia folicular en ovocitos de ratas pre-púberes de 19 y 28 días correlaciona con el incremento de marcadores autofágicos, así como la disminución de la actividad de mTOR. La autofagia es antecedida por la inactivación de la señalización de AKT, sugiriendo fuertemente que la autofagia no ocurre por la ausencia de factores de crecimiento, sino al parecer está ocurriendo por la limitación de energía.

Los datos de este trabajo constituyen un paso para entender cómo se desencadena la autofagia en las células germinales de folículos atrésicos.

ABSTRACT

Autophagy plays an important role in follicular development and atresia. The ovaries are at their most dynamic before puberty, when 99% of the follicles are degraded through a process known as follicular atresia.

In the present work, the molecular mechanism of autophagy in oocytes during their elimination in atretic follicles of Wistar rats in the pre-pubertal stage was analyzed. For this purpose, a first stage was carried out "*in situ*", where the morphology of the ovarian follicles isolated from rats of 1, 5, 19 and 28 days of age was analyzed. Likewise, an evaluation of the cellular distribution of proteins related to the autophagy process was performed, for which the total mTOR and p-mTOR proteins Ser2448 (to determine the abundance and activity of mTOR, respectively), LC3A (indicates the presence of autophagosomes and their predominant localization in the perinuclear and nuclear region), LAMP1 (allows us to observe the abundance of lysosomes-autophagolysosomes) and p62/SQSTM1 (autophagic receptor which when decreased is an indicator of autophagic flux). We found that there are differences between the abundance of mTOR and p-mTOR Ser2448, where p-mTOR Ser2448 is reduced in oocytes from atresic follicles of all ages compared to viable oocytes, indicating that mTOR activity is being decreased during excessive autophagy, and this coincided with an increase in autophagosomes (LC3A), autophagolysosomes (LAMP1) and a decrease in the indicator of autophagic flux (p62/SQSTM1) in oocytes from atresic follicles.

To identify the relationship of mTOR to other autophagic proteins in 19- and 28-day-old oocytes, we analyzed the abundance of MAPK and AKT pathway proteins at the population level "*in vitro*", since both pathways promote cell survival and are involved in the regulation of autophagy in mammalian cells; as well as BECN1, ATG14, ATG4B, LC3A, LAMP1, p62/SQSTM1, mTOR and p-mTOR Ser2448. A high amount of BECN1 and ATG14 was found, suggesting that the PI3-K-III complex may have an influence on the event. On the other hand, a low presence of p-mTOR Ser2448 at the population level was confirmed. Additionally, a high abundance of p-ERK1/2 was found, therefore, ERK1/2 could be involved in the regulation of autophagy-mediated cell death in oocytes; on the contrary, the AKT pathway was not found to be active since the presence of both p-AKT1 S473 and p-RPS6 S235/236 was not observed, and this is consistent with the fact that this signaling pathway is not inhibiting the autophagic process in oocytes from atresic follicles.

In conclusion, follicular atresia in 19- and 28-day pre-pubertal rat oocytes correlates with increased autophagic markers, as well as decreased mTOR activity. Autophagy is preceded by inactivation of AKT signaling, strongly suggesting that autophagy is not occurring in the absence of growth factors, but is apparently occurring because of energy limitation.

The data from this work constitute a step towards understanding how autophagy is triggered in germ cells of atresic follicles.

INTRODUCCIÓN

MUERTE CELULAR

La muerte celular programada es un proceso fisiológico de eliminación de células involucradas en el desarrollo embrionario y la regulación de la homeostasis en diferentes tejidos en la fase adulta (Kerr *et al.*, 1972; revisado en Escobar *et al.*, 2011).

La muerte celular se puede dividir fundamentalmente en Muerte Celular Accidental (ACD, por sus siglas en inglés) y Muerte Celular Regulada (RCD) en función de los aspectos funcionales. La ACD puede desencadenarse por un ataque inesperado o una lesión que supere cualquier posible mecanismo de control. Por el contrario, la RCD ocurre en condiciones fisiológicas e involucra cascadas de señalización específicas, y tiene consecuencias bioquímicas, funcionales e inmunológicas únicas (Santagostino *et al.*, 2021).

El Comité de Nomenclatura sobre Muerte Celular define algunos tipos de muerte celular: apoptosis intrínseca y extrínseca, necrosis (necroptosis), muerte celular dependiente de autofagia; muchos estudios han demostrado que los diferentes tipos de muerte celular están bioquímicamente interconectados y que la activación o inhibición de uno de ellos, puede conducir a una activación sinérgica o diferencial (Galluzzi *et al.*, 2018).

APOPTOSIS

La apoptosis esta conservada evolutivamente en los *metazoos*. En los vertebrados, la apoptosis es importante para el correcto desarrollo, el mantenimiento tisular y la prevención del cáncer (Ke *et al.*, 2018; Luke *et al.*, 2013).

La apoptosis es un mecanismo que da como resultado la muerte controlada de la célula sin liberar su contenido al entorno circundante. En el cuerpo humano, se estima que aproximadamente 1×10^9 células sufren apoptosis por día por lo que la pérdida de células vitales dentro de los tejidos sanos contribuye a mantener su homeostasis (Elliott y Ravichandran, 2010). Por el contrario, la supervivencia anormal y la acumulación de células dañadas impulsan patologías como cánceres, enfermedades hepáticas, neurodegenerativas y autoinmunes (Singh *et al.*, 2019).

Las características morfológicas que distinguen a la apoptosis son poseer organelos contraídos, la compactación y fragmentación celular y la formación de cuerpos apoptóticos los cuales son fagocitados por células vecinas o macrófagos (Kroemer *et al.*, 2009).

La apoptosis se caracteriza por la participación de las caspasas. Las cuales son endoproteasas que hidrolizan enlaces peptídicos en una reacción que depende de los residuos de cisteína en el sitio activo de la caspasa y ocurre solo después de ciertos residuos de ácido aspártico en el sustrato. Las caspasas se han clasificado por sus funciones conocidas en la apoptosis como iniciadoras (caspasa 2, 8, 9, 10), ejecutoras (caspasa 3, 6, 7); y en la inflamación (caspasa 1, 4, 5, 12). Todas las caspasas tienen una subunidad grande y pequeña, pero las caspasas que participan en la vía extrínseca (caspasa 8, 10) tienen un dominio de efector de muerte (DED), mientras que las que participan en la vía intrínseca (caspasa 9, 2) contienen un dominio de reclutamiento de caspasa (CARD) (Figura 1). Así mismo, se producen inicialmente como pro-caspasas monoméricas inactivas que requieren dimerización y escisión para su activación. El ensamblaje en dímeros es facilitado por varias proteínas adaptadoras que se unen a regiones específicas en el prodominio de la pro-caspasa (Green, 2022A).

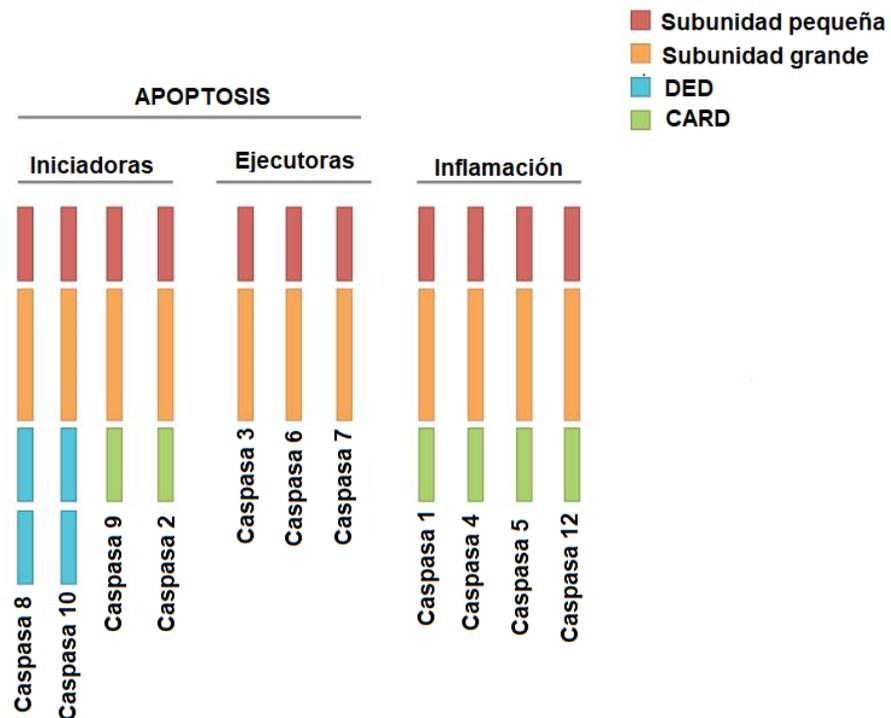


Figura 1. Estructura de los dominios de las caspasas. Las caspasas 8, 10, 9 y 2 se encuentran como caspasas iniciadoras y las caspasas 3, 6, 7 pertenecen a las caspasas ejecutoras en la apoptosis. Especialmente, las caspasas 8 y 10 tienen un dominio DED y las caspasas 9 y 2 tienen un dominio CARD. Las caspasas 1, 4, 5 y 12 participan en el proceso de inflamación (Tomado y modificado de McIlwain *et al.*, 2013).

También durante la apoptosis sucede la fragmentación del ADN internucleosomal por las ADNasas endógenas que realizan cortes al ADN cada 180 a 200 pares de bases (pb). Las enzimas ADNasas responsables incluyen el factor de fragmentación del ADN (DFF40), la ADNasa activada por caspasa (CAD), las que se encuentran como heterodímeros inactivos en las formas DFF45 e ICAD (inhibidor de CAD). Estas enzimas se activan selectivamente tras la escisión por la caspasa 3 o por otros miembros de la familia de las caspasas (Kulbay *et al.*, 2021; Martínez-Escardó *et al.*, 2021).

Hay dos vías por la cual las caspasas pueden ser activadas: la vía extrínseca (receptor de muerte) y la vía intrínseca (mitocondrial). Ambas vías finalmente llevan a una vía común o fase de ejecución de la apoptosis (Figura 3).

Vía extrínseca

Esta ruta es inducida por la interacción entre ligandos de muerte con receptores de muerte. Algunos receptores de muerte incluyen al receptor del Factor de Necrosis Tumoral (TNFR), el receptor FAS, y el receptor del ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF (TRAIL) (Al-Aamri *et al.*, 2021).

Los receptores de muerte (FAS, TNF) se unen a ligandos de muerte (ligando Fas, ligando TNF, respectivamente) para permitir la unión del dominio de muerte a una proteína adaptadora. Por ejemplo, la proteína adaptadora del dominio de muerte asociado a Fas (FADD) y la proteína adaptadora del dominio de muerte asociado a TNFR (TRADD) (Hussein, 2005).

Entonces, la unión del dominio de muerte con la proteína adaptadora más el ligando del receptor, permite la unión de una caspasa iniciadora (8, 10) a través de su dominio efector de muerte (DED) para formar un complejo activado llamado complejo de señalización inductora de muerte (DISC). Se recluta pro-caspasa 8 en DISC por FADD. Cuando los niveles de la proteína inhibitoria similar a FLICE (cFLIP-L) son bajos, este reclutamiento conduce a la homodimerización de la pro-caspasa 8 (p55/p53) y, posteriormente le sigue la escisión de las regiones enlazadoras entre dominios, primero entre las subunidades grandes (p18) y pequeñas (p10) y, posteriormente, entre la subunidad grande (p18) y el prodominio, separando así el prodominio (Figura 2) (Mandal *et al.*, 2020). Estos eventos de escisión estabilizan el homodímero y exponen los sitios activos proteolíticos de la caspasa 8. El homodímero de caspasa 8 completamente activo puede entonces transducir señales pro-apoptóticas al cortar y activar las caspasas ejecutoras (Bossen *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2019).

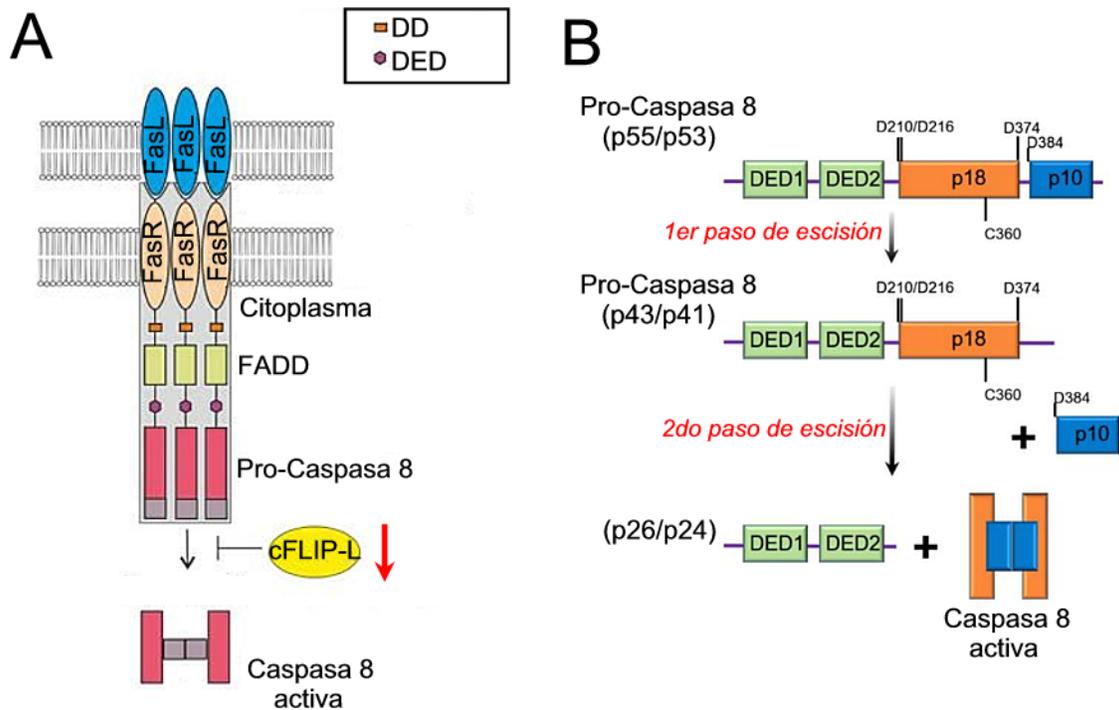


Figura 2. Activación de la caspasa 8. (A) Vía de FasL/Fas/Caspasa 8. La unión de FasL a Fas induce la oligomerización del receptor, lo que provoca la activación del dominio interno de Fas desencadenando la unión de FADD. La proteína adaptadora FADD se une a Fas a través de interacciones DD. FADD recluta pro-caspasa 8, que se une a FADD a través del dominio DED, lo que provoca la formación de un complejo de señalización que induce la muerte (DISC). La formación de DISC va seguida de la escisión de pro-caspasa 8 en subunidades grandes y pequeñas. Dos subunidades grandes y dos pequeñas se asocian entre sí para formar un heterodímero de caspasa 8 activa. cFLIP-L puede inhibir la activación de la pro-caspasa 8. (B) Esquema de pro-caspasa 8 y el mecanismo de dos pasos de su activación. La pro-caspasa 8 (p55/p53) es un precursor inactivo compuesto por dos dominios efectores de muerte (DED), una subunidad grande (p18) y una subunidad pequeña (p10). La maduración de caspasa 8 se deriva de su autoprocésamiento entre p18 y p10 y, posteriormente, entre p18 y el prodominio. La caspasa 8 activa consta de dos subunidades grandes y dos subunidades pequeñas (Tomado y modificado de Sobrido-Cameán *et al.*, 2018; Han *et al.*, 2021).

Vía intrínseca

La vía intrínseca se inicia dentro de la célula producida por algunos estímulos internos como un daño genético irreparable, la hipoxia, concentraciones extremadamente altas de Ca^{2+} citosólico, el estrés oxidativo severo, etc (Brown *et al.*, 2014). Esta ruta es resultado de la permeabilidad mitocondrial, es decir, existe una apertura de los poros de la mitocondria lo que conduce a la pérdida de energía y ruptura de la membrana mitocondrial externa. Principalmente se produce la liberación de moléculas pro-apoptóticas como el citocromo-C a través de la intermembrana mitocondrial hacia el citoplasma (Figura 3) (Garrido *et al.*, 2006).

En la vía intrínseca participa una clase de proteínas que pertenece a la familia BCL-2. Los miembros de esta familia BCL-2 poseen subgrupos estructurales y funcionales con cuatro dominios conocidos como BH1-4. La familia BCL-2 consta de proteínas anti-apoptóticas y pro-apoptóticas. Todos los miembros anti-apoptóticos, como BCL-2 y BCL-XL que tienen dominios BH1-4, y un subconjunto de miembros de la familia pro-apoptótica, como BAX y BAK tienen dominios BH3. Las moléculas pro-apoptóticas "solo BH3", que incluyen BAD, BID, BIM, NOXA, BIK, HRK y PUMA, muestran homología de secuencia solo dentro del dominio BH3. Además de los dominios BH, varios miembros de la familia BCL-2 poseen un dominio transmembranal y pueden localizarse en membranas subcelulares, incluida la membrana externa mitocondrial y el retículo endoplásmico (Giménez-Cassina & Danial 2015).

Las proteínas pro-apoptóticas están involucradas en la regulación de la liberación de citocromo-C a través de la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial y las proteínas anti-apoptóticas impiden la acción de liberación del citocromo-C, por lo tanto, muy crucial para la regulación de la apoptosis (Kale *et al.*, 2018).

La caspasa 8 que se activa en la vía extrínseca también puede convertir la proteína BID en su forma pro-apoptótica, tBID, que desencadena la permeabilización de la Membrana Externa Mitocondrial (MOMP) mediada por BAK/BAX a través de la vía intrínseca (Flores-Romero *et al.*, 2022).

La liberación citoplasmática de citocromo-C puede interactuar con Apaf-1 para generar el Apoptosoma, el cual es un complejo que produce la activación de la pro-caspasa 9, para dar lugar a la caspasa 9. La maduración catalítica de la cascada de caspasas activas como la caspasa 3 y, en última instancia, favorece la adquisición de la morfología apoptótica de muerte celular. Estos eventos están controlados por varias proteínas de choque térmico (HSPs) en diferentes niveles a lo largo de la cascada apoptótica de proteínas de la familia del inhibidor de la apoptosis ligada al cromosoma X (XIAP), que regula negativamente las caspasas 3 y 9. La proteína mitocondrial

Smac/DIABLO neutraliza a XIAP (Hu, *et al.*, 2019; Shiozaki & Shi, 2004; Wilkinson *et al.*, 2004). Además, Bid y Bim son capaces de activar las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak para formar más oligómeros que crean poros en la membrana mitocondrial para provocar su permeabilidad (Luo *et al.*, 2020).

Por otro lado, cuando son liberados de la mitocondria, el Factor Inductor de Apoptosis (AIF) y la endonucleasa G (Endo G) se translocan al núcleo donde desencadenan la fragmentación del ADN y la condensación de la cromatina de forma independiente a las caspasas (Green, 2022B).

Vía común

Las vías intrínseca y extrínseca convergen en la activación de la caspasas ejecutoras. Las cuales activan directa o indirectamente la cinasa ROCK-1 que induce la formación de ámpulas en la membrana plasmática a través de la contracción de la actina y la formación de cuerpos apoptóticos (Özdemir *et al.*, 2021).

La ADNasa se activa para producir la digestión del ADN. En condiciones normales, el sitio que puede ser escindido por ADNasa activada por caspasa (CAD) formando un complejo con un inhibidor (ICAD) para regular su función. Durante la apoptosis, la caspasa 3 escinde a ICAD para que CAD se active provocando la degradación fragmentación de longitud internucleosomal (Wolf *et al.*, 1999). Además, la caspasa 3 es responsable de la escisión proteolítica de la enzima nuclear poli(ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1), quien participa en la reparación rutinaria del daño en el ADN. De hecho, la escisión de PARP-1 es un sello distintivo de la apoptosis (Chen *et al.*, 2022).

Las caspasas efectoras también inactivan proteolíticamente a las flipasas lipídicas, como ATP11, y activan proteolíticamente a la escramblasa lipídica XKR8; ambos eventos provocan la exposición de fosfatidilserina (PtdSer) en la cara externa de la membrana celular. Esto actúa como una señal de "cómeme" para las células fagocíticas y promueve la absorción de las células en apoptosis (Xu *et al.*, 2022).

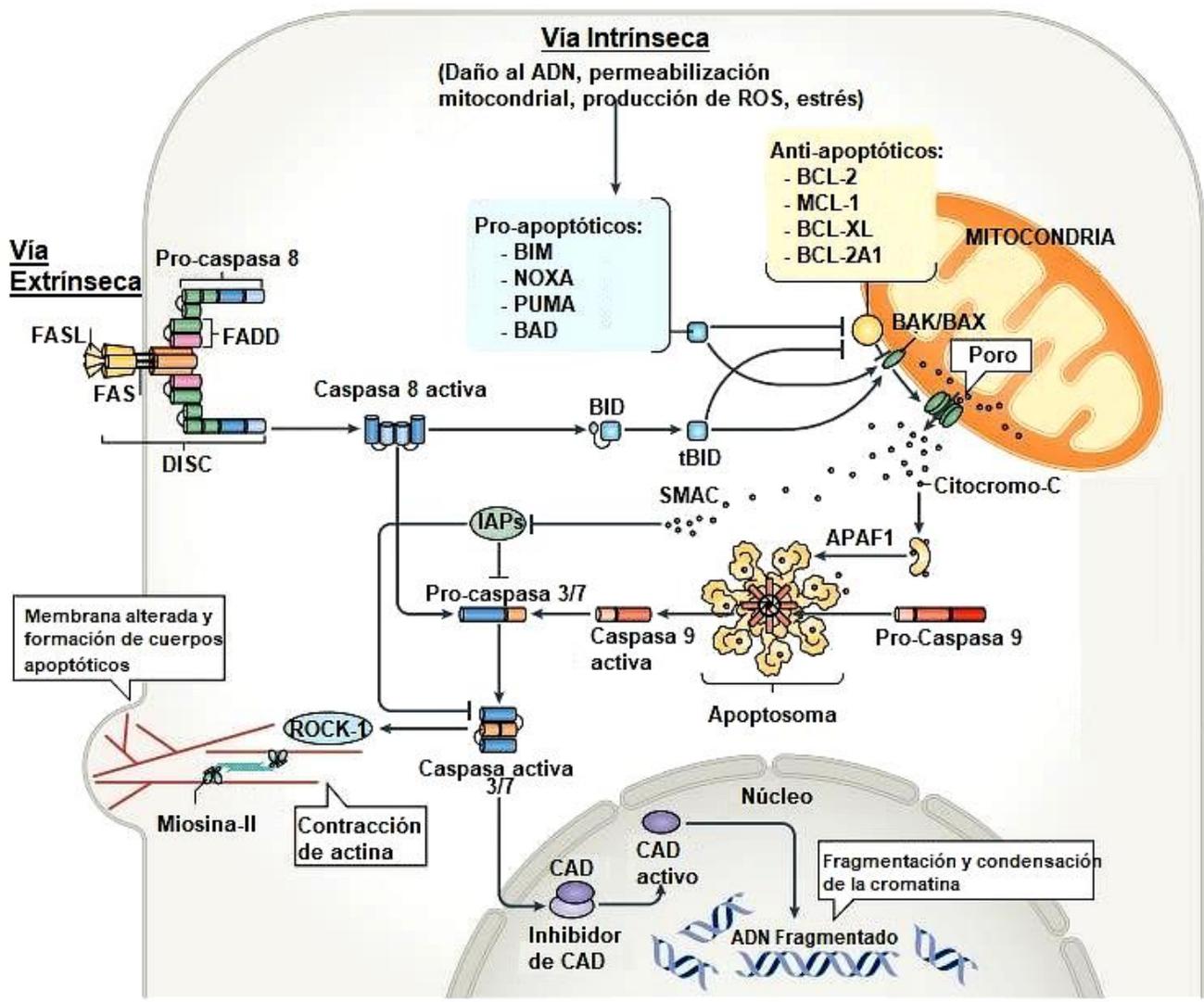


Figura 3. Vías de señalización que desencadenan la apoptosis. Muestra la participación de las mitocondrias (vía intrínseca), así como las vías mediadas por el receptor de muerte (vía extrínseca) (Tomado y modificado de Bedoui *et al.*, 2020). Ver el texto

NECROSIS

La necrosis se ha definido como una forma de muerte celular desorganizada que da como resultado la dilatación de los organelos celulares, la ruptura de la membrana plasmática, la eventual lisis de la célula, y el derrame de contenido intracelular en el tejido circundante que conduce al daño tisular. Durante la necrosis, aumentan los niveles de Especies Reactivas de Oxígeno, de calcio intracelular (Ca^{2+}) y la depleción de ATP (Kim *et al.*, 2019).

La necrosis se considera una muerte celular "accidental" ya que se produce debido a algún estímulo nocivo como el bajo nivel de oxígeno (hipoxia), la interrupción de metabolismo celular, la isquemia (suministro sanguíneo restringido), el calor, la irradiación, los patógenos y la exposición a toxinas (Escobar *et al.*, 2015; Galluzzi & Kroemer, 2017).

NECROPTOSIS

La forma más conocida de necrosis regulada es la necroptosis. La necroptosis es iniciada por perturbaciones del microambiente extracelular o intracelular y es detectada por la unión de $\text{TNF-}\alpha$ a algunos receptores TNF (TNFR, Fas) o receptores tipo Toll (TLR3 y TLR4), estrés celular metabólico y genotóxico (Dhuriya, & Sharma, 2018). El complejo RIP1-RIP3-MLKL, también llamado necrosoma, es un mediador de la vía necroptótica que une las señales de los receptores de muerte celular río arriba y las moléculas río abajo para ejercer una acción como la permeabilización de la membrana plasmática, disminución de ATP citosólico y aumento de especies reactivas de oxígeno (Fulda, 2016).

En la necroptosis inducida por $\text{TNF-}\alpha$, el TNF se une a los receptores de TNF y participa la formación de un gran complejo llamado Complejo I, que incluye cIAP1/2, CYLD, RIP1 y TRAF2. Los cIAP inducen la poliubiquitinación de RIP1 para inhibir el complejo IIa (Caspasa 8, FADD y RIP1) y el complejo IIb, (Caspasa 8, FADD, RIP1, RIP3 y MLKL), bloqueando así la apoptosis o necroptosis mediada por RIP1. La poliubiquitinación de RIP1 beneficia la supervivencia celular. CYLD es una desubiquitinasa que desmantela las cadenas de ubiquitina unidas a K63 de RIP1 y promueve el empaquetamiento de los complejos IIa y IIb (Jantas & Lasoñ, 2021). En el Complejo IIa, la caspasa 8 activa se escinde y suprime las actividades de RIP1, RIP3 y CYLD, bloqueando así la necroptosis y promoviendo la apoptosis. Pero cuando c-FLIP-L está presente, actúa como un freno para la maduración de la caspasa 8 impidiendo la escisión de RIP1 y RIP3, se forma el complejo IIb. En el complejo IIb, RIP1 se une a RIP3, dando como resultado la formación de RIP1/RIP3 por

autofosforilación y transfosforilación. Luego, RIP3 recluta y fosforila a MLKL para formar un complejo denominado necrosoma. MLKL fosforilado luego se transloca desde el citoplasma hacia la membrana plasmática. La oligomerización de MLKL promueve la formación de poros en la membrana, lo que provoca la ruptura de la membrana y, finalmente, la necroptosis (Figura 4) (Chen *et al.*, 2019A; Su *et al.*, 2016).

La necroptosis ha surgido como una vía importante de muerte celular regulada en el desarrollo embrionario, la homeostasis tisular, la inmunidad y la inflamación; lo cuales se han demostrado en condiciones experimentales cuando se inhibe la apoptosis (Liu *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2019). Además, la necroptosis comparte la señalización molecular con la apoptosis mejorando así la homeostasis tisular; por ejemplo, McEvoy *et al.*, 2021 describió que las células de la teca y la granulosa de folículos luteinizantes pre-ovulatorios de vacas se eliminan tanto por apoptosis como por necroptosis dependiente de RIPK. También la necroptosis participa en el desarrollo folicular y lúteolisis en primates (Bagnjuk *et al.*, 2019; Du *et al.*, 2018).

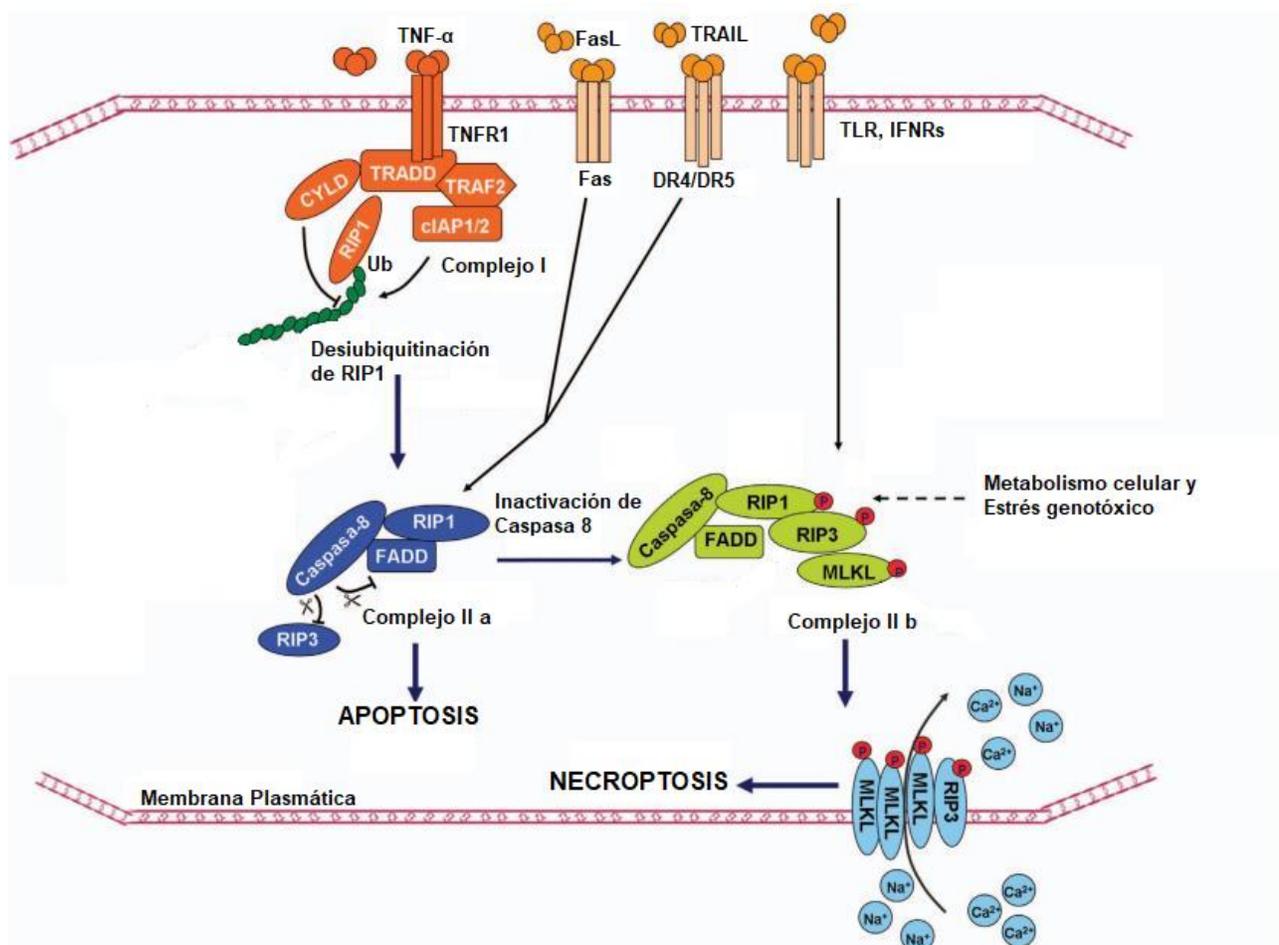


Figura 4. Ruta de activación de la necroptosis. Varios factores promueven la producción de TNF- α , que desencadena la formación del complejo IIa (vía apoptótica) y/o el complejo IIb (vía necroptótica) (Tomado y modificado de Su *et al.*, 2016).

PARAPTOSIS

La paraptosis es una forma de muerte celular programada independiente de caspasas que se caracteriza por la extensa vacuolización citoplasmática derivada de la dilatación del retículo endoplásmico y de las mitocondrias; no ocurre la compactación nuclear, la fragmentación celular, ni la ruptura de la membrana plasmática por lo que es distinta de la apoptosis y la necrosis (Yu *et al.*, 2020).

Muchos estudios indican que la paraptosis está asociada con la generación de especies reactivas de oxígeno y la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico, así como un exceso de Ca^{2+} mitocondrial, y se ejerce una fuerza osmótica para dilatar la luz del retículo endoplásmico y las mitocondrias (Figura 5). En la mayoría de los casos se ha demostrado que la paraptosis depende de los miembros de la familia de la Proteína Kinasa Activada por Mitógeno (MAPK), como la proteína cinasa1 N-terminal c-Jun (JNK1), p38 y la proteína cinasa activada por mitógeno 2 (MEK-2), la inducción de la Proteína homóloga C/EBP (CHOP) y puede ser inhibida por la proteína AIP-1/Alix y la cicloheximida (Fontana *et al.*, 2020; Shi *et al.*, 2021). A pesar de la evidencia actual disponible, los mecanismos moleculares subyacentes a la paraptosis aún no se han abordado por completo.

Se ha demostrado que muchos fitoquímicos anticancerígenos inducen paraptosis en varias células cancerosas humanas; algunos fitoquímicos estudiados son la curcumina, el celastrol, la hesperidina, el morusín, el δ -tocotrienol, entre otros (Kim *et al.*, 2021).

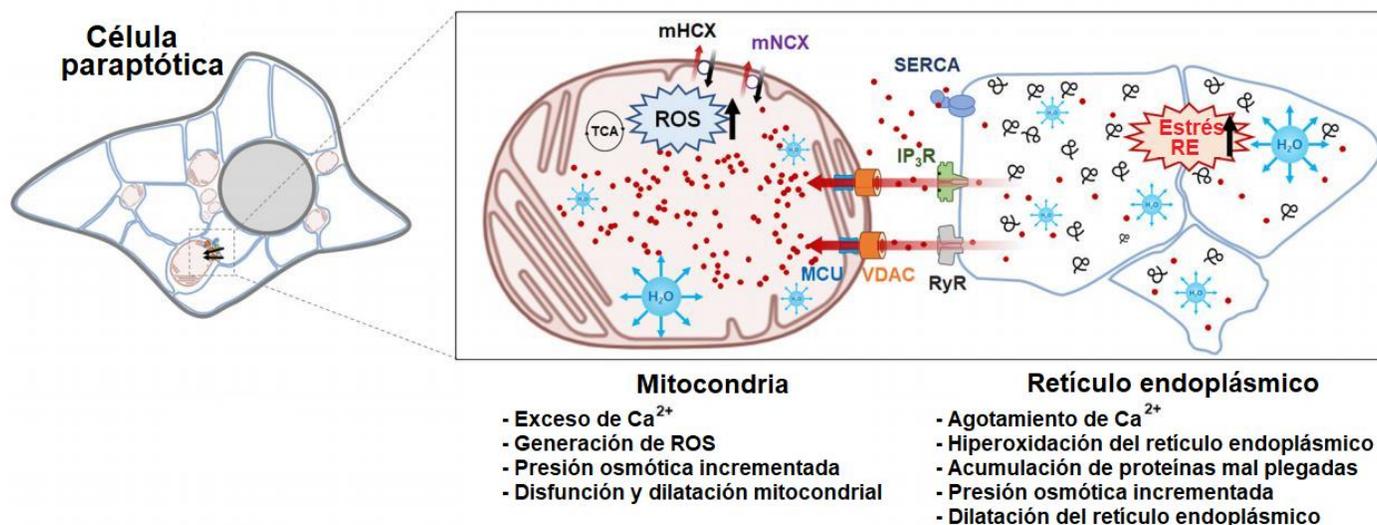


Figura 5. Características morfológicas de la paraptosis. El Ca^{2+} se libera del retículo endoplásmico a través de algunos receptores y se incorpora a la mitocondria por medio de los

canales dependientes de voltaje. La absorción de Ca^{2+} mitocondrial activa el ciclo del ácido tricarbóxico y la cadena de transferencia de electrones, lo que conduce a la síntesis de ATP y la generación de especies reactivas de oxígeno. Entonces, la sobrecarga prolongada de Ca^{2+} en las mitocondrias desencadena la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial lo que lleva a la dilatación mitocondrial. Las mitocondrias dejan de captar Ca^{2+} porque no hay un gradiente electroquímico en la membrana mitocondrial, mientras que el retículo endoplásmico no capta Ca^{2+} porque la ATPasa sarcoplásmica está inhibida por la escasez de ROS y ATP. Esto dificulta la actividad de las chaperonas para el correcto plegamiento de proteínas; contribuyendo a la acumulación de proteínas mal plegadas, lo que conduce a la distensión de la luz del retículo endoplásmico. Todo esto promueve la pérdida funcional y estructural en estos dos organelos y, finalmente, la muerte celular (Tomado y modificado de Kim *et al.*, 2021).

AUTOFAGIA

Las células tienen una renovación constante y dinámica de sus componentes; macromoléculas (proteínas, lípidos y ácidos nucleicos) e incluso organelos completos, se crean y eliminan a medida que se dañan o como parte de la remodelación celular en respuesta a las condiciones ambientales (Ferraro & Cecconi, 2007). Por lo que la célula puede degradar partes disfuncionales del citoplasma antes de que se acumulen e interfieran con la fisiología normal.

La autofagia es un proceso de degradación conservado (desde levaduras hasta mamíferos) en el que las proteínas defectuosas y organelos dañados se entregan a la vacuola en levaduras o plantas, o a los lisosomas en células eucariotas para su degradación o reciclaje (Rehman *et al.*, 2021). Inicialmente, la autofagia se analizó en hepatocitos de hígado de rata mediante microscopía electrónica y ensayos bioquímicos de enzimas (Deter *et al.*, 1967; Kopitz *et al.*, 1990). Sin embargo, después del descubrimiento de la autofagia en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Takeshige *et al.*, 1992) y el aislamiento de los genes *ATG* en levaduras; la investigación sobre la autofagia ha pasado de ser un estudio descriptivo a un campo bioquímico y molecular utilizando organismos modelo, sistemas de cultivo celular y enfoques de reconstitución *in vitro* (Aman *et al.*, 2021).

Existen tres tipos de autofagia en las células en mamíferos: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas. Los mecanismos de estos tres tipos de autofagia son diferentes (Parzych & Klionsky, 2014). La macroautofagia tiene varias fases: inicio, nucleación de membranas y formación de fagóforo, alargamiento y formación de autofagosomas, maduración del autofagosoma, fusión y formación de autolisosomas y degradación lisosomal y reciclaje de los componentes. La etapa de inicio de la macroautofagia implica que en el citoplasma se secuestran algunos organelos como el retículo endoplásmico, mitocondrias, membrana plasmática o envoltura nuclear; de forma específica mediante la acción de un compartimento transitorio, denominado fagóforo, que se elonga alrededor del material a engullir hasta convertirse en una vesícula de doble membrana denominada autofagosoma; este proceso es seguido por la fusión del autofagosoma con la vacuola o lisosoma, donde se degrada o se recicla el material secuestrado (Figura 6) (Levine *et al.*, 2006; Baek *et al.*, 2012). La microautofagia ocurre sin autofagosomas; el material es engullido directamente en la superficie de la vacuola o lisosoma por una invaginación de su membrana. Tanto la microautofagia como la macroautofagia pueden secuestrar grandes complejos proteicos y organelos. Por el contrario, en la autofagia mediada por chaperonas, las proteínas individuales que contienen un motivo de reconocimiento específico se despliegan por medio de la acción de las chaperonas citosólicas y se transportan a la luz del lisosoma a través de la translocación a través de la membrana del lisosoma con la ayuda de las chaperonas lumbinales y el receptor LAMP2A

elongación del fagóforo (3). En el sistema de conjugación de ATG12-ATG5, el complejo ATG12-ATG5-ATG16L1 se une a WIPI2 a través de ATG16LI. ATG2 entrega los fosfolípidos contenidos en la membrana del retículo endoplásmico a la cara citoplasmática del fagóforo. Luego, ATG9 impulsa la expansión de la membrana. Los materiales de membrana de otros organelos son, la membrana plasmática, el aparato de Golgi, las mitocondrias, y la envoltura nuclear, también contribuyen a la elongación del fagóforo (3). El complejo ATG12-ATG5 promueve la formación de LC3A-II a través de LC3-I (ATG4) a partir de LC3, y su conjugación con el fagosoma a través de fosfatidiletanolamina (PE). LC3A-II interactúa con la carga ubiquitinada a través de receptores de autofagia selectivos (p62/SQSTM1) y se requiere para el alargamiento y cierre de la membrana del fagóforo como autofagosomas (3). La maduración de los autofagosomas (4) ocurre cuando LC3A-II es eliminado por ATG4 de la superficie externa de los autofagosomas. El Complejo II PI3-K-III contiene a UVRAG, que interactúa con el complejo HOPS y estimula la fusión autofagosoma-lisosoma (5). *Rubicon* suprime la formación de autolisosomas al interactuar con UVRAG. La fusión de la membrana del autofagosoma con la membrana del lisosoma requiere tanto el complejo HOPS, que une los autofagosomas a los lisosomas, como STX17. Pacer interactúa con STX17 y recluta HOPS para autofagosomas. La fusión autofagosoma-lisosoma (5) está mediada por proteínas de tráfico, incluidas proteínas pequeñas de la familia GTPasa, como Rab-7a. Dentro de la carga autofágica, las proteínas efectoras SNARE se degradan y se liberan en el citoplasma para el reciclaje de nutrientes (6). Los lisosomas se reforman a partir de la membrana autolisosomal, preparando el escenario para un nuevo ciclo de formación de autolisosomas (6) (Tomado y modificado de Kitada & Koya, 2021).

AUTOFAGIA EN LA SUPERVIVENCIA CELULAR

La autofagia generalmente se considera un mecanismo de supervivencia y de protección celular porque elimina proteínas y organelos tóxicos u obsoletos y, recicla los productos de degradación para usarlos como fuentes de energía y metabolitos en las vías anabólicas. Este concepto provino de que la autofagia está regulada por las condiciones de los nutrientes y aumenta en respuesta a una reducción en el nivel de glucosa o aminoácidos en las células o tejidos (Schwartz, 2021). La autofagia ocurre en niveles basales, es decir, por la acumulación de componentes citoplasmáticos que están destinados a ser eliminados o reciclados y puede ser regulada por nutrientes (aminoácidos, glucosa), estrés oxidativo, hipoxia, factores de crecimiento (insulina y factores de crecimiento similares a la insulina), niveles reducidos de energía celular (ATP), o daño en el ADN (Yun *et al.*, 2020).

La desregulación de la autofagia está involucrada en patologías como el cáncer, trastornos cardiovasculares, neurodegenerativos, metabólicos, entre otros (Klionsky *et al.*, 2021). Además, la autofagia es crucial durante la embriogénesis. La eliminación específica de *Atg5* en ovocitos elimina las reservas maternas de esta proteína, produce ovocitos que no logran desarrollarse más allá de la etapa de ocho células, lo que demuestra que se requiere autofagia durante el desarrollo previo a la implantación (Tsukamoto *et al.*, 2008).

AUTOFAGIA EN LA MUERTE CELULAR

La autofagia se describió como un proceso asociado a la muerte celular debido a las observaciones basadas en microscopía electrónica de transmisión de estructuras autofágicas en células moribundas (Schweichel & Merker, 1973). Hasta la actualidad, este tema ha sido de gran discusión ya que la presencia de la autofagia próxima a la muerte celular podría deberse a una activación de la autofagia a favor de la supervivencia en lugar de un papel a favor de la muerte. Sin embargo, existen múltiples ensayos que confirman la contribución de la autofagia en la progresión de la muerte celular durante el desarrollo en *Dictyostelium discoideum*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* y líneas celulares de mamíferos (Jung *et al.*, 2020). La mutación en muchos genes de autofagia en *C. elegans*, incluidos *Atg3*, *Atg2* o *Atg5*, reduce la muerte de las células germinales inducida por la radiación gamma (Wang *et al.*, 2013). Del mismo modo, la autofagia es necesaria para la muerte celular inducida por el tratamiento con fármacos quimioterapéuticos en fibroblastos embrionarios de ratón deficientes en *Bax* y *Bak* (Shimizu *et al.*, 2004).

MUERTE CELULAR DEPENDIENTE DE LA AUTOFAGIA

La muerte celular dependiente de la autofagia se define por los siguientes criterios: (1) la muerte celular ocurre sin la participación de otros tipos de muerte celular (2) el flujo autofágico es elevado y (3) la inhibición farmacológica o genética de la autofagia bloquea la muerte celular (Jung *et al.*, 2020).

Muchos hallazgos de la muerte celular dependiente de la autofagia se obtienen de estudios sobre el desarrollo; por ejemplo, el crecimiento de las células del intestino medio de *Drosophila* pueden retrasarse gravemente por la mutación y eliminación de los genes *Atg1*, *Atg2* o *Atg18*, pero no por la inhibición de la apoptosis (Denton *et al.*, 2012). Otro ejemplo es de la ameba *Dictyostelium discoideum*, estas amebas viven vidas solitarias en el suelo, la pérdida de alimentos desencadena

una cascada de transducción de señales que induce a las células a agregarse y formar un tallo que contienen esporas. A medida que avanza la diferenciación, las células del tallo mueren por una vía dependiente de la autofagia. Se descubrió que la mutación en el gen *Atg1* bloquea la muerte y, en cambio, las células se necrosan por defecto (Kosta *et al.*, 2004).

Sin embargo, existe otra visión en donde la autofagia acompaña y es requerida para la activación de otros modos de muerte celular, especialmente la apoptosis. Esto es debido a que hay entrecruzamiento entre las vías de señalización de los diferentes mecanismos de muerte celular (Denton & Kumar, 2019).

REGULACIÓN DEL INICIO DE LA AUTOFAGIA

En los mamíferos, la autofagia es vital para el desarrollo embrionario, la organogénesis y la supervivencia de los recién nacidos; las respuestas de señales inductoras van a depender de cada tipo celular y el evento biológico que ocurra (Moura *et al.*, 2021). Por ejemplo, durante la fertilización del óvulo se desencadena la autofagia por la oscilación del calcio para eliminar las mitocondrias paternas, lo cual es crucial para la herencia citoplasmática materna (Wang *et al.*, 2019). Los niveles autofágicos primero aumentan de manera independiente de la actividad de mTORC1 y luego descienden gradualmente. La implantación exitosa da como resultado que un embrión experimente inicialmente un estado hipóxico y bajo en nutrientes en el útero, lo que impulsa la autofagia y facilita la placentación. La autofagia promueve la organogénesis embrionaria en respuesta a señales de proliferación, crecimiento, supervivencia, diferenciación y determinación celular; como la formación del tubo neural, la diferenciación neural, el desarrollo de reticulocitos, el crecimiento del miocardio, la supervivencia y diferenciación de condrocitos, entre otros (Song *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2019). Después del nacimiento, el suministro de nutrientes placentarios de la madre termina repentinamente, lo que desafía a los recién nacidos con una inanición severa; la autofagia parece jugar un papel fundamental durante la transición a la lactancia materna al suministrar nutrientes (Yin *et al.*, 2016).

De manera interesante, la autofagia lleva a cabo funciones críticas en las células germinales y en las células troncales embrionarias y adultas debido a la eliminación de las mitocondrias dañadas o en exceso, reduciendo así el potencial de generar especies reactivas de oxígeno que pueden dañar el contenido genómico; y a la eliminación y el reciclaje de estructuras celulares para facilitar la extensa remodelación que se produce durante el establecimiento inicial y la subsiguiente diferenciación de estas poblaciones celulares (Islam *et al.*, 2022).

Entonces, la autofagia es regulada por dos vías de señalización desencadenadas por diversas tensiones intracelulares y alteraciones en el estado de los nutrientes: las vías dependientes e independientes de mTOR (Al-Bari & Xu, 2020).

Vías de señalización dependientes de mTOR

mTOR

La proteína blanco de rapamicina en mamíferos (mTOR) es una serina/treonina cinasa de 289 kDa, que contiene múltiples dominios que incluyen el dominio FAT, el dominio de unión a rapamicina (FRB), el dominio cinasa (KIN), el dominio regulador negativo (NRD), el dominio FATC y al menos 20 repeticiones HEAT, que proporcionan interacción con otras proteínas (Figura 7) (<https://www.uniprot.org/uniprot/P42345>, 2022).

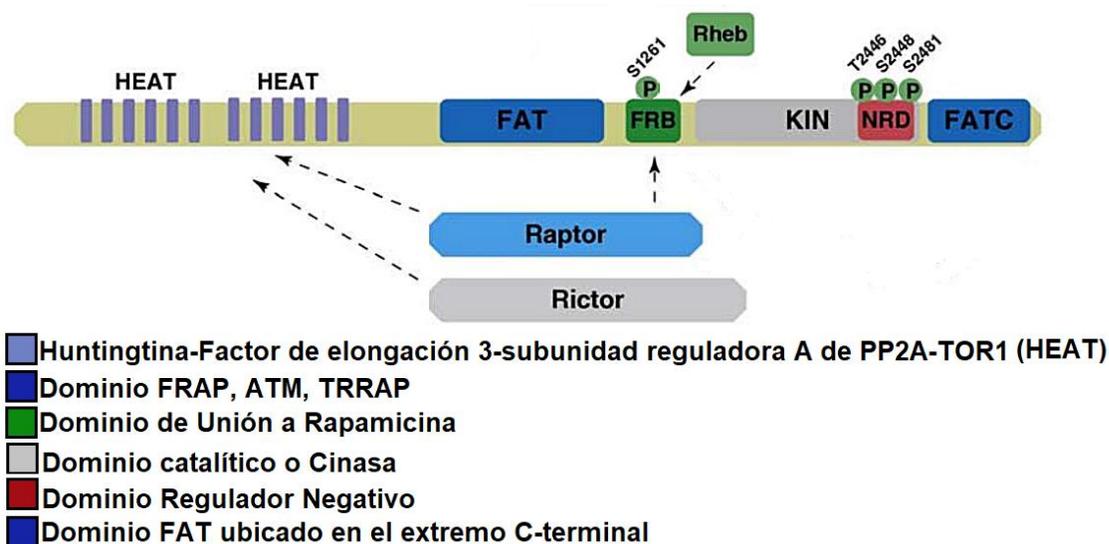


Figura 7. Esquema de las posiciones de los dominios y sitios fosforilados de mTOR. (Tomado y modificado de Hoeffler & Klann, 2010).

mTOR es un regulador central del metabolismo celular, el crecimiento, la proliferación, la síntesis de proteínas, la autofagia y la supervivencia en respuesta a hormonas, factores de crecimiento, nutrientes, energía y señales de estrés. mTOR forma dos complejos macromoleculares, complejo 1 de mTOR (mTORC1) y complejo 2 de mTOR (mTORC2), que tienen funciones distintas. mTORC1 es un regulador central de la traducción, así como el crecimiento celular, la progresión del ciclo celular y la proliferación celular. mTORC2 regula la proliferación y supervivencia, la migración celular y la remodelación del citoesqueleto de actina (Foster & Fingar, 2010; Yin *et al.*, 2021).

Cada uno de los dos complejos de señalización mTOR van a poseer diferentes proteínas y sustratos asociados (Figura 8). El complejo mTORC1 consta de mTOR, PRAS40, RAPTOR, DEPTOR, mLST8, tti1 y tel2. mTORC2 consta de mTOR, RICTOR, PROTOR, mSIN1, DEPTOR, mLST8, tti1 y tel2 (Scheibye-Knudsen, 2013).

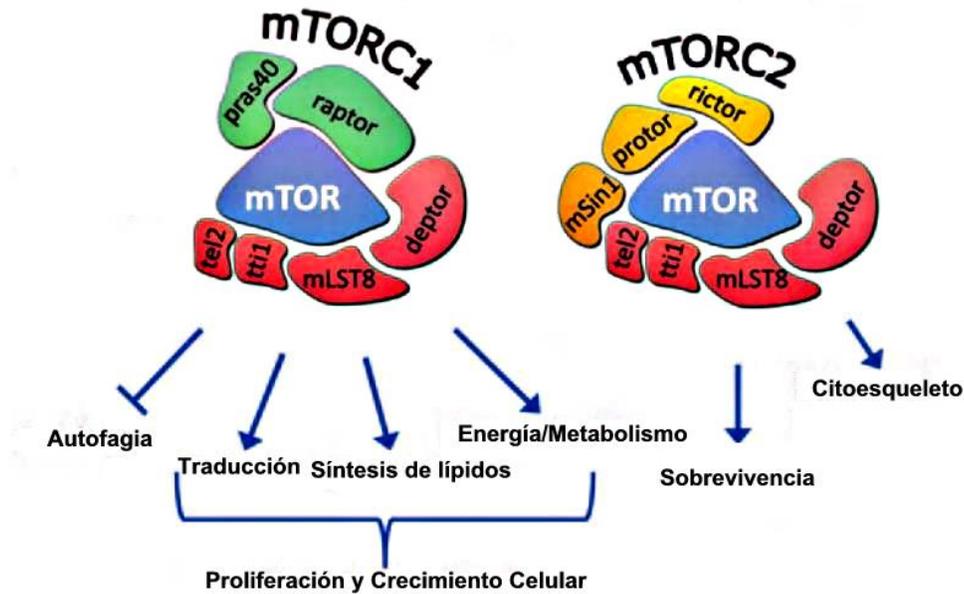


Figura 8. Componentes y funciones de los complejos mTORC1 y mTORC2 (Tomado y modificado de Scheibye-Knudsen, 2013).

mTORC1 ejerce sus funciones biológicas fosforilando una gran cantidad de proteínas río abajo. mTORC1 fosforila S6K y 4E-BP1 para promover la síntesis de proteínas. Además, actúa como un freno en el desencadenamiento de la autofagia (Zou *et al.*, 2020).

Activación de mTORC1

La activación de mTORC1 está controlada espacial y temporalmente por la disponibilidad de nutrientes, aminoácidos, factores de crecimiento, oxígeno, glucosa. En respuesta a los nutrientes, mTORC1 se transloca a la superficie de los lisosomas, en donde el complejo ATPasa-Regulator se activa a través de un mecanismo lisosomal y que a su vez recluta a las Rag GTPasas (Rags) y Rheb (Carroll, 2020).

Los Rags se activan mediante dos acciones: la primera es que *Regulator* funciona como un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) para cargar GTP en RagA/B y la segunda es que

FLCN actúa como una proteína activadora de GTPasa (GAP) para cargar GDP en RagC/D, promoviendo la formación un heterodímero que consiste en RagA/B cargado con GTP y RagC/D cargado con GDP. Entonces, los Rags activados interactúan directamente con Raptor para reclutar mTORC1 en el lisosoma, donde se une a Rheb GTPasa para una activación máxima (De Martín & Aylett, 2020; Takahara *et al.*, 2020).

mTOR es fosforilada en múltiples sitios, incluidos Ser2448, Ser2481, Thr2446 y Ser1261 (Figura 7). La fosforilación en Ser2448 es objetivo de la proteína cinasa AKT y la cinasa ribosomal p70 S6 cinasa (S6K) y ocurre para activar a mTORC1 (Chiang *et al.*, 2005; Hoeffler & Klann, 2010; Rosner *et al.*, 2010). Ser2481 es un sitio de autofosforilación relacionada con su actividad catalítica intrínseca (Soliman *et al.*, 2010). Thr2446 es fosforilado por AMPK y los niveles de fosforilación aumentan con la retirada de nutrientes y disminución de la estimulación por insulina (Cheng *et al.*, 2004). En el sitio Ser1261 es fosforilado a través de la señalización de PI3K para promover la actividad de mTORC1 (Acosta-Jaquez *et al.*, 2011). En todos los casos mencionados, la fosforilación de mTOR parece alterar su actividad cinasa en lugar de su asociación con otros componentes de mTORC1 (Yin & Gan, 2021).

En ratones *knockout* para *mTOR*, se determinó que los ovocitos primordiales y en crecimiento requieren las vías dependientes de mTOR para eludir daños al ADN, mantener un correcto desarrollo folicular y evitar la infertilidad (Guo *et al.*, 2018). La señalización de mTORC1 en los ovocitos podría ser requerida para la supervivencia de los folículos primordiales y el desarrollo ovárico (De Felici *et al.*, 2008).

AMPK

La proteína cinasa activada por AMP (AMPK) es el regulador maestro de la homeostasis de la energía celular. La cinasa se activa en respuesta al estrés que agota los suministros celulares de ATP, como glucosa baja, hipoxia, isquemia y choque térmico (Herzig & Shaw, 2018). Existe como un complejo heterotrimérico compuesto por una subunidad α catalítica y subunidades β y γ reguladoras. La unión de AMP a la subunidad γ activa alostéricamente el complejo, lo que lo convierte en un sustrato más atractivo para la fosforilación en Thr172 en el bucle de activación de la subunidad α por su principal cinasa AMPK río arriba, LKB1 (Yan *et al.*, 2021).

Como sensor de energía celular que responde a niveles bajos de ATP, la activación de AMPK promueve la autofagia (Arsham & Neufeld, 2006). De hecho, AMPK inhibe la actividad de mTORC1

de dos maneras. La primera implica que AMPK fosforila directamente los sitios Ser772 y Ser792 de RAPTOR, provocando la dificultad de la unión entre RAPTOR y mTOR, esto desencadena que la vía de señalización de mTORC1 se inhiba (Gwinn *et al.*, 2008). La segunda manera sucede cuando AMPK recluta a TSC1/2 (Holness *et al.*, 2012).

TSC1/2

TSC1 (hamartina) y TSC2 (tuberina) son genes supresores de tumores que integran señales extrínsecas e intrínsecas del estado energético y del crecimiento celular. TSC1 y TSC2 se unen entre sí para formar un complejo de proteína activadora de GTPasa (GAP) que desempeña un papel fundamental en la regulación de la síntesis de proteínas, el crecimiento, el tamaño celular y la autofagia (Huang & Manning, 2008; Tomasoni & Mondino, 2011). TSC1 participa en la formación de uniones celulares independientemente de mTORC1 (Lai *et al.*, 2021).

Cuando la célula tiene excelentes condiciones de nutrientes, Rheb-GTP se acumula y se une directamente a mTOR dentro de mTORC1; pero en malas condiciones AMPK fosforila directamente a TSC2 en sus sitios T1227 y S1345, lo que promueve la actividad del complejo TSC1/2 (Huang & Manning, 2008). Por este motivo el complejo TSC1/2 actúa como un GAP para Rheb haciendo que Rheb-GTP se transforme en un estado Rheb-GDP inactivo y se desactiva la estimulación de mTORC1 mediada por Rheb (Brugarolas *et al.*, 2004; Budanov, & Karin, 2008; Huang *et al.*, 2008).

Además de AMPK, existen otras vías de señalización que inciden en el complejo TSC1/2 para controlar su asociación, degradación y actividad catalítica. Por ejemplo, TSC2 es fosforilado por las vías de señalización AKT y MAPK (Figura 9) (Winter *et al.*, 2011).

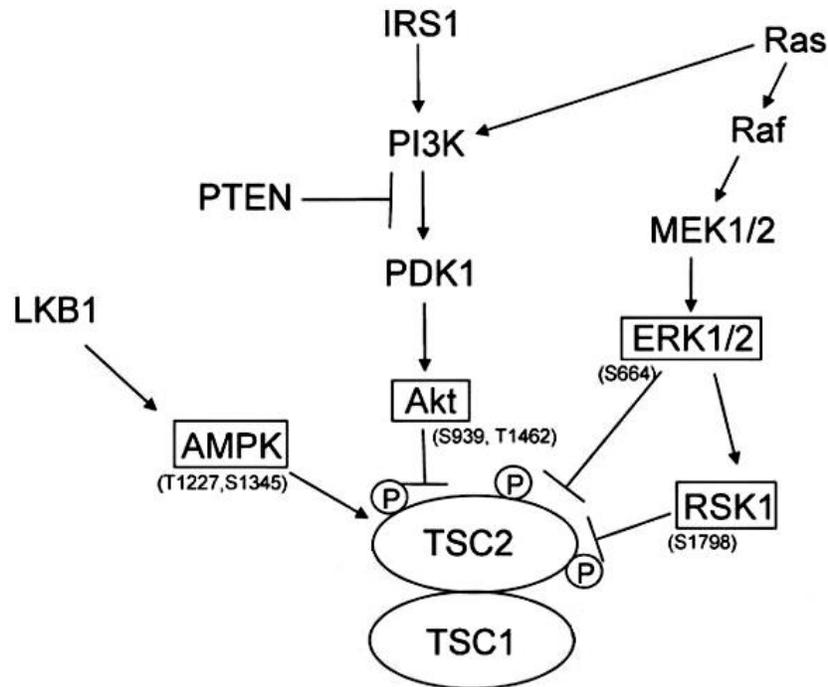


Figura 9. Componentes reguladores río arriba del complejo TSC1/2. El complejo TSC1/2 controla el crecimiento celular según los aportes de los factores de crecimiento, los nutrientes, los niveles de energía celular, los niveles de oxígeno y la adhesión celular. Bajo estrés metabólico o condiciones hipóxicas, TSC2 es fosforilado por AMPK aumentando la estabilidad del complejo TSC1/2. Este complejo desactiva la estimulación de mTORC1 mediada por Rheb. Pero, bajo la estimulación del factor de crecimiento, TSC2 está sujeto a la fosforilación inhibitoria por parte de AKT, ERK1/2 y RSK1 dependiente de ERK1/2 lo que da como resultado la disociación del complejo (Tomado y modificado de Rosner *et al.*, 2008).

AKT

AKT es una proteína cinasa que controla una amplia gama de respuestas fisiológicas, incluido el metabolismo, la proliferación celular, la supervivencia, la apoptosis y la autofagia (Manning & Cantley, 2007). Esta proteína es activada por la insulina y varios factores de crecimiento y supervivencia para funcionar junto a PI3K. AKT se activa mediante la unión de fosfolípidos, la fosforilación en Thr308 por PDK1 y mediante la fosforilación dentro del extremo carboxilo en Ser473.

Una función de AKT es que regula el ciclo celular al prevenir la fosforilación mediada por GSK-3 β , la degradación de la ciclina D1 y al regular negativamente los inhibidores de la cinasa dependiente

de ciclina p27 Kip1 y p21 Waf1/Cip1 (Chen *et al.*, 2019B).

AKT promueve la supervivencia celular al inhibir la apoptosis a través de la fosforilación e inactivación de los factores de transcripción, los miembros de la familia pro-apoptóticos Bcl-2 y las caspasas (Sangawa *et al.*, 2014). Además, estimula la señalización de mTOR al inhibir la función de TSC2 mediante la fosforilación en S939 y T1462 regulando a la baja el potencial activador de GTPasa de tuberina hacia Rheb (Huang & Manning, 2009).

MAPK

Las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) son una familia ampliamente conservada de proteínas cinasas serina/treonina involucradas en muchos procesos celulares fundamentales, incluidos el crecimiento, la proliferación, la diferenciación, la motilidad, la respuesta al estrés, la supervivencia y la apoptosis (Roux & Blenis, 2004). La ruta de las MAPK involucra diferentes cascadas. Cada cascada consta de tres cinasas centrales (MAP3K, MAP2K y MAPK) y, también componentes adicionales río arriba (MAP4K) y río abajo (MAPKAPK). Dentro de cada una de las cascadas, la señal se propaga por fosforilación secuencial y activaciones cinasas y eventualmente conducen a la fosforilación de proteínas reguladoras blanco por los componentes MAPK y MAPKAPK (Guo *et al.*, 2020; Plotnikov *et al.*, 2011).

Una de las cascadas es la vía de MAPK/ERK. Dicha vía de señalización incluye a las proteínas G pequeñas, a Raf cinasa, a MEK1/2 y a ERK1/2. ERK 1/2 puede activarse en respuesta a una amplia variedad de estímulos extracelulares, incluidos mitógenos, factores de crecimiento, citocinas, hormonas y estrés oxidativo (Mebratu & Tesfaigzi, 2009). Si hay estímulos de mitógenos adecuados para la supervivencia celular, ERK1/2 provoca la interrupción del complejo TSC1/2 al fosforilar TSC2 en el residuo S664, activando a mTORC1. Además, la cinasa RSK1 activada por ERK1/2 interactúa con la TSC2 y la fosforila en S1798, lo que desencadena la inactivación de TSC2 (Rosner *et al.*, 2008).

Vías de señalización independientes de mTOR

Además de la vía mTORC1 clásica, varias vías activadoras independientes de mTOR, como Inositol, Ca²⁺/Calpaína, AMPc/EPAC/PLCε, se han implicado en la regulación de la autofagia (Figura 10).

Vía de señalización del inositol

La señalización del inositol inhibe la autofagia. Esta vía es estimulada por la activación mediada por receptor acoplado a proteína G de PLC (fosfolipasa C), que hidroliza PtdIns(4,5)P₂ para formar Ins(1,4,5)P₃ y DAG (diacilglicerol). Ins(1,4,5)P₃ funciona como un segundo mensajero y se une a sus receptores (IP₃R) en el retículo endoplásmico, liberando así Ca²⁺ del retículo al citoplasma. Ins(1,4,5)P₃ es degradado por una 5-fosfatasa e IPPasa (inositol polifosfato 1-fosfatasa) para formar InsP, que luego es hidrolizado por IMPasa (inositol monofosfatasa) en el inositol libre que se requiere para la vía de señalización del inositol (Rubinsztein *et al.*, 2012).

Un incremento en los niveles intracelulares de inositol o Ins(1,4,5)P₃ inhibe la síntesis de autofagosomas (Decuyper *et al.*, 2011). Algunos fármacos que interactúan con la vía de inositol (litio, carbamazepina, ácido valproico), inducen la autofagia y facilitan la eliminación de los sustratos de la autofagia sin inhibir la actividad de mTORC1 (Sarkar *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2002). La rapamicina tampoco afecta los niveles de inositol, lo que sugiere que el control de la autofagia por Ins(1,4,5)P₃ está mediado de manera independiente de mTOR (Sarkar *et al.*, 2009).

Señalización de Ca²⁺/Calpaína en la autofagia

La autofagia también está regulada por cambios en los niveles de Ca²⁺ intracelular. El Ca²⁺ es el principal segundo mensajero intracelular, regula múltiples funciones fisiológicas en las células, como la contracción, la secreción, el metabolismo, la supervivencia o la muerte y la transcripción de genes (Filippi-Chiela *et al.*, 2016).

El aumento en los niveles citosólicos de Ca²⁺ debido a la salida de Ca²⁺ de las reservas del retículo endoplásmico, resulta en la inactivación de la calpaína que inhibe la autofagia (Høyer-Hansen *et al.*, 2007). Algunos fármacos que bloquean los canales de Ca²⁺ (verapamilo, loperamida, amiodarona, nimodipina y nitrendipina), funcionan como activadores de la autofagia aumentando la síntesis de autofagosomas. Estos compuestos no inhiben mTORC1 (Zhang *et al.*, 2007).

Las calpaínas son cisteína proteasas dependientes de Ca²⁺ (Weber *et al.*, 2019). Los efectos inhibidores de la autofagia de la calpaína están mediados por la activación dependiente de la escisión de la subunidad α de las proteínas G heterotriméricas (G_{sα}), que aumenta la actividad del adenilato ciclasa, generando AMPc (Sukumaran *et al.*, 2021). También, G_{sα} actúa río abajo de la calpaína y río arriba del AMPc en la regulación de la autofagia. Asimismo, AMPc es un blanco posterior de la calpaína y la G_{sα}. Esto crea un vínculo mecánico entre las vías de Ca²⁺/calpaína y

AMPc que modulan la autofagia, como se explica a continuación (García-Arencibia *et al.*, 2010).

Vía AMPc/EPAC/PLC ϵ

La autofagia está regulada por el segundo mensajero, AMPc. El aumento de los niveles de AMPc intracelular inhibe la autofagia. La inhibición farmacológica de la actividad del adenilato ciclasa induce la autofagia, mientras que los agentes que aumentan los niveles de AMPc, inhiben la autofagia (Rubinsztein *et al.*, 2012).

La elevación de los niveles de AMPc por la adenilato ciclasa activa a EPAC (proteína de intercambio activada directamente por AMPc), que a su vez activa Rap2B. Rap2B activo lleva a cabo la hidrólisis mediada por PLC ϵ de PtdIns(4,5)P2 para generar Ins(1,4,5)P3, que inhibe la autofagia. Ins(1,4,5)P3 intracelular se une a su IP3R residente en el retículo endoplásmico para agotar la reserva de Ca²⁺ del retículo, lo que aumenta el Ca²⁺ citosólico que activa la calpaína (Di *et al.*, 2017). Asimismo, la activación de la calpaína anula los efectos inductores de la autofagia de los bloqueadores de los canales de Ca²⁺ y los agentes reductores del AMPc (Williams *et al.*, 2008).

La vía AMPc/EPAC converge en las vías de señalización del inositol y Ca²⁺/calpaína, creando un enlace cíclico independiente de mTOR que regula negativamente la autofagia.

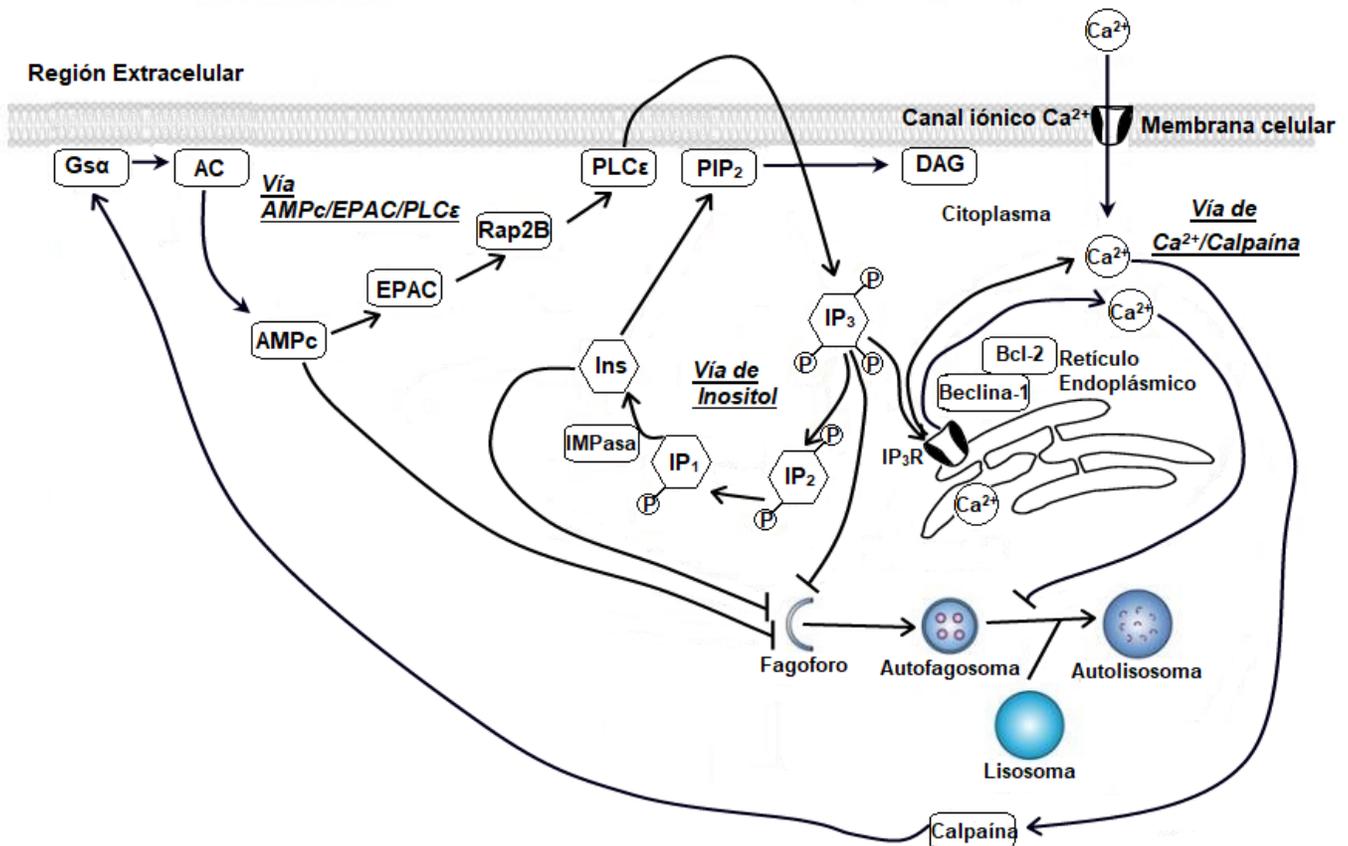


Figura 10. Regulación de la autofagia por vías independientes de mTOR. Varias cascadas de señalización AMPc/EPAC/PLCε, Ca²⁺/Calpaína e inositol inhiben la autofagia independientemente de mTORC1 (Tomado y modificado de Sarkar, 2013).

Durante el inicio, la formación y crecimiento del fagóforo participan varios complejos en donde las proteínas centrales son las ATG. Los cuales son: el complejo ULK1 (ATG1 en levaduras), el complejo Clase III Fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3-K-III) integrado por beclina-1 (ATG6), el complejo ATG2-ATG8/WIPI, ATG9, y dos sistemas de conjugación: ATG12-ATG5-ATG16 y LC3/ATG8 (Li *et al.*, 2020; Suzuki *et al.*, 2017).

INICIO DE LA AUTOFAGIA

COMPLEJO ULK1

En mamíferos, ULK1 (Cinasa activadora de autofagia Similar a Unc-51) es una proteína cinasa serina/treonina esencial para la nucleación y la biogénesis del fagóforo. Participa en la regulación del tráfico de proteínas en el retículo endoplásmico, así como en la autofagia (Joo *et al.*, 2016). ULK1 forma un complejo que está compuesto por ATG13, FIP200 (ATG17) y ATG101 (Zachari & Ganley, 2017).

El complejo ULK1 está regulado por las dos principales proteínas relacionadas con la detección nutricional y energética, mTOR y AMPK (Akers *et al.*, 2012). En condiciones altas de factores de crecimiento y la disponibilidad de nutrientes, mTORC1 activado interactúa con ULK1 a través de Raptor y fosforila varios sitios de las subunidades ULK1 (Ser637/757) y ATG13 (Ser258). Luego, el complejo ULK1 permanece inactivado y la autofagia reprimida (Gwinn, *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011; Puente *et al.*, 2016; Shimobayashi *et al.*, 2014). Por el contrario, AMPK induce la autofagia mediada por ULK1 cuando lo fosforila en Ser317/555/777 para su activación (Egan *et al.*, 2011; Kishi-Itakura *et al.*, 2014). También el complejo ULK1 se vuelve activo por autofosforilación en Thr180 y fosforila ATG13, FIP200, ATG101 y otras proteínas ATG (Bach *et al.*, 2011). De manera interesante, ULK1 también puede regular mTORC1 fosforilando a Raptor a través de un ciclo de retroalimentación negativa (Figura 11) (Dunlop *et al.*, 2011).

Es importante mencionar que para activar a ULK1 se deben eliminar los sitios de fosforilación inhibidores (Ser637/757), para ello interacciona con varias proteínas fosfatasa. La inanición de aminoácidos conduce a la desfosforilación en Ser637 por parte de la Proteína Fosfatasa Magnesio Dependiente 1 Delta (PPM1D). Mientras que la inanición de glucosa induce la desfosforilación en Ser757 por parte de la Proteína Fosfatasa 1 Subunidad Catalítica α (PPP1CA) (Hu *et al.*, 2021).

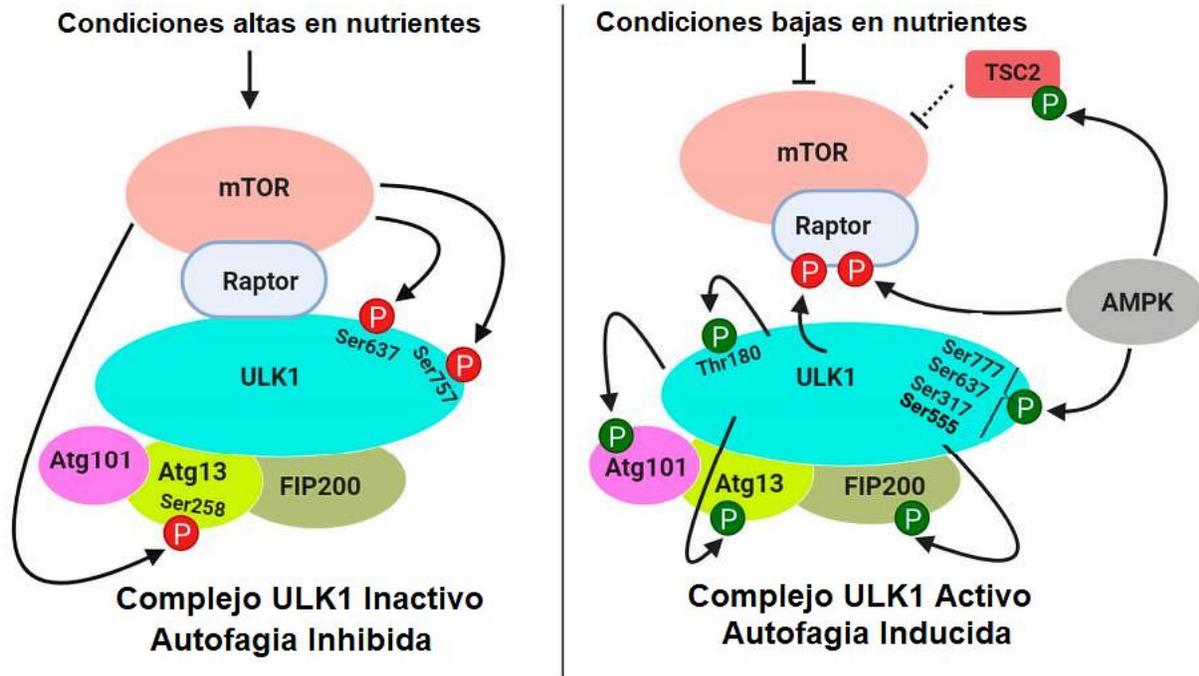


Figura 11. Esquema sobre la regulación del complejo ULK1 por mTORC1 y AMPK. En condiciones de nutrientes, mTORC1 fosforila a ULK1 y ATG13 para mantener inactivo el complejo ULK1. Durante la inanición, cuando se inhibe mTORC1, AMPK puede activar ULK1 regulando negativamente mTORC1 mediante la fosforilación de Raptor o TSC2 o fosforilando directamente ULK1. “P” indica residuo fosforilable. El rojo indica regulación negativa de las proteínas blanco a través de la fosforilación. El verde indica una regulación positiva de las proteínas blanco a través de la fosforilación (Tomado y modificado de Dossou & Basu, 2019).

FORMACIÓN DEL FAGÓFORO

COMPLEJO PI3-K-III

El complejo PI3-K-III participa en la formación y extensión de las membranas del fagóforo y el reclutamiento de proteínas ATG. Este complejo está compuesto BECN1 (ATG6 en levaduras), VPS34 y p150 (Rubinsztein *et al.*, 2012).

En mamíferos, existen dos variedades del complejo PI3-K-III que participan en diferentes fases de la autofagia y en donde BECN1 interactúa con ATG14L y UVRAG (Itakura *et al.*, 2008). El primer complejo denominado PI3-K-III-CI está estructurado por BECN1, ATG14L, VPS34, AMBRA1 y p115

y su función es la formación de una membrana de bicapa de fosfolípidos (membrana de aislamiento o fagóforo). Una vez que se activa el complejo de inicio ULK1, ULK1 provoca la activación de PI3-K-III-CI; las proteínas que componen a este complejo luego se translocan al sitio de ensamblaje del fagóforo, que se encuentra en una estructura característica del retículo endoplásmico llamada omegasoma (Dossou & Basu, 2019; Fogel *et al.*, 2013). El segundo es llamado PI3-K-III-CII que contiene a BECN1, UVRAG, VPS34 y VPS15 y, su función es el alargamiento del fagóforo, así como el tráfico endolisosomal. BECN1-UVRAG regulan la autofagia mediante la interacción con Bif-1 (proteína de la familia BCL-2 de dominio BH3) (Takahashi *et al.*, 2007).

BECN1 es fundamental en la regulación del complejo PI3-K-III porque puede activar o inhibir la autofagia al unirse a algunas proteínas. Por ejemplo, la activación del complejo ULK1 da como resultado la translocación de BECN1 al sitio de ensamblaje del fagóforo, donde recluta a los demás componentes de PI3-K-III. ULK1 fosforila a BECN1 en Ser15 para generar tanto el complejo BECN1-ATG14L como BECN1-UVRAG (Russell *et al.*, 2013). Asimismo, en ausencia de glucosa AMPK puede fosforilar a BECN1 en Ser93/96 para activar el complejo BECN1-ATG14L (Kim *et al.*, 2013). BECN1 interviene en la autofagia y la apoptosis, ya que tiene un dominio BH3 al cual se le unen algunos miembros de la familia Bcl-2 (anti-apoptóticas), como Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W y Mcl-1, para inhibir la autofagia (Kang *et al.*, 2013).

En un estudio se reportó que la participación del complejo PI3K-III es relevante para la inducción de autofagia después de la fertilización *in vitro* de los ovocitos de ratones, sin embargo, no se ha estudiado su participación en la atresia (Yamamoto *et al.*, 2014). Gawriluk *et al.*, 2011 demostraron que la deficiencia de BECN1 en los ovarios de ratón de 1 día de nacidos produce una pérdida de ovocitos de hasta un 50%-60%.

Otro efecto de la limitación de nutrientes está involucrado con la producción de moléculas reactivas al oxígeno, ya que provoca una acumulación parcial de H₂O₂ en la mitocondria a través de PI3K-III, induciendo a la autofagia (Fang *et al.*, 2017).

ELONGACIÓN DEL FAGÓFORO Y FORMACIÓN DE AUTOFAGOSOMAS

En el omegasoma, el aumento de la producción local de PI3P da como resultado el reclutamiento de las proteínas efectoras WIPI2 y DFCP1 a través de la interacción de PI3P con sus dominios de unión para la transferencia de lípidos y producir la elongación del fagóforo. Recientemente se demostró que WIPI2 se une directamente a ATG16L, reclutando así el complejo ATG12-ATG5/ATG16L (King *et al.*, 2021). Por otro lado, ATG2 entrega los fosfolípidos contenidos en la membrana del retículo endoplásmico a la cara citoplásmica de la membrana del fagóforo. A partir de entonces, los fosfolípidos entregados por ATG2 son volteados y redistribuidos por ATG9 (Noda, 2021). La proteína transmembranal ATG9 traslada fragmentos de membrana lipídica desde el citoplasma hasta el lumen del fagóforo en crecimiento (Mailler *et al.*, 2021).

Durante la elongación del fagóforo, se requieren dos sistemas de conjugación similares a la ubiquitina, incluidos los sistemas de conjugación ATG12-ATG5 y LC3-PE; que contribuyen con la expansión de la membrana del fagóforo y la formación del autofagosoma (Sarkar, 2013).

Sistema de conjugación ATG12-ATG5

En los mamíferos, ATG12 es activado por la enzima ATG7 (tipo E1), se conjuga con ATG5 a través de la enzima ATG10 (E2) y luego el conjugado ATG12-ATG5 (interacción covalente) puede estabilizarse mediante proteínas ATG16L (interacción no covalente) y formar además el complejo ATG12-ATG5/ATG16L, que es importante para la producción del sistema de conjugación LC3 (Metlagel *et al.*, 2013).

La expresión de *Atg7* y *Atg5* es relevante durante todas las etapas de ovogénesis. Los ovarios de ratones deficientes de *Atg7* contienen menos células germinales y folículos primordiales (Song *et al.*, 2015; Delcour *et al.*, 2019), por lo que las proteínas ATG desempeñan un papel crítico en la supervivencia de las células germinales.

Sistema de conjugación LC3-PE

Por otro lado, LC3 es una proteína soluble que se asocia al fagóforo para promover su elongación y su cierre. Se sintetiza primero como una proteína precursora (pro-LC3), luego el péptido C-terminal del precursor de pro-LC3 se escinde por ATG4B para formar LC3-I con una glicina C-terminal expuesta y es todavía inactiva (Tanida, 2011). LC3-I citosólica es luego activada por la enzima ATG7

(E1) y transferida a la enzima ATG3 (E2). ATG3 actúa como enzima conjugadora para que LC3-I citosólica se lipide al unirse con el lípido de membrana fosfatidiletanolamina (PE) modificándolo a LC3-II, y pueda participar en el crecimiento y cierre del fagóforo (Agrotis *et al.*, 2019).

LC3 lipidado (LC3-II) tienen la capacidad de detectar y guiar la curvatura del fagóforo y posiblemente un papel directo en la remodelación de la membrana. Esto gracias a una hélice alfa antipática que comprende la mayor parte del amino terminal de ATG3. La hélice alfa consta de residuos hidrofóbicos flanqueados por residuos hidrofílicos para penetrar la membrana; entonces la curvatura del fagóforo se detecta debido a una mayor abundancia de defectos de membrana, lo que ayuda a la inserción de regiones hidrofóbicas de proteínas en la membrana (Nguyen *et al.*, 2017).

LC3 tiene tres isoformas diferentes: LC3A, LC3B y LC3C. Tanto en células humanas sanas como en células cancerosas, cada una de las isoformas de LC3 se distribuyen de diferente manera. LC3A se localiza predominantemente en la región perinuclear y nuclear que en el área citoplasmática, mientras que LC3B se distribuye en el citoplasma. LC3C se ubica en el citoplasma y fuertemente en los núcleos (excluyendo los nucléolos). Las diferentes distribuciones indican que las isoformas de LC3 tienen diferentes funciones (Baeken *et al.*, 2020; Koukourakis *et al.*, 2015).

Receptores de autofagia

El contenido del autofagosoma se enriquece con sustratos que han sido ubiquitinados, entre otras marcas. Los receptores de autofagia son proteínas que reconocen el contenido selectivo de sustratos ubiquitinados (Kirkin & Rogov, 2019).

Los receptores de autofagia se unen a proteínas ubiquitinadas a través de dominios de unión a ubiquitina y las reclutan en el autofagosoma asociándose a LC3-II a través de una región de interacción con LC3 (LIR) (Lamark & Johansen, 2021). Algunos receptores de autofagia que están integrados en la membrana promueven la degradación de los organelos que carecen de un dominio de unión a la ubiquitina. Estos adaptadores transmembrana pueden activarse mediante la fosforilación o el aumento de los niveles de proteínas para desencadenar la absorción de organelos dañados en autofagosomas (Palikaras *et al.*, 2018).

El receptor de autofagia mejor caracterizado es p62/SQSTM1, que contiene dominios de unión a ubiquitina y LIR para promover la orientación de la carga de autofagia (Figura 12) (Lamark & Johansen, 2021). Además de unirse a LC3-II y ubiquitina, p62/SQSTM1 puede unirse a otras moléculas como RAPTOR (subunidad del complejo mTORC1) y funcionar como un regulador en las

vías de detección de aminoácidos y estrés oxidativo (Katsuragi *et al.*, 2015). Ya que es digerido por proteasas lisosomales junto con otras cargas de autofagia, los niveles de p62/SQSTM1 tienden a estar inversamente correlacionados con el flujo autofágico, lo que los convierte en marcadores útiles para estudiar la autofagia (Lamark *et al.*, 2017).

p62/SQSTM1 está implicado en varias formas de autofagia selectiva, incluidas, entre otras, agregofagia (degradación de agregados de proteínas), xenofagia (degradación de patógenos), lipofagia (degradación de lípidos) y mitofagia (degradación de mitocondrias) (Stolz *et al.*, 2014).

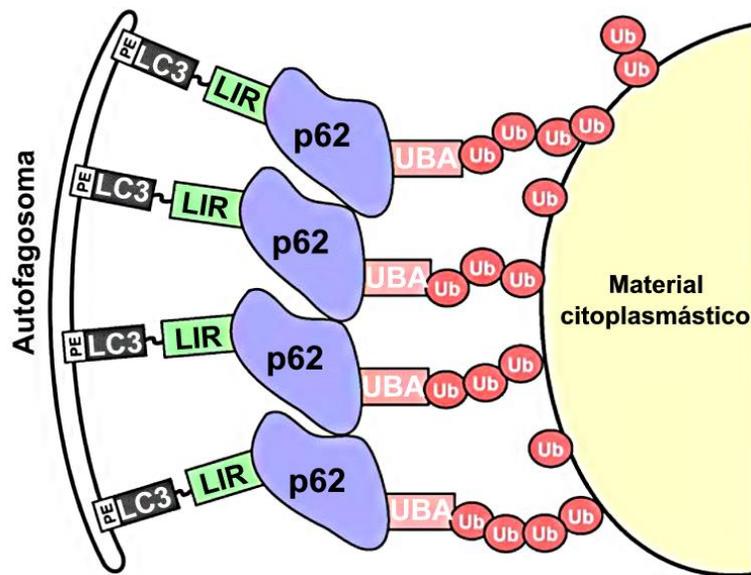


Figura 12. Receptor de autofagia p62/SQSTM1. Se muestra las interacciones para vincular el material citoplasmático a un autofagosoma en crecimiento. El receptor p62/SQSTM1 tiene un dominio UBA C-terminal que interactúa con las cadenas de ubiquitina unidas al material citoplasmático a degradar o reciclar. También, tiene el motivo de la región de interacción con LC3 (LIR) que interactúa con LC3 unido covalentemente a la superficie de la membrana interna de un autofagosoma en crecimiento (Tomado y modificado por Lamark *et al.*, 2017).

Autofagia selectiva

Dependiendo del contenido del autofagosoma, la autofagia puede ser selectiva o no selectiva. En la autofagia no selectiva, el autofagosoma secuestra elementos del citoplasma para degradarlos y mantener los niveles de nutrientes en las células. Este tipo de autofagia se observa con frecuencia en niveles bajos de nutrientes durante la inanición. Por el contrario, se requiere autofagia selectiva para mantener el número y la integridad de los organelos celulares y de las proteínas. La autofagia selectiva se basa en la unión de los receptores de autofagia con los miembros de la familia ATG8 (LC3 A, B, C; GABARAP L1, L2) asociados a la membrana y la ubiquitina (Zaffagnini & Martens, 2016).

Mitofagia

La degradación autofágica de las mitocondrias (mitofagia) es selectiva para las mitocondrias dañadas. La mitofagia se activa en condiciones fisiológicas, por ejemplo, diferenciación celular, mitocondrias paternas después de la fertilización, maduración de células sanguíneas e inanición; pero igual se puede inducir por una serie de estímulos patológicos, por ejemplo, hipoxia, estrés energético, estrés oxidativo y desequilibrio de Ca^{2+} (Shefa *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2021).

Durante la hipoxia o estrés energético, la despolarización de la membrana mitocondrial externa o la acumulación de receptores de mitofagia pueden bloquear la fusión mitocondrial y desencadenar el aislamiento del resto del compartimento mitocondrial, promoviendo así su absorción en un autofagosoma (Onishi *et al.*, 2021). La eliminación eficiente de las mitocondrias dañadas es esencial para limitar la liberación de especies reactivas de oxígeno, ADN mitocondrial y activadores de la apoptosis intrínseca de las mitocondrias dañadas al citosol (Babbar *et al.*, 2020).

MADURACIÓN DEL AUTOFAGOSOMA

Los autofagosomas que acaban de sellarse todavía tienen casi todas las proteínas ATG en su superficie externa, que deben reciclarse para su reutilización. Una o más de estas proteínas también pueden actuar como inhibidores del reclutamiento y/o activación de la maquinaria de fusión. La maduración de los autofagosomas se define como la eliminación de todas las proteínas ATG de su superficie que se inició después del cierre del fagóforo (Reggiori & Ungermann, 2017). La proteasa ATG4 promueve la maduración del autofagosoma a través de la lipidación reversible y la

deslipidación de LC3 (Park *et al.*, 2022). Una fosfatasa requerida para la maduración del autofagosoma es YMR1 (en levaduras) quien reduce los niveles de PI3P y su localización subcelular (Licheva *et al.*, 2022).

FUSIÓN DEL AUTOFAGOSOMA CON LISOSOMAS

El autofagosoma maduro fusiona su membrana externa con los lisosomas (formando así los autolisosomas) para dar lugar a la fase de degradación (Hamasaki *et al.*, 2013). La interacción de UVRAG del complejo PI3-K-III-CII (BECN1, UVRAG, VPS34 y VPS15) con el complejo de Fusión Homotípica y Clasificación de Proteínas de Vacuola (HOPS, por sus siglas en inglés) estimula la fusión de autofagosomas y lisosomas. *Rubicon* suprime la formación de autolisosomas al interactuar con UVRAG (Grasso *et al.*, 2018).

La fusión de la membrana del autofagosoma con la membrana del lisosoma requiere tanto el complejo HOPS, que une los autofagosomas a los lisosomas, como la sintaxina-17 (STX17), que facilita la fusión de la membrana. La proteína Pacer interactúa con STX17 y recluta el complejo HOPS para autofagosomas (Cheng *et al.*, 2017). La fusión autofagosoma-lisosoma está mediada por el tráfico de varias proteínas, incluidas las GTPasas pequeñas (RAB), como Rab-7a relacionada con Ras. Las proteínas efectoras, como los receptores de proteína de unión a fusión (SNARE), las ataduras, los adaptadores y las proteínas motoras, así como los microtúbulos los cuales son esenciales para el tráfico de autofagosomas maduros desde los sitios de su inicio hasta su degradación (Lőrincz & Juhász, 2020).

Los lisosomas son organelos encerrados en una membrana y contienen más de 60 enzimas lisosomales (hidrolasas ácidas) capaz de digerir el material secuestrado (desde ácidos nucleicos hasta bacterias) y, una capa de glicosilación en el lado luminal de su membrana. LAMP1 y LAMP2 son proteínas integrales de membrana que están altamente glicosiladas con el fin de protegerlas de la proteólisis lisosomal (Chang *et al.*, 2002; Lübke *et al.*, 2009).

LAMP1 es un marcador lisosomal que se distribuye entre las vesículas autofágicas. La aparición de la expresión de LAMP1 durante el ensamblaje folicular sugiere un papel para la autofagia (Rusten *et al.*, 2004; Scott *et al.*, 2004).

Los lisosomas se regeneran a partir de la membrana autolisosomal en un proceso denominado reformación de lisosomas autofágicos, en donde se prepara el escenario para un nuevo ciclo de iniciación de autofagosomas. Durante la reformación de lisosomas autofágicos, las membranas

lisosomales se reciclan para mantener la homeostasis de los lisosomas. Este paso es necesario para suministrar lisosomas funcionales con el fin de generar autolisosomas durante la inanición prolongada (Chen *et al.*, 2019C).

FLUJO AUTOFÁGICO

El término "flujo autofágico" se utiliza para cuantificar el proceso dinámico de la autofagia, desde la formación de los autofagosomas que contienen el material a destruir, su fusión con lisosomas y su degradación final dentro de los autolisosomas (Jung *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2013).

Ensayo basado en la dinámica de LC3

La conversión de LC3-I a LC3-II es importante porque se ha observado que LC3-II se degrada en los autolisosomas por lo que se usa ampliamente como marcador para monitorear el proceso autofágico. Sin embargo, un nivel elevado de LC3-II no siempre es indicativo de inducción de autofagia y puede representar un bloqueo (por inhibidores lisosomales o patologías) en la maduración del autofagosoma (Kang *et al.*, 2018; Meng *et al.*, 2018; Ueno & Komatsu, 2020).

Ensayo de degradación de p62/SQSTM1

p62/SQSTM1 sirve como enlace entre LC3 y sustratos ubiquitinados y, es degradado eficientemente por autofagia. Entonces, el nivel de proteínas p62/SQSTM1 se puede utilizar para controlar el flujo autofágico (He *et al.*, 2020; Lamark & Johansen, 2021). Aunque la medición del nivel de p62/SQSTM1 celular parece correlacionarse bien con otros marcadores de flujo autofágico, este ensayo tiene algunas desventajas experimentales. Ya que (1) p62/SQSTM1 es degradado tanto por la autofagia como por el sistema ubiquitina-proteasoma, y su nivel puede aumentar cuando se inhibe el proteasoma; (2) además de LC3, contiene dominios que interactúan con varias moléculas de señalización, lo que indica que puede tener otras funciones con respecto a su papel en la autofagia; (3) puede regularse transcripcionalmente bajo ciertas condiciones (Zhang *et al.*, 2013). Por lo tanto, para monitorear el flujo autofágico se recomienda que la medición del nivel de p62/SQSTM1 se realice en combinación con otros métodos como el recambio de LC3-II (Klionsky *et al.*, 2021; Lin *et al.*, 2018).

La dinámica de las anteriores proteínas se puede analizar mediante el análisis de la presencia de las proteínas de un lisado y visualizado por bandas que representan a las proteínas de interés (*Western Blot*), la inmunofluorescencia, la unión con la proteína verde fluorescente sensible al pH (GFP-LC3/ p62/SQSTM1). Últimamente se desarrollaron unos péptidos diseñados como sensores intracelulares que reconocen específicamente a cada proteína de la familia ATG8 (LC3 A, B, C; GABARAP L1, L2) para rastrear los autofagosomas (Stolz *et al.*, 2017).

OVARIO

El ovario es un órgano pareado del sistema reproductor femenino, que está conformado por tres estructuras: epitelio germinativo o superficial, corteza y médula. El epitelio superficial está constituido por una capa de células cúbicas, que tienen continuidad desde el peritoneo hasta la periferia del ovario. La corteza es una amplia zona periférica que contiene estructuras denominadas folículos y un estroma formado por tejido conjuntivo compacto, con gran cantidad de vasos sanguíneos (Figura 13). Las funciones principales del ovario son generar un óvulo maduro y secretar hormonas esteroideas necesarias con el fin de preparar el tracto reproductivo para la fertilización y el embarazo (Findlay *et al.*, 2019; Gartner, 2020).

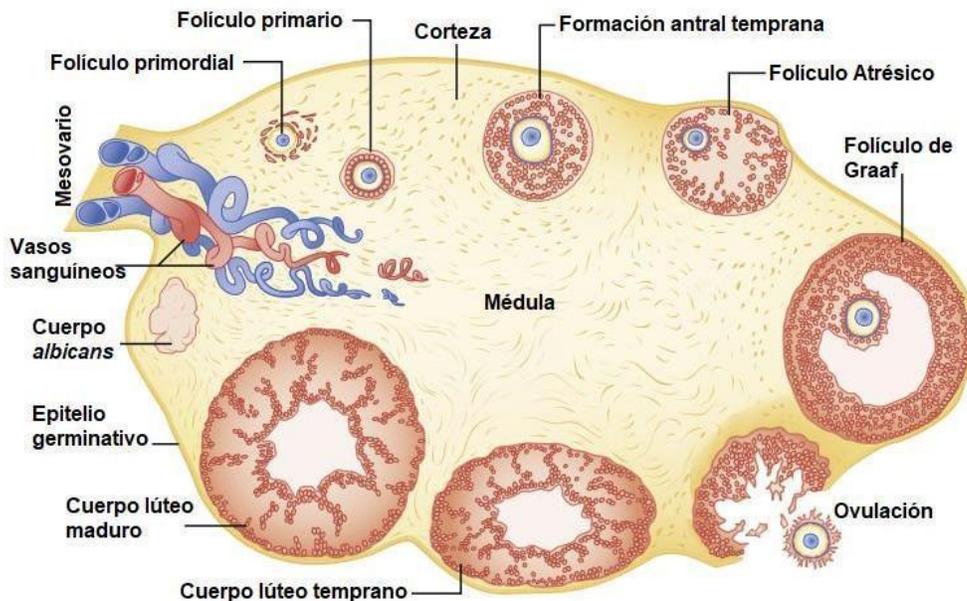


Figura 13. Esquema de la estructura del ovario en mamíferos. Se muestran las tres principales partes del ovario: epitelio superficial, corteza y médula. Se presenta el ciclo folicular foliculogénesis y luteogénesis (Tomado y modificado de Strauss III *et al.*, 2019).

Durante el desarrollo fetal, el ovocito pasa por un proceso de diferenciación que comienza cuando las células troncales de la línea germinal se dividen por mitosis, dando lugar a las ovogonias, unas células precursoras mitóticas que inician la meiosis convirtiéndose en ovocitos. Los ovocitos se detienen en la etapa del diploteno de la profase I de la meiosis I hasta que se reanuda durante la maduración del ovocito (Elkouby *et al.*, 2017).

FOLICULOGÉNESIS

Los folículos ováricos son la unidad funcional y estructural del ovario, están constituidos por un ovocito rodeado de células somáticas. Estos folículos atraviesan por un proceso llamado foliculogénesis que permite la proliferación de las células somáticas y el crecimiento del ovocito, dando como resultado la producción de uno o varios óvulos con capacidad de ser fecundados (Ford *et al.*, 2020).

En mamíferos, las hembras nacen con un número finito de células germinales, las cuales se encargan de la formación de los gametos. Dichas células estarán incluidas en folículos formando parte de la reserva ovárica. Estos folículos quiescentes inician el crecimiento de forma paulatina, dando origen al desarrollo folicular en el que atraviesan por las fases primordiales, primarios, secundarios, pre-antrales y antrales o seleccionable (Figura 14) (Grive, 2020).

La foliculogénesis es regulada de manera coordinada por factores endocrinos y ováricos. La actividad endocrina es mediada por el sistema hipotálamo-hipófisis-ovario. La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es secretada por el hipotálamo; la hipófisis produce la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) que actúan respectivamente, sobre las células de la granulosa y teca en el folículo (McGee & Hsueh, 2000). La actividad ovárica produce esteroides como estrógenos, andrógenos, progesterona y péptidos entre ellos la inhibina, la activina, el Factor de Crecimiento Insulínico tipo I y tipo II (IGF-I y II), el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), el Factor de Crecimiento y Diferenciación 9 (GDF9), la proteína morfogenética ósea 15 (BMP15) y las conexas (Plant & Zeleznik, 2014).

El desarrollo del folículo se puede clasificar en las siguientes dos fases según su etapa de desarrollo y la dependencia de las gonadotropinas: (a) fase independiente de las gonadotropinas: involucra el crecimiento del folículo a través de las etapas primordial, primaria y secundaria, que es completamente independiente de la FSH y la LH; y (b) fase dependiente de gonadotropina: que depende de la FSH y la LH; inicia a partir del folículo preantral, pasando al folículo antral temprano en donde crece y madura para producir el reclutamiento, la selección y la ovulación del folículo (Figura 14) (Lee *et al.*, 2021). El reclutamiento folicular se refiere a la población de folículos pre-antrales y antrales tempranos presentes en la superficie del ovario que pueden ser seleccionados como folículos ovulatorios, mientras que la selección folicular se refiere a un solo folículo (especies monovulatorias) o varios folículos (especies poliovulatorias) que escapan de la atresia folicular (como se describe con detalle más adelante) y ovulan (Clément *et al.*, 2021).

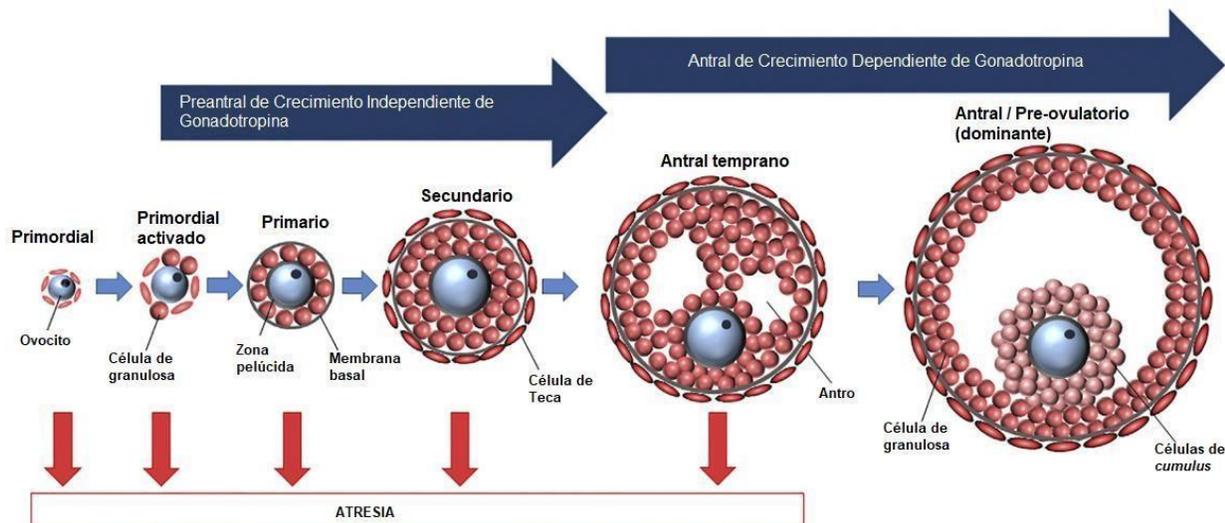


Figura 14. Representación esquemática de las etapas de la foliculogénesis de los mamíferos, los tipos de folículos y la atresia. Se muestra el ovocito, rodeado por células de la granulosa (cúbicas) y de la teca (aplanadas). En la foliculogénesis se presentan diferentes estados de crecimiento: folículo primordial quiescente, primordial activado, primario, secundario, antral temprano y antral o pre-ovulatorio. Además, el desarrollo folicular se puede dividir en dos fases: la primera se denomina preantral o fase independiente de gonadotropina regulada por señalización autocrina y paracrina; la segunda se llama fase antral o dependiente de gonadotropina, se caracteriza por la actividad esteroidogénica de las células foliculares (Tomado y modificado de Findlay *et al.*, 2019).

ATRESIA FOLICULAR

La atresia folicular es un proceso en el cual se eliminan todos los folículos que no son aptos para continuar el proceso de maduración y su posterior ovulación. Más del 99% de los ovocitos sufren muerte celular en los ovarios de mamíferos, por lo que pocos de ellos se ovulan durante la vida sexual activa. El número de ovocitos al nacer y su tasa de disminución determinan la vida fértil de las hembras (Tilly, 2001).

La atresia folicular ocurre tanto en la vida prenatal como posnatal y en todas las etapas del desarrollo folicular. Hay una pérdida significativa de células germinales durante la formación de folículos primordiales en la mayoría de los ovarios de mamíferos alrededor del momento del nacimiento. Por ejemplo, en ratones se informó que el número de células germinales disminuyó de ~6,070 a ~1,730 por ovario desde los 13.5 días después del coito (dpc) hasta los 3 días después del parto. En humanos se ha descrito una situación similar de que hay alrededor de 6 a 7 millones de células

germinales en la semana 20 de gestación, mientras que solo un tercio de ellas permanecen al nacer (Monget & Monniaux, 2019; Sun *et al.*, 2018). De igual manera, todos los folículos en crecimiento durante la etapa pre-púber degeneran por atresia, mientras que muy pocos (alrededor del 0.01%) llegan a ser ovulados en adultos (Figura 15) (Monniaux *et al.*, 2019). La susceptibilidad a la atresia, depende de la etapa de desarrollo folicular, siendo predominante en la fase antral y el periodo de formación del antro (Matsuda *et al.*, 2012; Tilly, 1993).

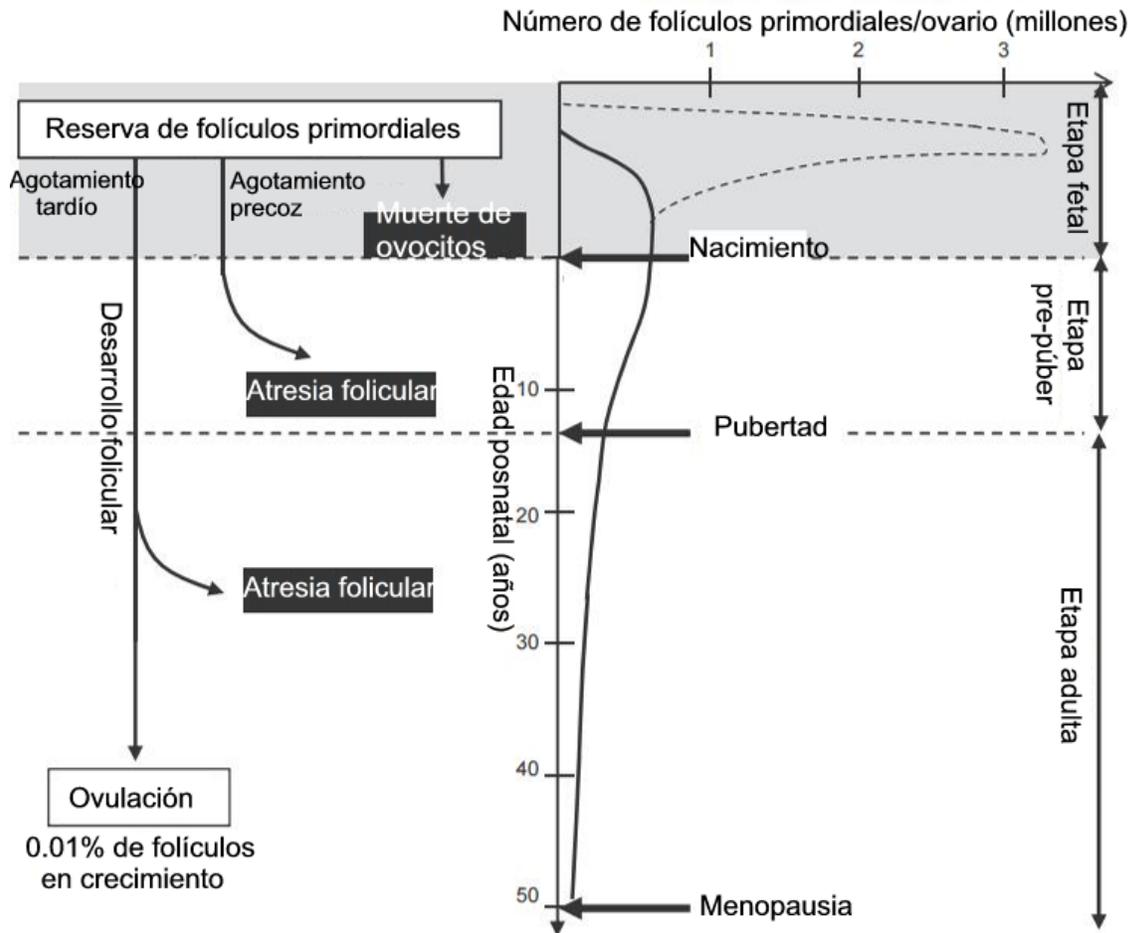


Figura 15. Cambios en la reserva ovárica de los folículos primordiales a lo largo de la vida en humanos. En la parte derecha de la figura, las líneas continua y punteada representan el número de folículos primordiales y el número total de células germinales por ovario, respectivamente. En la parte izquierda, se muestra que la muerte de los ovocitos y la atresia folicular conducen al agotamiento de la reserva y, que sólo el 0.01% de los folículos en crecimiento se logran ovular (Tomado y modificado de Monniaux *et al.*, 2019).

Una característica de la atresia en diversos organismos ha sido la constante presencia de apoptosis en los ovocitos y las células de la granulosa (Tilly, 1993; Pérez & Tilly; 1997). La incidencia de muerte en este tipo celular ha sido documentada morfológica y bioquímicamente (Byskov, 1974; Hirshfield, 1991; Tilly *et al.*, 1991; Hughes & Gorospe, 1991; Vázquez-Nin & Sotelo, 1967). La evaluación de la fragmentación de ADN internucleosomal, ha sido tomada como una evidencia de la presencia de muerte apoptótica conservada desde aves hasta humanos (Bosu *et al.*, 1996; Hughes & Gorospe, 1991; Jolly *et al.*, 1994; Quirk *et al.*, 1995). Trabajos en ovario de codorniz y de ganso, demostraron que las células de la granulosa pueden ser eliminadas por apoptosis, autofagia o necrosis (D'Herde *et al.*, 1996; Kovacs *et al.*, 1992). Otro tipo de muerte descrito presente en células de la granulosa en rata es la paraptosis (Torres-Ramírez *et al.*, 2016).

Un folículo sano se caracteriza morfológicamente cuando la unión de un ovocito y sus células de la granulosa se encuentra bien establecida. El ovocito posee una forma regular, tanto su citoplasma como el núcleo no poseen alteraciones; la zona pelúcida rodeada al ovocito de manera continua y las células de la granulosa están unidas entre ellas (Figura 16A) (Celestino *et al.*, 2018).

De acuerdo con la etapa del folículo, existe una susceptibilidad diferente entre los compartimentos del folículo a la atresia. En los folículos primordiales a pre-antrales generalmente es el ovocito quien inicia el proceso de muerte autofágico y luego las células somáticas por apoptosis. En cambio, en folículos antrales primero las células somáticas se mueren y luego el ovocito, principalmente por apoptosis (Meng *et al.*, 2018). Cuando da inicio la atresia, se pierde la unión entre las células de la granulosa y los ovocitos, lo que produce la ruptura de la zona pelúcida. El ovocito adquiere una forma irregular y su citoplasma se degenera y luego se fragmenta. En la atresia avanzada, el núcleo y el citoplasma del ovocito y de las células somáticas se compactan. Las células de la granulosa pierden contacto entre ellas mismas y de la membrana basal del folículo (Figura 16B-D). Además, hay presencia de macrófagos en el antro folicular si son folículos pre-antrales (Wang *et al.*, 2010).

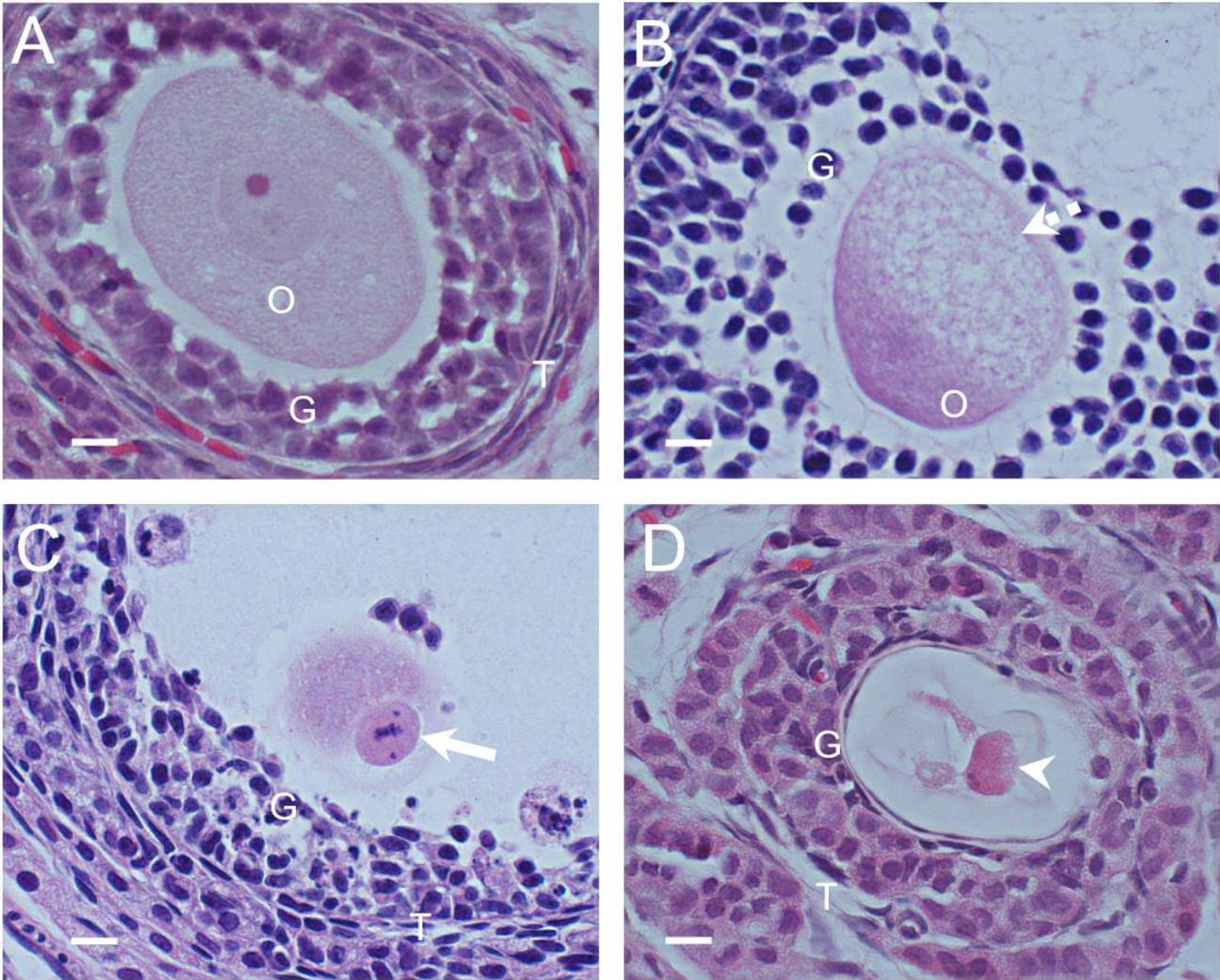


Figura 16. Morfología de folículos viables y atrésicos. (A) folículo saludable que presenta un estrecho contacto entre el ovocito y las células de la granulosa que lo rodean. (B) folículo atrésico inicial en donde hay una interrupción del contacto intercelular entre el ovocito y las células de la granulosa. La zona pelúcida está retraída. El ovocito tiene una forma irregular y vesículas claras en el citoplasma (flecha punteada) (C) Folículo con atresia avanzada en donde el ovocito está fragmentado, su núcleo compacto, además hay células de la granulosa con núcleo picnótico. (D) Folículo atrésico final en donde está muy compacto el citoplasma y núcleo del ovocito, ya se ha perdido la estructura folicular. O: ovocito, G: células de la granulosa, T: células de la teca, flecha: ovocito con núcleo compacto, punta de flecha: ovocito muy degenerado. Tinción hematoxilina-eosina. Barra: 10 μm (Imagen propia).

ANTECEDENTES RELEVANTES

Se ha observado que en ratas prepúberes los ovocitos se eliminan mediante tres procesos: la muerte celular por apoptosis, la muerte celular dependiente de autofagia y un evento mixto en el que ambas rutas participan en la misma célula. La autofagia en células germinales ha sido estudiada mediante la incorporación de monodansilcadaverina y la monitorización de LC3-I/LC3-II con la técnica de *Western Blot* (Escobar *et al.*, 2010), inmunofluorescencia de LAMP1, LC3, BECN1; así como la observación de vesículas autofágicas a nivel ultraestructural. Los diferentes procesos de muerte encontrados en ovocitos de ovario de rata pre-púber muestran diferentes tendencias, ya que en el día 1 de edad la apoptosis es la vía predominante de eliminación; a los 5 días hay una drástica disminución de muerte celular, mientras que a los 19 se vuelve a incrementar la apoptosis y también se hace evidente la muerte autofágica. A la edad de 28 días el evento más frecuente es aquel en donde se encuentran presentes marcadores de muerte apoptótica y autofágica al mismo tiempo. Durante las edades mencionadas de la etapa pre-púber se presentan diferentes características citofisiológicas a través de la maduración folicular (Ortiz *et al.*, 2006; Escobar *et al.*, 2008; 2019).

A pesar de los hallazgos mencionados, en donde existe un índice elevado de ovocitos en organismos pre-púberes que presentan marcadores bioquímicos de ambos eventos al mismo tiempo, se desconoce aún el mecanismo molecular que conduce hacia el inicio de autofagia durante la eliminación de los ovocitos durante la atresia folicular. Por lo anterior, es necesario hacer un estudio para tratar de describir el mismo.

HIPÓTESIS

Si la interrupción de la comunicación entre los ovocitos y las células de la granulosa genera un estrés en las células germinales debido a la ausencia de nutrientes, oxígeno, factores de crecimiento entre otros elementos de sobrevivencia, entonces las células germinales podrían realizar la autofagia de manera sostenida mediante la vía de ERK1/2 y/o mTOR, lo que las llevaría a una muerte mediada por autofagia.

OBJETIVO GENERAL

Identificar el mecanismo molecular inicial de la autofagia durante la eliminación de ovocitos en folículos atrésicos de ratas Wistar pre-púberes (1-28 días).

OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Identificar las características morfológicas de los folículos atrésicos de ovarios de rata de 1, 5, 19 y 28 días de edad.
- ✓ Detectar la presencia de la proteína mTOR total y en su forma activa en ovocitos de folículos atrésicos por inmunofluorescencia.
- ✓ Identificar la presencia de las proteínas autofágicas LC3A (presencia de autofagosomas y su localización nuclear) y LAMP1 en los ovocitos de folículos atrésicos en inmunohistoquímica.
- ✓ Evaluar el flujo autofágico por medio de la inmunolocalización de la proteína p62/SQSTM1.
- ✓ Identificar la presencia de MAPK y AKT en poblaciones enriquecidas de ovocitos.
- ✓ Analizar la cantidad de las proteínas mTOR total, p-mTOR Ser2448 (para ver la actividad de mTOR), BECN1, ATG14, ATG4B, LC3A, LAMP1 y p62/SQSTM1 en poblaciones enriquecidas de ovocitos.

MATERIAL Y MÉTODOS

El proyecto se desarrolló en dos fases: en la primera fase “*in situ*”, se hicieron cortes histológicos seriados de tejido incluido en parafina para la observación morfológica e inmunolocalizar a las proteínas relacionadas con la autofagia LC3A, LAMP1, p62/SQSTM1, mTOR, p-mTOR Ser2448. En la segunda fase “*in vitro*”, se realizaron cultivos celulares de ovocitos y se les extrajeron las proteínas totales para estudiarlas mediante la técnica de *Western Blot*.

PARTE I ANÁLISIS “*in situ*”

Material biológico

Se utilizaron 4 ratas “Wistar” de 1, 5, 19 y 28 días de nacidas. La manipulación de las ratas se realizó siguiendo los lineamientos bioéticos de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM 062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio” (SAGARPA, 2015). El bioterio de la Facultad de Ciencias, UNAM cuenta con la autorización bioética con la clave AUT-B-C-0719-054 por parte de SADER y SENASICA. Las ratas se anestesiaron en una cámara saturada con gases de isoflurano (Sofloran Vet Pisa, SAGARPA Q-7833-222) y posteriormente fueron colocadas en un recipiente en donde se realizó la disección quirúrgica de los ovarios; al término de la operación fueron eutanasiadas. Ambos órganos fueron fijados y procesados para microscopía óptica.

Procesamiento para microscopía óptica

Se fijaron los ovarios con paraformaldehído al 4% preparado en buffer de fosfatos (PBS) durante 24 hrs. Se lavaron tres veces con PBS durante 30 minutos cada uno, se deshidrataron con alcoholes graduales (etanol 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 100%) durante 1 hr en cada alcohol. Después, se colocaron en etanol-xilol (1:1) durante 30 minutos, xilol-aceite de cedro (1:1) durante 30 minutos. Posteriormente, se pre-incluyeron en parafina-xilol, parafina 1 y parafina 2 durante una hora en cada uno. Por último, se incluyeron en parafina utilizando moldes plásticos.

Corte de ovarios incluidos en parafina

Se realizaron cortes seriados de un espesor de 5-7 micrómetros con el microtomo Leica modelo RM2135. Los cortes se colocaron en portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina.

Desparafinación e hidratación de los cortes de parafina

Los cortes de ovario se colocaron en una estufa de 60°C durante 15 minutos y luego se dejaron enfriar. Posteriormente, los cortes de ovario se sumergieron en vasos coplin durante 10 minutos en las siguientes soluciones: xilol puro, etanol absoluto, etanol al 90%, etanol al 70%, etanol al 50%, etanol al 30%, agua destilada y finalmente en PBS.

Tinción con Hematoxilina-Eosina

Una vez desparafinados e hidratados los cortes, se sumergieron en diferentes soluciones dentro de vasos coplin. Primero los cortes se tiñeron con hematoxilina durante 10 minutos y se enjuagaron en agua de la llave durante 10 minutos. Posteriormente, se realizaron una serie de enjuagues en diferentes soluciones: etanol ácido (etanol al 70% con 1% de HCl); agua amoniacal (NH₄OH 1%) y etanol al 30%. Después se tiñeron con eosina alcohólica durante 3 minutos. Nuevamente se sumergieron de forma corrida en etanol al 80%, etanol al 90%, etanol absoluto, etanol absoluto- xilol 1:1 y xilol puro. Finalmente, las muestras se montaron con resina sintética y un cubreobjetos.

INMUNOFLUORESCENCIA

Anticuerpos Primarios:

Para inmunodetecciones sencillas: Anti-mTOR, desarrollado en conejo (Abcam; número de catálogo: ab32028; Lot: GR245538-16) dilución 1:50 en PBS; Anti-p-mTOR(ser2448), desarrollado en conejo (Abcam; número de catálogo: ab84400; Lot: GR306782-1) dilución 1:50 en PBS; Anti-LC3A desarrollado en ratón (Abcam; número de catálogo: ab168803; Lot: GR3187649-9) dilución 1:100 en PBS; Anti-LAMP1 desarrollado en conejo (Abcam; número de catálogo: ab24170; Lot:

GR127403-1) dilución 1:100 en PBS; Anti- p62/SQSTM1 desarrollado en conejo (Abcam; número de catálogo: ab155686; Lot: GR199733-33) dilución 1:50 en PBS.

Para inmunodetecciones dobles:

- 1) Anti-p-mTOR(ser2448), desarrollado en conejo (Abcam; número de catálogo: ab84400; Lot: GR306782-1) dilución 1:50 en PBS y Anti-LAMP1 desarrollado en conejo (Abcam; número de catálogo: ab24170; Lot: GR127403-1) dilución 1:200 en PBS;
- 2) Anti-p-mTOR(ser2448), desarrollado en conejo (Abcam; número de catálogo: ab84400; Lot: GR306782-1) dilución 1:150 en PBS y Anti-LC3A desarrollado en ratón (Abcam; número de catálogo: ab168803; Lot: GR3187649-9) dilución 1:50 en PBS.

Ir a Anexo 1 para ver con más detalle los anticuerpos primarios.

Anticuerpos Secundarios:

Anti-conejo acoplado al fluorocromo verde AlexaFluor 488 (Invitrogen), dilución 1:200 en PBS, Anti-ratón acoplado al fluorocromo rojo AlexaFluor 594 (Invitrogen) dilución 1:200 en PBS.

Inmunodetecciones sencillas

Después de desparafinar los cortes con alcoholes graduales e hidratar con agua destilada, se sumergieron en PBS durante 10 minutos. Se realizó un proceso de recuperación antigénica con buffer de citratos a 0.1 M, pH 6.0 (BioGenex, Lot: HK0800918) en un horno de microondas marca Panasonic a 1300W durante 3 minutos en potencia 10 y 6 minutos en potencia 3, se dejaron enfriar 30 minutos y se lavaron tres veces con PBS durante 3 minutos. Se bloquearon con glicina 100 mM (Sigma, Lot: SLBM8966V) PBS (0.375 g/50 mL PBS) durante una hora a temperatura ambiente.

Se incubaron con el anticuerpo primario durante 24 hrs a 4°C. Se lavaron tres veces con PBS 3 minutos y luego se incubaron con el anticuerpo secundario durante dos horas, a temperatura ambiente y protegido de la luz. Una vez transcurrido el tiempo, se lavaron tres veces con PBS durante 3 minutos. Se incubaron con 100 µL de DAPI (4',6-diamidino2-fenilindol) (Sigma) durante un minuto. Se lavaron tres veces con PBS durante 3 minutos. Por último, se montaron las preparaciones utilizando 20 µL del medio de montaje para microscopía de fluorescencia VectaShield y se sellaron con barniz de uñas.

Inmunodetecciones dobles: p-mTOR (ser2448) y LAMP1

Después de desparafinar los cortes con alcoholes graduales e hidratar con agua destilada, se sumergieron en PBS durante 10 minutos. Se realizó un proceso de recuperación antigénica con buffer de citratos a 0.1 M, pH 6.0 (BioGenex, Lot: HK0800918) en un horno de microondas marca

Panasonic a 1300W durante 3 minutos en potencia 10 y 6 minutos en potencia 3, se dejaron enfriar 30 minutos y se lavaron tres veces con PBS durante 3 minutos. Se bloquearon con glicina 100 mM (Sigma, Lot: SLBM8966V) PBS (0.375 g/50 mL PBS) durante una hora a temperatura ambiente. Se incubaron con el anticuerpo primario Anti-p-mTOR(ser2448), desarrollado en conejo (Abcam; número de catálogo: ab84400; Lot: GR306782-1) dilución 1:200 en PBS durante 24 hrs a 4°C. Se lavaron tres veces con PBS 3 minutos. Posteriormente, se colocó una gota de Super-Sensitive Multilink (Biogenex) durante 20 minutos a temperatura ambiente con el fin de que realizar dobles inmunolocalizaciones con anticuerpos desarrollados en el mismo animal. Se lavaron 3 veces con PBS durante 3 minutos cada uno. Se incubó con el segundo anticuerpo primario Anti-LAMP1 desarrollado en conejo (Abcam; número de catálogo: ab24170; Lot: GR127403-1) dilución 1:50 en PBS durante 1 hr a temperatura ambiente. Luego, se lavaron 3 veces con PBS durante 3 minutos cada uno. Se incubaron en una solución que contenía 1 µL de Estreptavidina acoplada a rojo Texas (para localizar el anticuerpo el cual interacciona con la solución del Multilink) (SIGMA No. Cat S-7261) más 1 µL del anticuerpo secundario hecho en cabra contra conejo acoplado a Alexa 488 (Invitrogen) diluido en 200 µL de PBS durante dos hrs. a temperatura ambiente y protegido de la luz. Una vez transcurrido el tiempo, se lavaron tres veces con PBS durante 3 minutos. Se incubaron con 100 µL de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (Sigma) durante un minuto. Se lavaron tres veces con PBS durante 3 minutos. Por último, se montaron las preparaciones utilizando 20 µL del medio de montaje para microscopía de fluorescencia VectaShield y se sellaron con barniz de uñas.

Inmunodetecciones dobles: p-mTOR (ser2448) y LC3A

Después de desparafinar los cortes con alcoholes graduales e hidratar con agua destilada, se sumergieron en PBS durante 10 minutos. Se realizó un proceso de recuperación antigénica con buffer de citratos a 0.1 M, pH 6.0 (BioGenex, Lot: HK0800918) en un horno de microondas marca Panasonic a 1300W durante 3 minutos en potencia 10 y 6 minutos en potencia 3, se dejaron enfriar 30 minutos y se lavaron tres veces con PBS durante 3 minutos. Se bloquearon con glicina 100 mM (Sigma, Lot: SLBM8966V) PBS (0.375 g/50 mL PBS) durante una hora a temperatura ambiente. Se incubaron con una solución que contenía a los anticuerpos primarios: Anti-p-mTOR(ser2448), desarrollado en conejo (Abcam; número de catálogo: ab84400; Lot: GR306782-1) dilución 1:150 en PBS y Anti-LC3A desarrollado en ratón (Abcam; número de catálogo: ab168803; Lot: GR3187649-9) dilución 1:50 en PBS, durante 24 hrs a 4°C. Posteriormente, se lavaron tres veces con PBS durante 3 minutos y luego se incubaron con una solución de dos anticuerpos secundarios: Anti-conejo acoplado al fluorocromo verde AlexaFluor 488 (Invitrogen), dilución 1:200 en PBS y Anti-ratón acoplado al fluorocromo rojo AlexaFluor 594 (Invitrogen) dilución 1:200 en PBS durante dos horas, a temperatura ambiente y protegido de la luz. Una vez transcurrido el tiempo, se lavaron tres

veces con PBS durante 3 minutos. Se incubaron con 100 μ L de DAPI (4',6-diamidino2-fenilindol) (Sigma) durante un minuto. Se lavaron tres veces con PBS durante 3 minutos. Por último, se montaron las preparaciones utilizando 20 μ L del medio de montaje para microscopía de fluorescencia VectaShield y se sellaron con barniz de uñas.

ANÁLISIS DE INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA

Para discriminar entre el proceso autofágico basal y la actividad autofágica, se midió la intensidad de la fluorescencia de las inmunolocalizaciones de mTOR, p-mTOR (ser2448), LC3A, LAMP1, p62/SQSTM1.

Los ovocitos se categorizaron en 2 grupos diferentes de acuerdo a la morfología como la deformación del citoplasma de las células foliculares, el desprendimiento de las células granulosas con el ovocito, la pérdida de la forma esférica del ovocito y la presencia de vesículas claras: ovocitos con autofagia basal y ovocitos con autofagia excesiva. A las imágenes obtenidas se les cuantificó la intensidad de fluorescencia con el software *ImageJ/Fiji*. Se rodeó con una línea todo ovocito incluyendo el área nuclear y citoplasmática. Luego se midió la intensidad de fluorescencia y se tomó el promedio. Los datos se procesaron utilizando Microsoft Excel 2016.

OBSERVACIÓN DE LAS PREPARACIONES

La observación de las preparaciones se llevó a cabo con un microscopio de epifluorescencia Nikon modelo Eclipse E600 con cámara Digital DXM1200F. Las imágenes obtenidas fueron procesadas en un software Nikon ACT-1 e *ImageJ/Fiji*. Finalmente, la presentación de las imágenes se realizó con el software Adobe Photoshop CS6 y Microsoft PhotoDraw.

PARTE II ANÁLISIS “*IN VITRO*”

Cultivo primario de ovocitos de ovario de rata

Se realizaron cultivos celulares primarios diferentes derivados de distintos animales (8 ratas “Wistar”) por cada una de las edades (19 y 28 días de nacidas). Para ello, se extrajeron los ovarios de las ratas, posteriormente se sometieron a un proceso de disgregación con tripsina al 0.1 % en solución libre de calcio y magnesio durante 15 min a 37°C. Las células de ovario se incubaron a 37°C en una atmósfera que contenía 5% de CO₂ durante 24 h en placas de cultivo de 30 mm (Nunc), con DMEM + GlutaMAX (Gibco, Lot: 1773540), suplementado con albúmina al 0,1% (Sigma, Lot: SLBG8594V) y suero fetal bovino al 4% (Gibco, Lot: 26140-079). Las células se incubaron durante 24 h para permitir que las células de la granulosa se unieran al fondo de la placa. Los ovocitos se identificaron por su tamaño y forma esférica.

Análisis de *Western Blot*

Para evaluar la abundancia de las proteínas p-ERK1/2, p-AKT, mTOR, p-mTOR (ser2448), ATG14, BECN1, ATG4b, LC3A, LAMP1 y p62/SQSTM1, se realizó el análisis de la presencia de las proteínas del lisado y se visualizaron bandas que representan a las proteínas de interés (*Western blot*). Los cultivos de células ováricas se mantuvieron por 24 h, tras la cuales, se extrajeron los ovocitos por medio de pipeteo. Se realizaron tres lavados con PBS y se resuspendieron en buffer de lisis (200 µL de TNTE 0.5%; 2 µL de inhibidores de proteasas (EDTA-free) (Roche) y 2 µL de inhibidores de fosfatasa (Sigma)) durante 15 min en hielo. Luego se centrifugó a 14,000 RPM durante 5 minutos y se utilizó el sobrenadante.

El contenido de proteína total en los lisados se midió mediante el sistema QUIBIT (Invitrogen): se hirvieron 100 µg de proteínas totales durante 15 min, se cargaron por carril en un gel SDS-PAGE al 12% y se corrieron a 50 mA (200 V). Las proteínas se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Invitrolon, Invitrogen, Lot: 1351560) a 400 mA durante 2 h.

Una vez transferidas las proteínas a las membranas, éstas se incubaron 1 h a temperatura ambiente en un *buffer* de bloqueo (leche sin grasa al 5% en TBS-T). Luego se incubaron las membranas con anticuerpo primario (Anti-mTOR, desarrollado en conejo (Abcam; número de catálogo: ab32028; Lot: GR245538-16) dilución 1:2500; Anti-p-mTOR(ser2448), desarrollado en conejo (Abcam; número de catálogo: ab84400; Lot: GR306782-1) dilución 1:1000; Anti-AKT-Anti-MAPK desarrollado en conejo (Abcam; número de catálogo: ab151279; Lot: GR3231384) dilución 1:250; Anti-BECN1 desarrollado en ratón (Abcam; número de catálogo: ab114071; Lot: GR289434-1) dilución 1:1000; Anti-ATG14 desarrollado en conejo (Sigma Aldrich; número de catálogo: SAB3500814; Lot: 70431201) dilución 1:1000; Anti-ATG4B desarrollado en conejo (Sigma Aldrich; número de catálogo:

A2981; Lot: 089M4802V) dilución 1:1000; Anti-LC3A desarrollado en ratón (Abcam; número de catálogo: ab168803; Lot: GR3187649-9) dilución 1:1000; Anti-LAMP1 desarrollado en conejo (Abcam; número de catálogo: ab24170; Lot: GR127403-1) dilución 1:1000; Anti-p62/SQSTM1 desarrollado en conejo (Abcam; número de catálogo: ab155686; Lot: GR199733-33) dilución 1:1000; Anti-GADPH desarrollado en conejo (Merck Millipore; número de catálogo: ABS16; Lot: 2625354) dilución 1:10,000; todas fueron diluidas en *buffer* de bloqueo).

Durante la noche a 4°C. Las membranas se lavaron tres veces, durante 10 min cada uno, en Tris 0.05 M, NaCl 0.15 M, Tween 20 al 0.1%, pH 7,5 (TBS-T). Posteriormente, los anticuerpos primarios fueron detectados mediante la incubación con anticuerpos secundarios (Anticuerpo peroxidasa anti-ratón, (*Jackson ImmunoResearch*), dilución 1:10,000; Anticuerpo peroxidasa anti-conejo (*Jackson ImmunoResearch*), dilución 1:10,000), diluidos en *buffer* de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron tres veces durante 10 min cada una, en TBS-T. Finalmente, las membranas fueron incubadas con un sustrato quimioluminiscente de peroxidasa de rábano picante (HRP) (*Inmobilon Western*, Millipore, Lot: 1900901). La reacción de quimioluminiscencia fue detectada por medio de la exposición de placas fotográficas de alta sensibilidad (*Amersham hyperfilm ECL*).

Análisis densitométrico

Para el análisis de los resultados obtenidas de los *Western Blot*, se escanearon con el instrumento HP *scanjet* modelo 300. Posteriormente, se utilizó el software *Image J/FIJI* para obtener las unidades arbitrarias del área y de intensidad de cada una de las bandas. Las bandas se normalizaron respecto a la cantidad de GAPDH que se usó como proteína control de carga.

RESULTADOS

El primer paso que se realizó fue identificar a nivel de microscopía óptica a los folículos en atresia folicular. Las características morfológicas consideradas para definir la atresia folicular fueron: la pérdida de la forma esférica del folículo, la alteración de la forma de las células foliculares, desprendimiento de las células de la granulosa de la superficie del ovocito, la pérdida de la forma esférica del ovocito y la presencia de abundantes vesículas claras en el citoplasma.

Ovarios de rata de 1 día de edad:

En los ovarios de esta edad se pudo apreciar que aún se conservan grupos de ovocitos rodeados por células de la granulosa muy aplanadas, conformando *cistos*. Así mismo, se observaron folículos primordiales, en los que los ovocitos están rodeados por solo una capa de células de la granulosa con forma aplanada (Figura 17A).

Se logró distinguir que algunos ovocitos están siendo rodeados por células de la granulosa, indicando que el proceso de foliculogénesis continúa a esta edad (Figura 17A).

En estos organismos, se pudieron identificar varias células germinales con diversas alteraciones, algunos poseen características que podrían corresponder a la apoptosis debido a la fuerte compactación celular. Otros ovocitos presentaban restos de estructuras cromosómicas que pudieran corresponder a alguna etapa de la profase I de la meiosis I (Figuras 17B-D).

Otra característica morfológica que presentaron los ovocitos fue la presencia de vesículas claras en el citoplasma, indicando posibles autofagosomas (Figuras 17B-D).

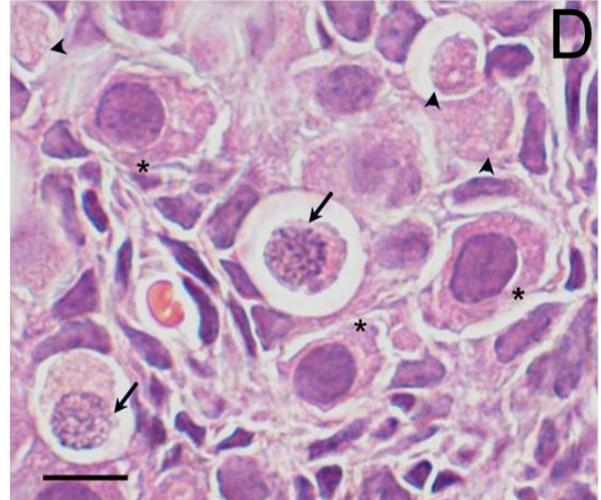
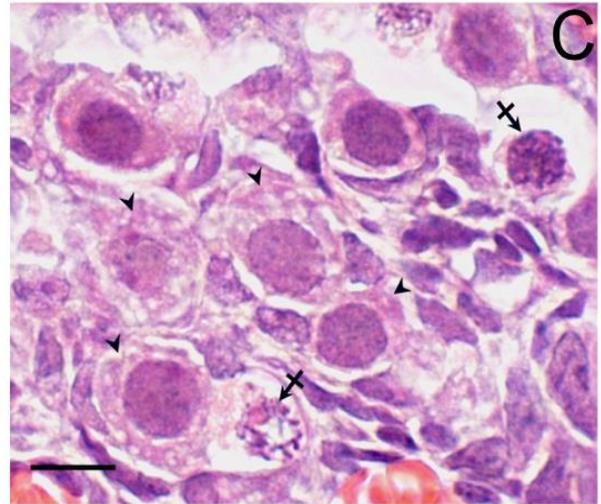
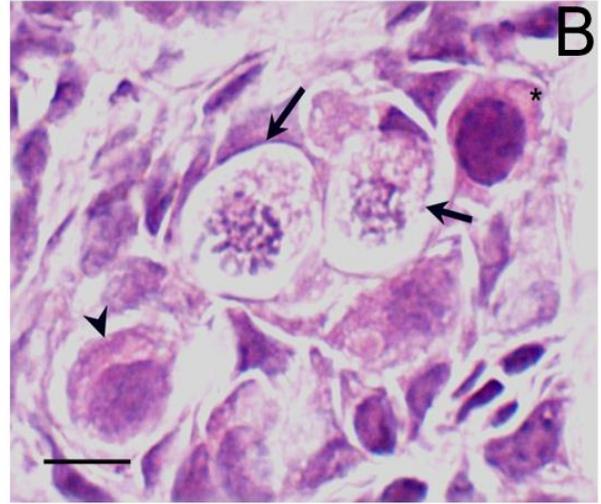


Figura 17. Ovario de 1 día de edad. (A) Corte histológico de ovario de rata de 1 día de nacida. Se observan grupos de ovocitos unidos por el citoplasma, rodeados por células de la pre-granulosa, formando cistos (sitio donde los ovocitos se diferenciaron y se dividieron por meiosis) (círculos con líneas punteadas en negro). También se observan folículos primordiales (círculos con líneas punteadas en azul). En B, C y D se observan aumentos que permiten apreciar ovocitos con diferentes alteraciones, como cúmulos de cromatina compacta en la periferia del núcleo (etapa dictiotónica de la profase meiótica I) (flecha). Compactación del ovocito indicando el inicio de la muerte celular (asterisco). Otras alteraciones observadas son las vesículas claras abundantes en el citoplasma (punta de flecha) y en la etapa final de muerte celular el citoplasma se desintegra totalmente (flecha cruzada). Barra de escala (A): 200 μ m. Barra de escala (B-D): 10 μ m. Tinción Hematoxilina-Eosina.

Ovarios de rata de 5 días de edad:

A esta edad, fue posible observar folículos primordiales, primarios y secundarios.

Los folículos primarios se identificaron por la presencia de un ovocito rodeado por una sola capa de células de la granulosa, que van cambiando su forma aplanada a una forma cúbica. Los folículos secundarios se distinguieron debido a que poseen más de dos capas de células de la granulosa que rodean al ovocito; se aprecia la región correspondiente a la zona pelúcida alrededor de ovocito (Figura 18A). En los folículos secundarios, se encuentra presente otro tipo celular rodeando a las células de la granulosa, éste son las células de la teca.

En estos ovarios se identificaron fácilmente los folículos en proceso de atresia, los cuales han perdido la forma redondeada y presentan una clara separación entre las células foliculares. Los ovocitos mostraron abundantes vesículas claras en el citoplasma y núcleos que no se encuentran compactados (Figuras 18B-D).

Ovarios de rata de 19 días de edad:

A la edad de 19 días, los ovarios a nivel morfológico son significativamente diferentes a los de 1 y 5 días, ya que se lograron observar folículos en diversas fases de desarrollo, que incluye folículos primordiales, primarios, secundarios y pre-antrales (antro en formación). Los folículos pre-antrales o con antro en formación, a diferencia de los primordiales, primarios y secundarios, se caracterizan por la presencia de una cavidad entre las células de la granulosa de la región mural y las granulosa que rodean al ovocito (*corona radiata*). Se conoce que esa cavidad, denominada como antro o cavidad antral, se encuentra llena de líquido que contiene factores de crecimiento, hormonas, entre otras sustancias (Figura 19A).

Los folículos sanos se identificaron por poseer una forma regular, en donde el ovocito mantiene una relación estrecha con las células de la granulosa (Figura 19B). Así mismo, las células de la granulosa están unidas entre sí. En los folículos secundarios y pre-antrales, se observaron las células de la teca, que se encuentran constituyendo las capas externas del folículo. Por otro lado, los folículos en atresia se identificaron por poseer una estructura con forma irregular, los ovocitos han perdido su forma redondeada y las células de la granulosa se encuentran desprendidas del ovocito. Algunas de las alteraciones observadas en los ovocitos atrésicos incluyen el encogimiento celular, la pérdida de forma circular, algunos presentan muchas vesículas claras, incluso puede haber nucléolos alterados (Figuras 19C y D).

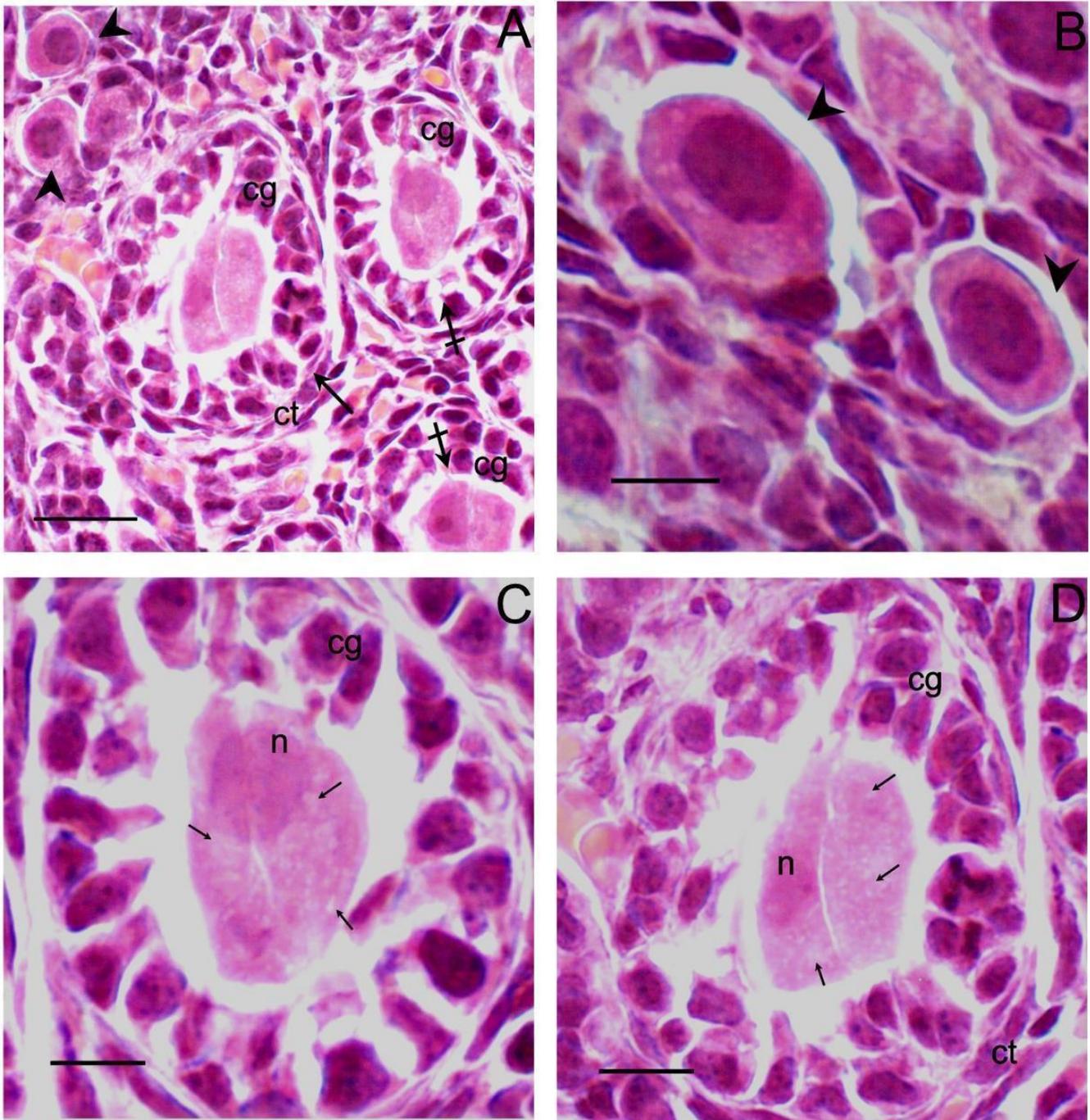


Figura 18. Ovario de 5 días de edad. (A) Corte histológico de ovario de rata de 5 días. Se observan folículos primordiales (punta de flecha); folículos primarios (flecha cruzada) cada uno con un ovocito rodeado por una capa de células granulosas (cg) y folículo secundario (flecha) el cual presenta una célula germinal rodeada por dos capas de células granulosas y éstas a su vez están rodeadas por células de la teca (ct). En B se muestran folículos primordiales cuyas células de la granulosa empiezan a cambiar de forma aplanada a cúbica. Los ovocitos ya se han separado de las células somáticas (puntas de flecha), indicando inicios de atresia folicular. En C y D se presentan folículos atrésicos, cuyos ovocitos han perdido su forma redondeada y se han separado de las células de la granulosa, contienen abundantes vesículas claras (flechas) en el citoplasma. Los núcleos (n) no son compactos. Barra de escala: A:20 μ m; B-D: 10 μ m. Tinción Hematoxilina-Eosina.

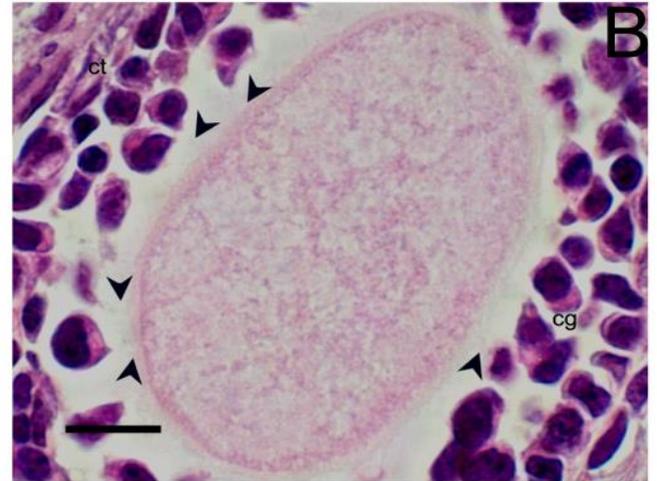
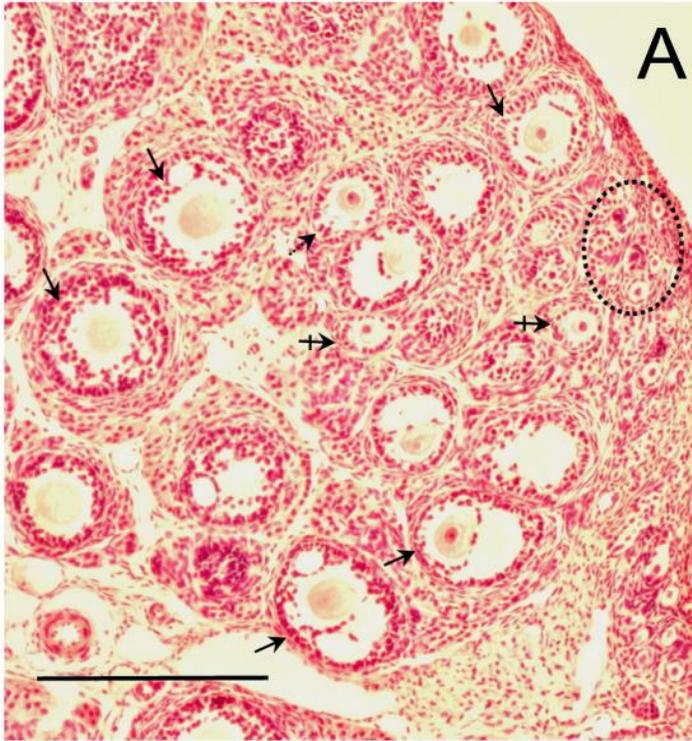


Figura 19. Ovario de 19 días de edad. (A) Corte histológico de ovario de rata de 19 días. Se observan folículos primordiales (rodeados con un círculo de líneas negras punteadas), folículos primarios (flecha cruzada), folículos secundarios (flecha con líneas punteadas) y folículos pre-antrales (flechas). En B se visualiza un folículo secundario con forma irregular en donde el ovocito tiene una unión muy delgada con las células de la granulosa (punta de flecha). En C, D se muestran folículos pre-antrales atrésicos en los que las células de la granulosa poseen separaciones entre sí; la célula germinal tiene forma irregular, contiene muchas vesículas claras (flechas) y un nucléolo alterado (asterisco). Tinción hematoxilina-eosina. Barra de escala: A:200 μ m; B-D:10 μ m.

Ovarios de rata de 28 días de edad:

En los ovarios de esta edad se identificaron folículos en las diversas fases de crecimiento folicular, incluyendo la fase folicular más avanzada que es la etapa pre-ovulatoria, que se distingue por la presencia de un ovocito rodeado por células de la granulosa constituyendo la *corona radiata*, también presentan una gran cavidad antral (Figura 20). Nunca se observó la presencia del cuerpo lúteo lo que indica que la ovulación aún no se ha llevado a cabo.

Se observaron folículos de diversas fases de crecimiento folicular siendo eliminados por el proceso de atresia. Se logró identificar al menos dos tipos de morfologías alteradas en los ovocitos de folículos atrésicos: algunos se han contraído y fragmentado, mientras que otros, presentaron grandes regiones con vesículas claras en el citoplasma (Figuras 20 A y B).

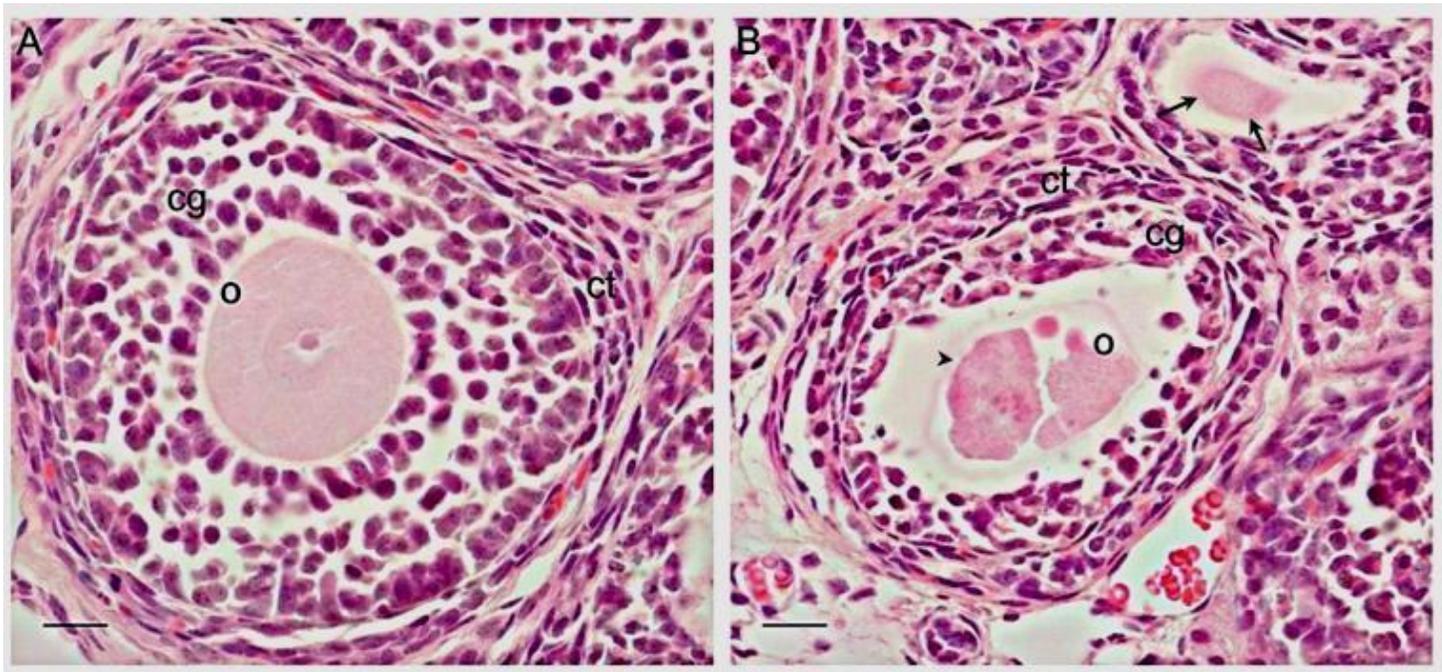


Figura 20. Ovario de 28 días de edad.

En A se muestra un folículo sano, un ovocito (o) con forma regular, rodeado por las células de la granulosa (cg) y células tecales (ct) que constituyen las capas externas del folículo. En B se observan dos folículos atrésicos, en uno de ellos el ovocito se encuentra contraído y fragmentado (punta de flecha) y el otro presenta regiones con vesículas claras en el citoplasma (flechas). En C, un folículo pre-ovulatorio el que se aprecia la *corona radiata* (cr), la célula germinal con forma irregular, evidenciando a un folículo en atresia inicial. Tinción hematoxilina-eosina. Barra de escala: 10 μ m.



Inmunolocalización de proteínas

Para el estudio inmunofluorescente primero se examinó la presencia y abundancia de las proteínas mTOR y p-mTOR (fosforilada en la ser2448), tanto en ovocitos sanos como en los alterados. Se centró en la ser2448 ya que la fosforilación en este sitio está promoviendo la actividad de mTORC1 y la inhibición del proceso autofágico.

Se observó una marca débil de la detección de mTOR en los ovocitos alterados de ovarios de 5 y 28 días (Figuras 21-22). Sin embargo, en los ovocitos alterados de 1 y 19 días (Figuras 21-22) la marca para esta proteína aumentó ligeramente con respecto a los ovocitos normales.

Con respecto a la presencia de p-mTOR, se observó una débil marca en las células germinales de todas las edades estudiadas (Figuras 23-24). Tanto mTOR total como p-mTOR se situaron en el citoplasma y en el núcleo se encontró de manera puntiforme. Con esto demostramos que mTOR se encuentra presente tanto en el citoplasma como el núcleo, y que su abundancia varía entre las edades estudiadas; así como la disminución de su actividad, pero esta disminución no es completa.

Para definir la formación de las vesículas autofágicas, se examinó la presencia de la proteína LC3A. En los ovocitos que no poseen características morfológicas alteradas, la marca de LC3A se encontró en niveles bajos con respecto a la marca observada en aquellos ovocitos con vesículas claras observables con la iluminación de contraste de fases. La marca se distribuyó en núcleo y el citoplasma de forma aparentemente uniforme entre los dos compartimentos celulares (Figura. 25). Sin embargo, en los ovocitos con alteraciones citoplasmáticas, LC3A se observó de forma punteada y se excluyó en gran medida del núcleo y su proporción incrementó en el citoplasma (Figura 26). Quizás, en los ovocitos que presentan una muerte celular más avanzada, LC3A nuclear se exporta al citoplasma en donde ejercen su función en el proceso autofágico de manera eficiente.

La inmunolocalización de LAMP1 en los ovocitos de folículos no atrésicos, permitió distinguir que esta proteína se distribuye como puntos dispersos en el citoplasma y especialmente en la periferia celular (Figura 27). En los ovocitos de folículos atrésicos la marca correspondiente a la presencia de LAMP1, se conformó en grandes grumos, lo que indicó un incremento de lisosomas-autofagolisosomas y por lo tanto un mayor avance en el proceso autofágico (Figura 28). Adicionalmente, la marca coincidió con las vesículas claras observadas en las imágenes de contraste de fases. Las células de la granulosa que rodean a los ovocitos alterados tienen menor cantidad de estas proteínas que los ovocitos.

Por lo tanto, el proceso autofágico en los folículos atrésico inician primero en el citoplasma de los ovocitos y luego puede desencadenarse en las células de la granulosa.

La proteína p62/SQSTM1 es un adaptador para identificar y entregar organelos específicos y agregados de proteínas a los autofagosomas para su degradación, por lo que demuestra un proceso de degradación selectiva. La detección de p62/SQSTM1 en los ovocitos de ovarios de las diferentes edades estudiadas, permitió definir que se encuentra en menor cantidad en ovocitos alterados que en los sanos (Figuras 29-30). Lo que nos sugiere que p62/SQSTM1 es un buen marcador del flujo autofágico ya que se evidenció su disminución asociada a la degradación en condiciones de muerte celular.

Para distinguir entre los ovocitos con marcado basal y los que presentaron una marca incrementada de las diferentes proteínas identificadas, se realizó una cuantificación de cada una de ellas en todos los ovocitos, incluyendo ovocitos no alterados y alterados. En la Figura 31 se muestran las gráficas con los niveles de fluorescencia en ovocitos normales y alterados de ovarios de ratas de 1, 5, 19 y 28 días edad. Se cuantificaron 40 ovocitos con autofagia basal de folículos normales y 40 ovocitos con autofagia excesiva de folículos atrésicos.

Los datos cuantitativos muestran las diferencias en la cantidad de mTOR presente en las diferentes edades. En 1 y 19 días se muestra mayor abundancia en mTOR total en ovocitos alterados que en los sanos, mientras que a los 5 y 28 días esto no ocurre. Por otro lado, a los 5 días se encuentra en mayor cantidad tanto mTOR como p-mTOR que en las demás edades examinadas.

Adicionalmente, se identifica que la disminución de la fosforilación de mTOR precede o coincide con un aumento de LC3A, LAMP1, y una disminución de p62/SQSTM1 en los ovocitos alterados de ovario de las edades analizadas. Estos hallazgos indican un flujo autofágico avanzado, una lectura funcional de la autofagia.

Autofagia Basal

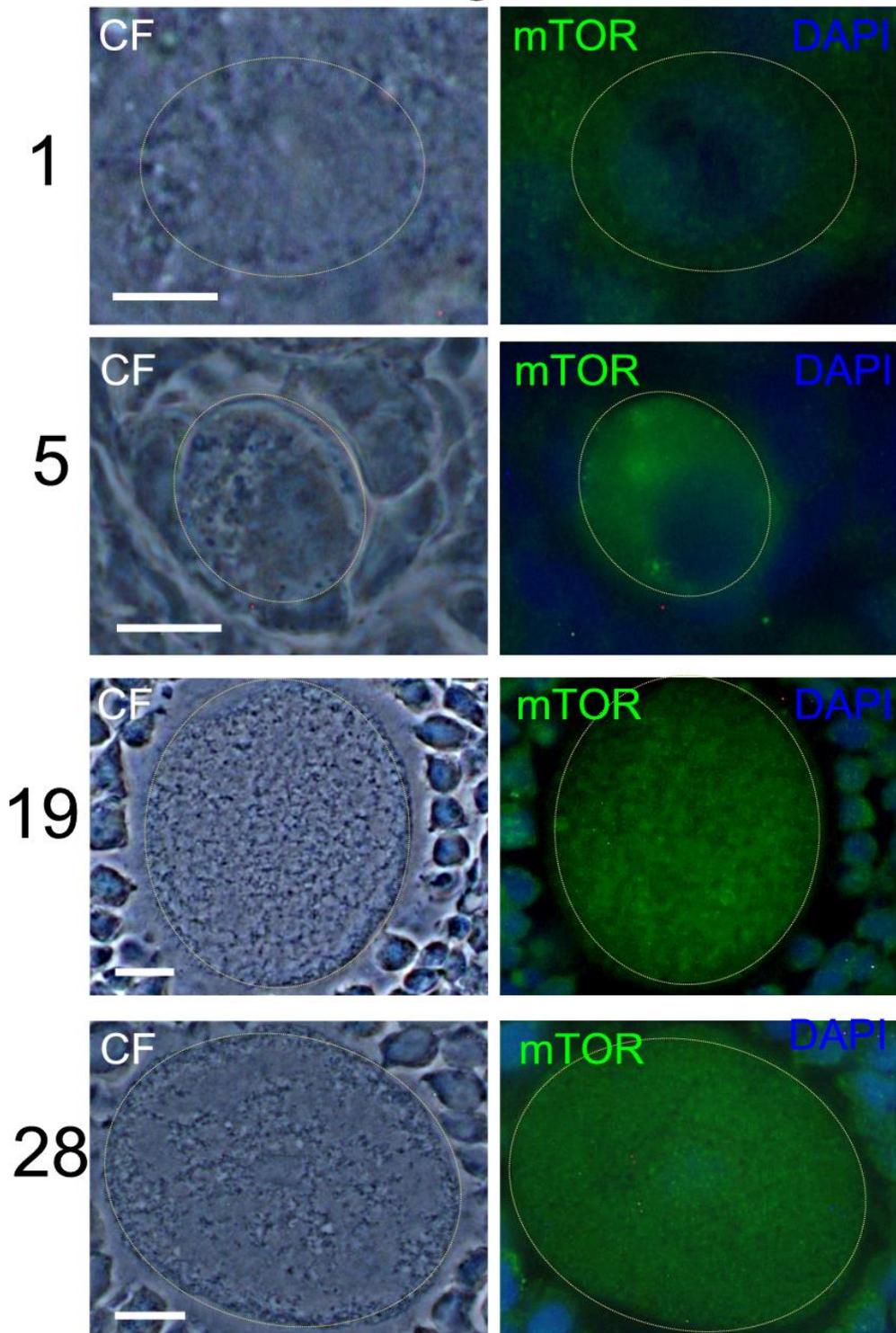


Figura 21. Inmunodetección de mTOR en ovocitos con autofagia basal en ovarios de rata de 1, 5, 19 y 28 días de edad. Se observan ovocitos normales (líneas punteadas) con autofagia basal de un folículo primordial, un folículo primario, un folículo secundario, un folículo pre-antral de ovario de 1, 5, 19 y 28 días, respectivamente. Se detectó mTOR tanto en el citoplasma como en el núcleo de forma puntiforme. El núcleo (DAPI) no se encuentra compactado. CF: imágenes en contraste de fase. Barra de escala: 10 μ m.

Autofagia Excesiva

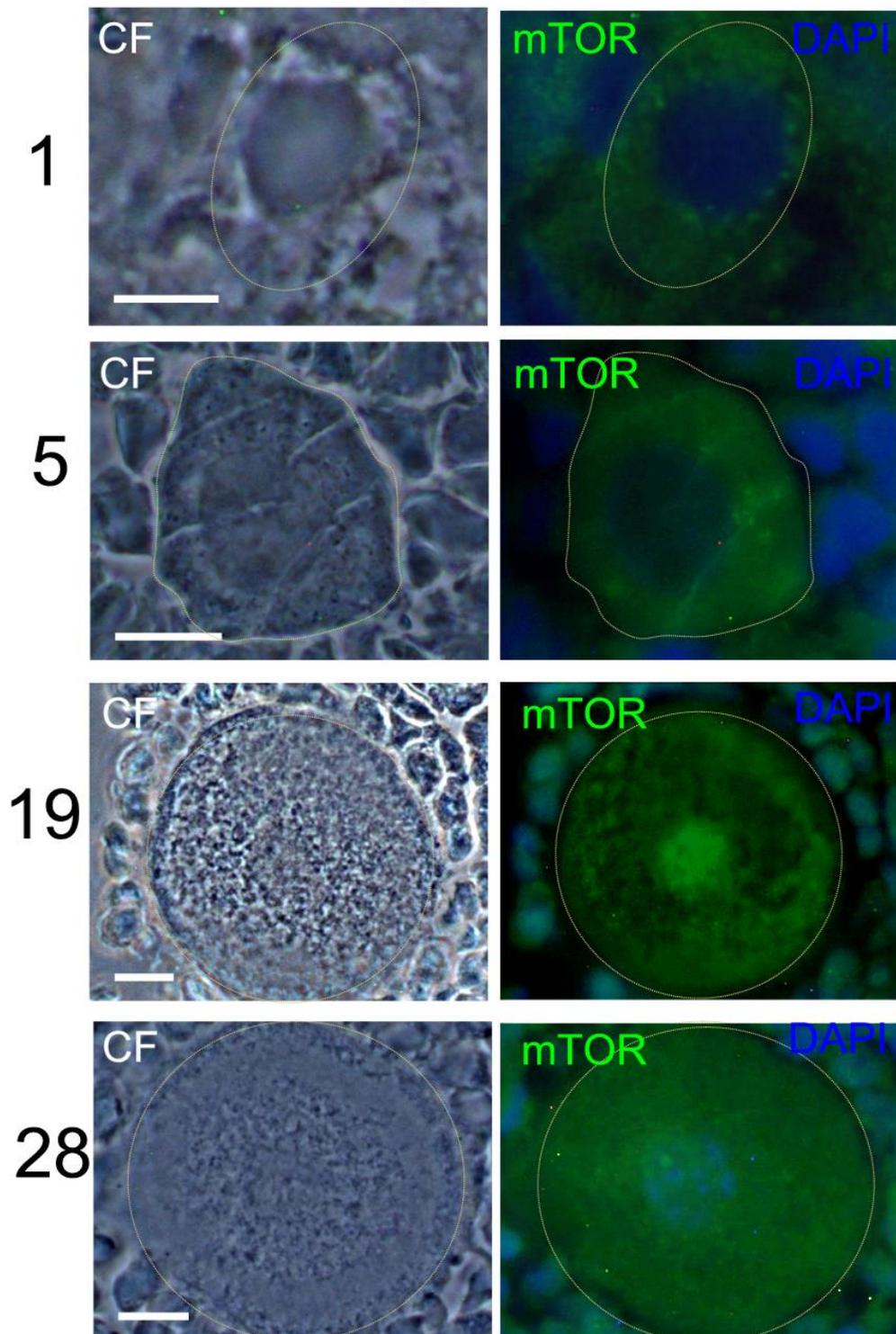


Figura 22. Inmunodetección de mTOR en ovocitos con autofagia excesiva en ovarios de rata de 1, 5, 19 y 28 días de edad. Se observan ovocitos que poseen morfología inadecuada (líneas punteadas) con autofagia excesiva de un folículo primordial y un folículo secundario en ovario de 1 y 5 días, respectivamente y un folículo pre-antral en ovario de 19 y 28 días. Se detectó mTOR tanto en el citoplasma como en el núcleo de forma puntiforme. El núcleo (DAPI) no se encuentra compactado. CF: imágenes en contraste de fase. Barra de escala: 10 μ m.

Autofagia Basal

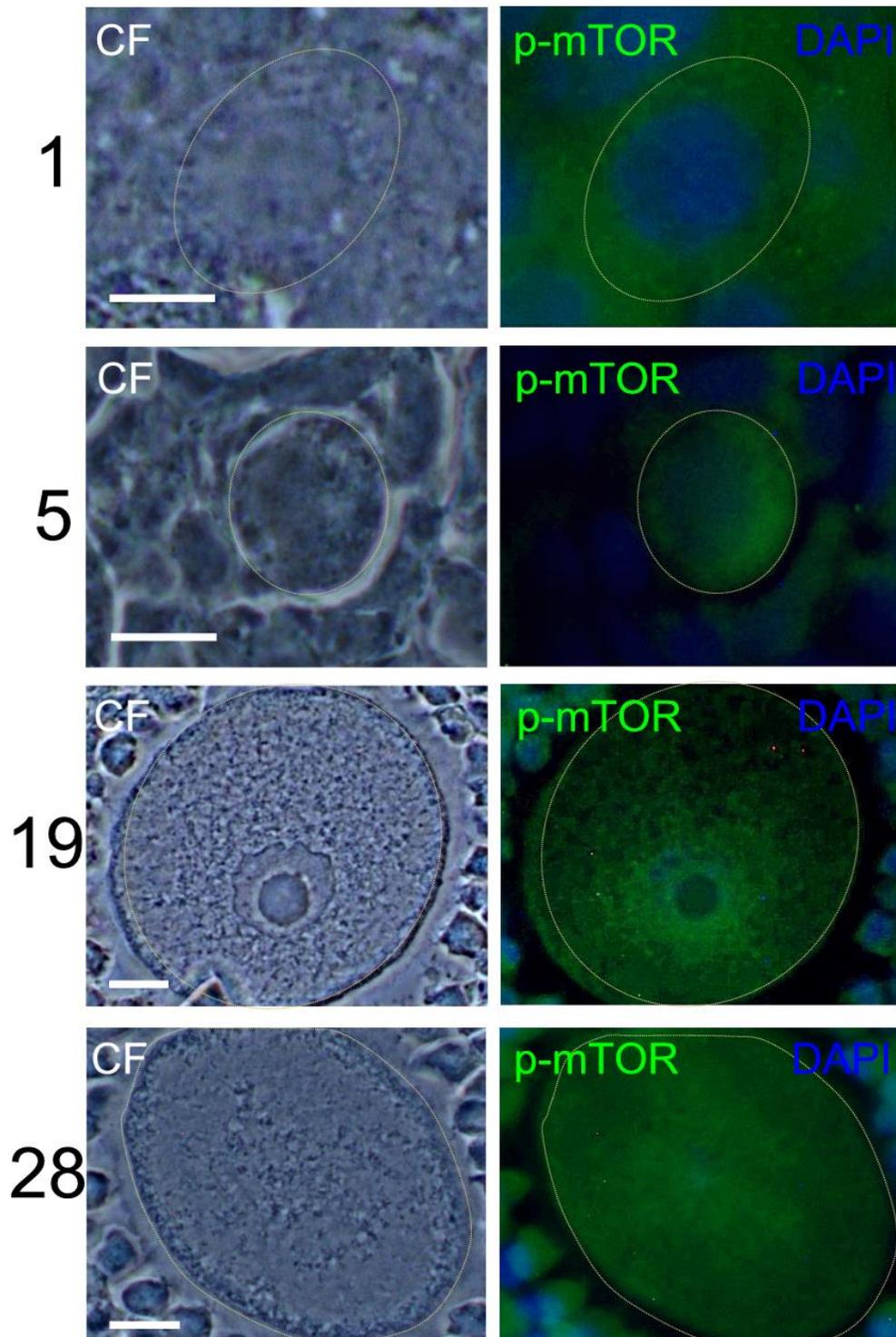


Figura 23. Inmunodetección de p-mTOR en ovocitos con autofagia basal en ovarios de rata de 1, 5, 19 y 28 días de edad. Se observan ovocitos normales (líneas punteadas) con autofagia basal de un folículo primordial, un folículo primario, un folículo secundario, un folículo pre-antral de ovario de 1, 5, 19 y 28 días, respectivamente. Se detectó p-mTOR tanto en el citoplasma como en el núcleo de forma puntiforme. El núcleo (DAPI) no se encuentra compactado. CF: imágenes en contraste de fase. Barra de escala: 10 μ m.

Autofagia Excesiva

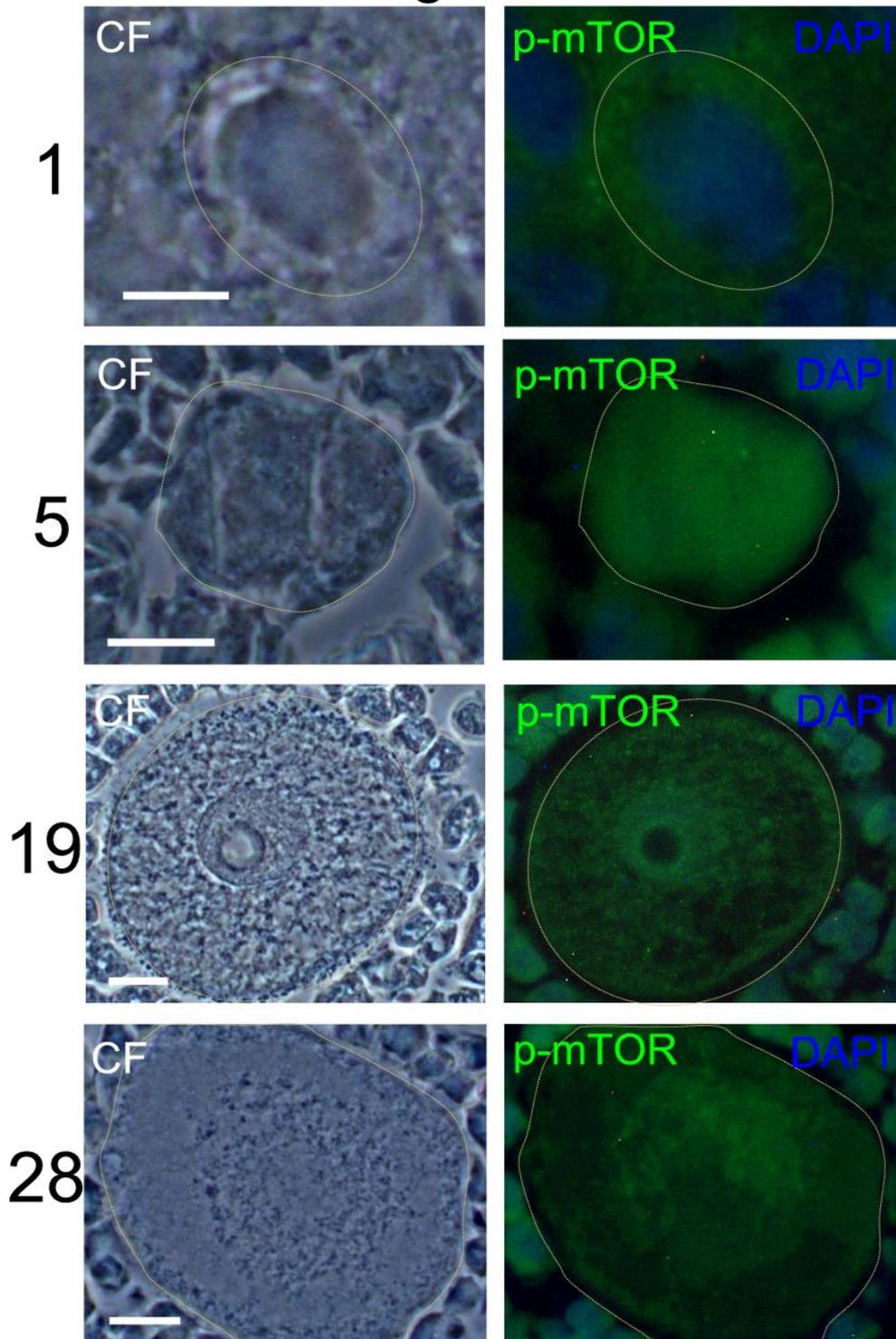


Figura 24. Inmunodetección de p-mTOR en ovocitos con autofagia excesiva en ovarios de rata de 1, 5, 19 y 28 días de edad. Se observan ovocitos que poseen morfología inadecuada (líneas punteadas) con autofagia excesiva de un folículo primordial y un folículo secundario en ovario de 1 y 5 días, respectivamente y un folículo pre-antral en ovario de 19 y 28 días. Se detectó p-mTOR tanto en el citoplasma como en el núcleo de forma puntiforme. El núcleo (DAPI) no se encuentra compactado. CF: imágenes en contraste de fase. Barra de escala: 10 μ m.

Autofagia Basal

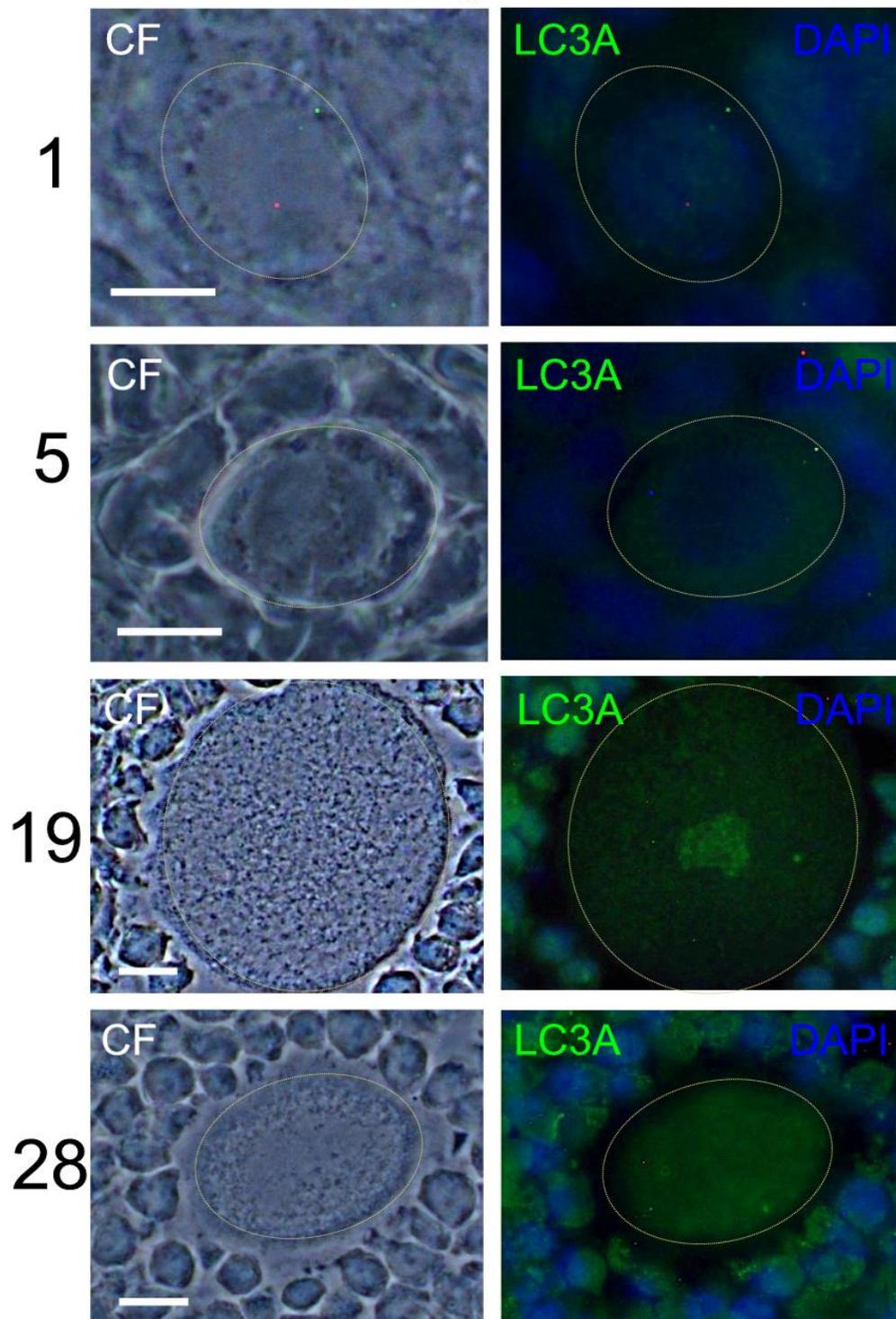


Figura 25. Inmunodetección de LC3A en ovocitos con autofagia basal en ovarios de rata de 1, 5, 19 y 28 días de edad. Se observan ovocitos normales (líneas punteadas) con autofagia basal de un folículo primordial, un folículo primario, un folículo secundario, un folículo pre-antral de ovario de 1, 5, 19 y 28 días, respectivamente. LC3A se distribuyó en el área citoplasmática y nuclear de forma aparentemente uniforme. El núcleo (DAPI) no se encuentra compactado. CF: imágenes en contraste de fase. Barra de escala: 10 μ m.

Autofagia Excesiva

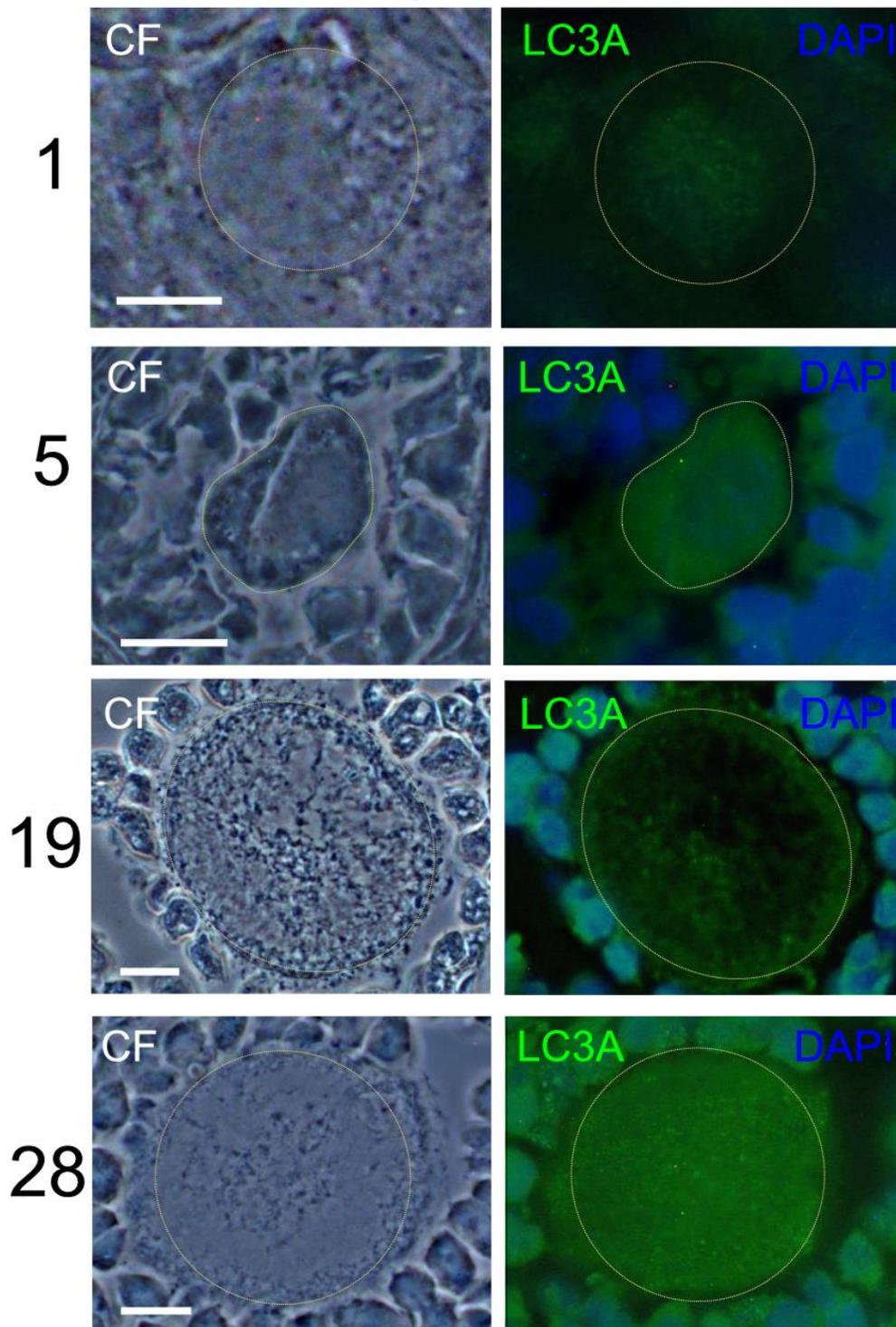


Figura 26. Inmunodetección de LC3A en ovocitos con autofagia excesiva en ovarios de rata de 1, 5, 19 y 28 días de edad. Se observan ovocitos que poseen morfología inadecuada (líneas punteadas) con autofagia excesiva de un folículo primordial y un folículo secundario en ovario de 1 y 5 días, respectivamente y un folículo pre-antral en ovario de 19 y 28 días. LC3A se observó de forma punteada preferentemente en el citoplasma que en el núcleo. El núcleo (DAPI) no se encuentra compactado. CF: imágenes en contraste de fase. Barra de escala: 10 μ m.

Autofagia Basal

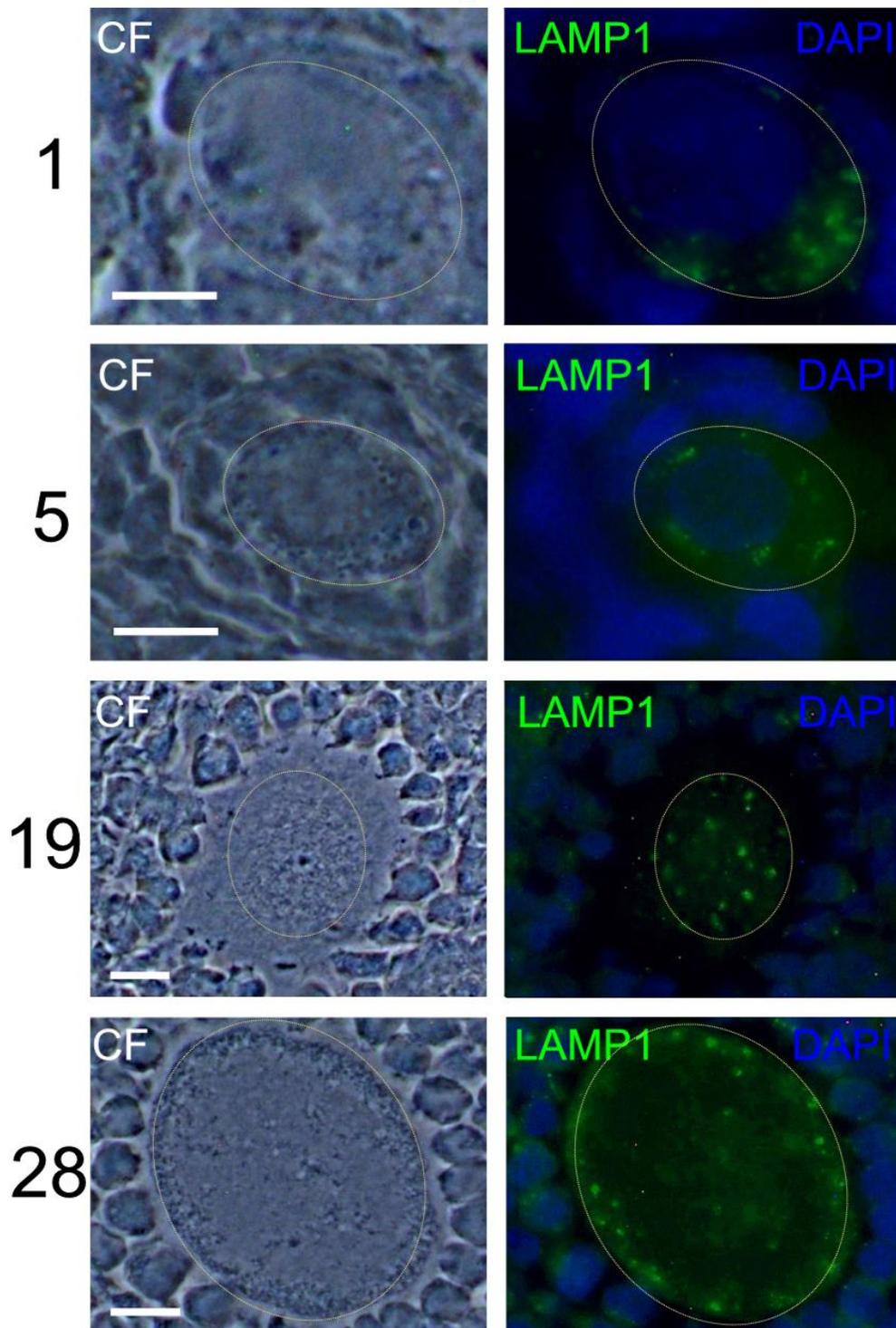


Figura 27. Inmunodetección de LAMP1 en ovocitos con autofagia basal en ovarios de rata de 1, 5, 19 y 28 días de edad. Se observan ovocitos normales (líneas punteadas) con autofagia basal de un folículo primordial, un folículo primario, un folículo secundario, un folículo pre-antral de ovario de 1, 5, 19 y 28 días, respectivamente. LAMP1 se distribuye como puntos discretos en el citoplasma y especialmente en la periferia celular. El núcleo (DAPI) no se encuentra compactado. CF: imágenes en contraste de fase. Barra de escala: 10 μ m.

Autofagia Excesiva

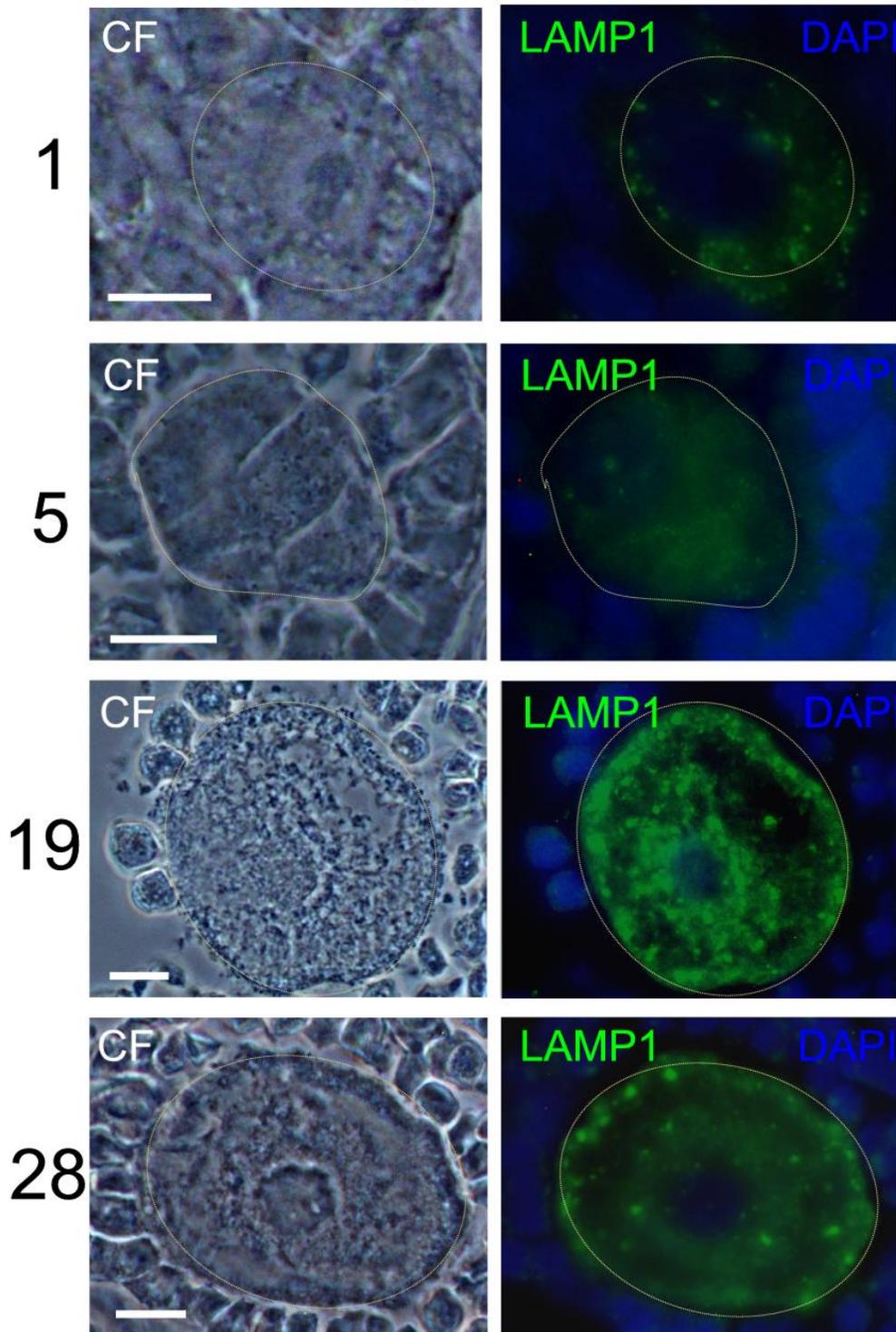


Figura 28. Inmunodetección de LAMP1 en ovocitos con autofagia excesiva en ovarios de rata de 1, 5, 19 y 28 días de edad. Se observan ovocitos que poseen morfología inadecuada (líneas punteadas) con autofagia excesiva de un folículo primordial y un folículo secundario en ovario de 1 y 5 días, respectivamente y un folículo pre-antral en ovario de 19 y 28 días. LAMP1 se encontró en grumos en el citoplasma de los ovocitos con grandes vesículas autofágicas. El núcleo (DAPI) no se encuentra compactado. CF: imágenes en contraste de fase. Barra de escala: 10 μ m.

Autofagia Basal

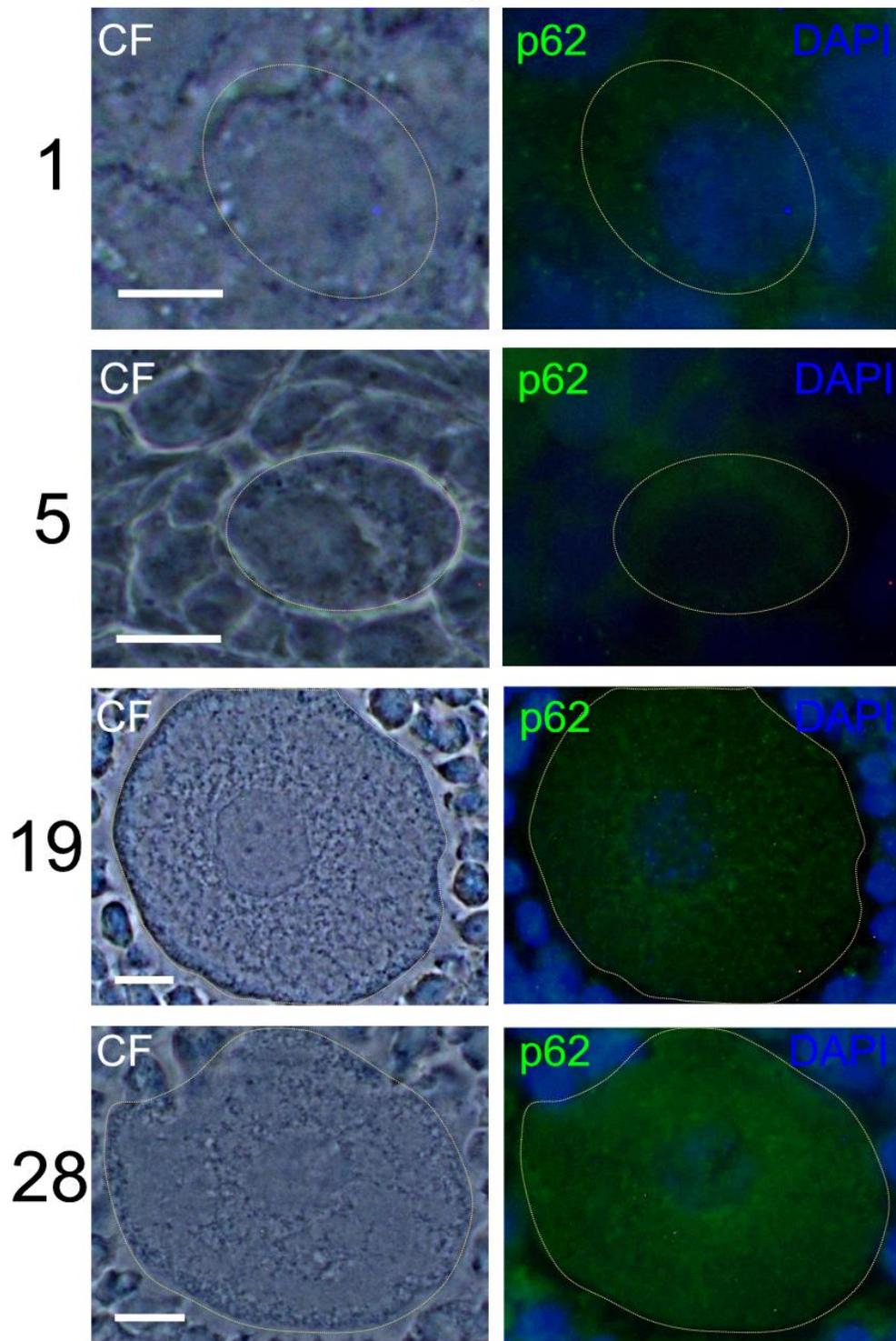


Figura 29. Inmunodetección de p62/SQSTM1 en ovocitos con autofagia basal en ovarios de rata de 1, 5, 19 y 28 días de edad. Se observan ovocitos normales (líneas punteadas) con autofagia basal de un folículo primordial, un folículo primario, un folículo secundario, un folículo pre-antral de ovario de 1, 5, 19 y 28 días, respectivamente. p62/SQSTM1 se localizó principalmente en el citoplasma como puntos. El núcleo (DAPI) no se encuentra compactado. CF: imágenes en contraste de fase. Barra de escala: 10 μ m.

Autofagia Excesiva

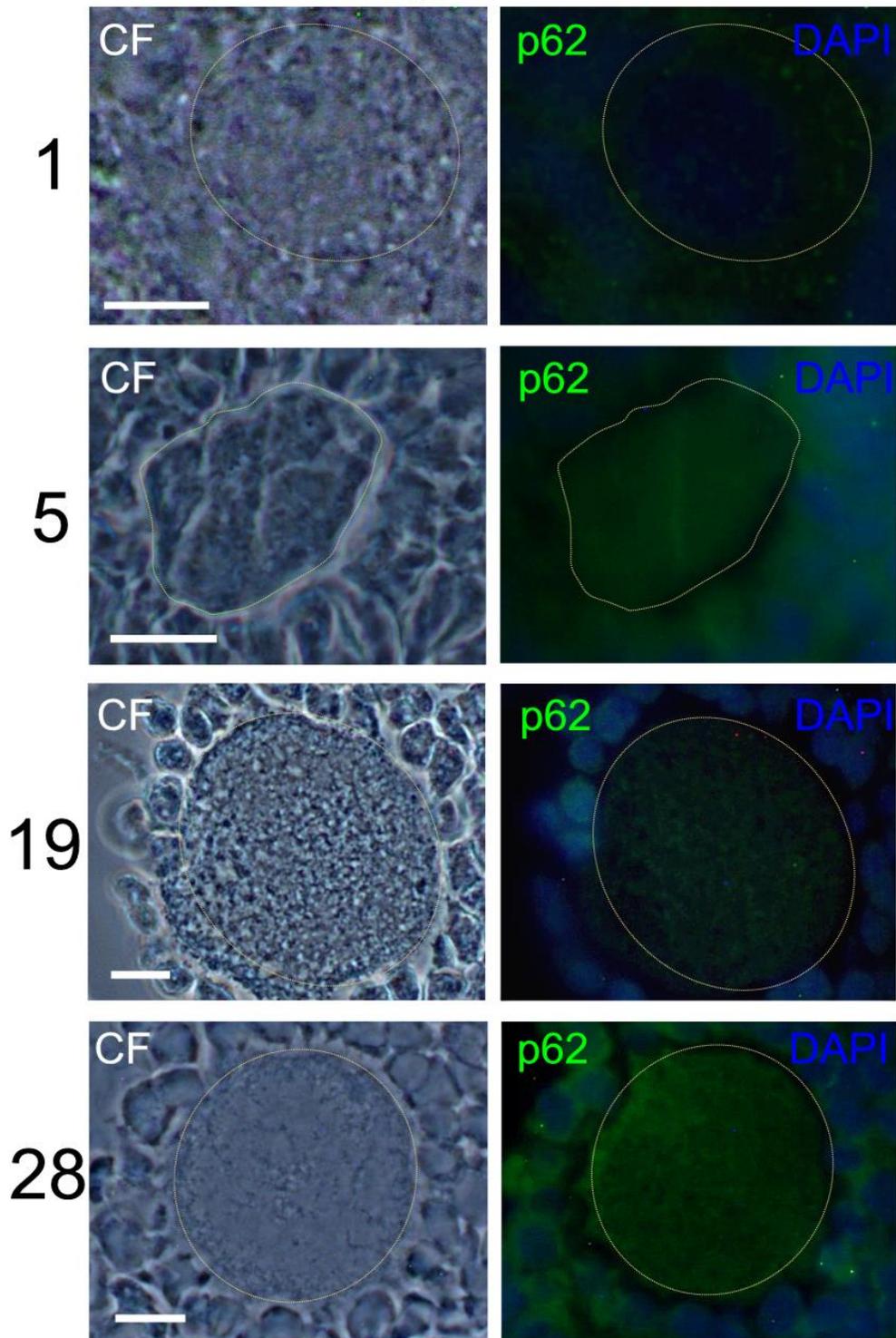


Figura 30. Inmunodetección de p62/SQSTM1 en ovocitos con autofagia excesiva en ovarios de rata de 1, 5, 19 y 28 días de edad. Se observan ovocitos que poseen morfología inadecuada (líneas punteadas) con autofagia excesiva de un folículo primordial y un folículo secundario en ovario de 1 y 5 días, respectivamente y un folículo pre-antral en ovario de 19 y 28 días. p62/SQSTM1 se localizó principalmente en el citoplasma como puntos difusos. El núcleo (DAPI) no se encuentra compactado. CF: imágenes en contraste de fase. Barra de escala: 10 μ m.

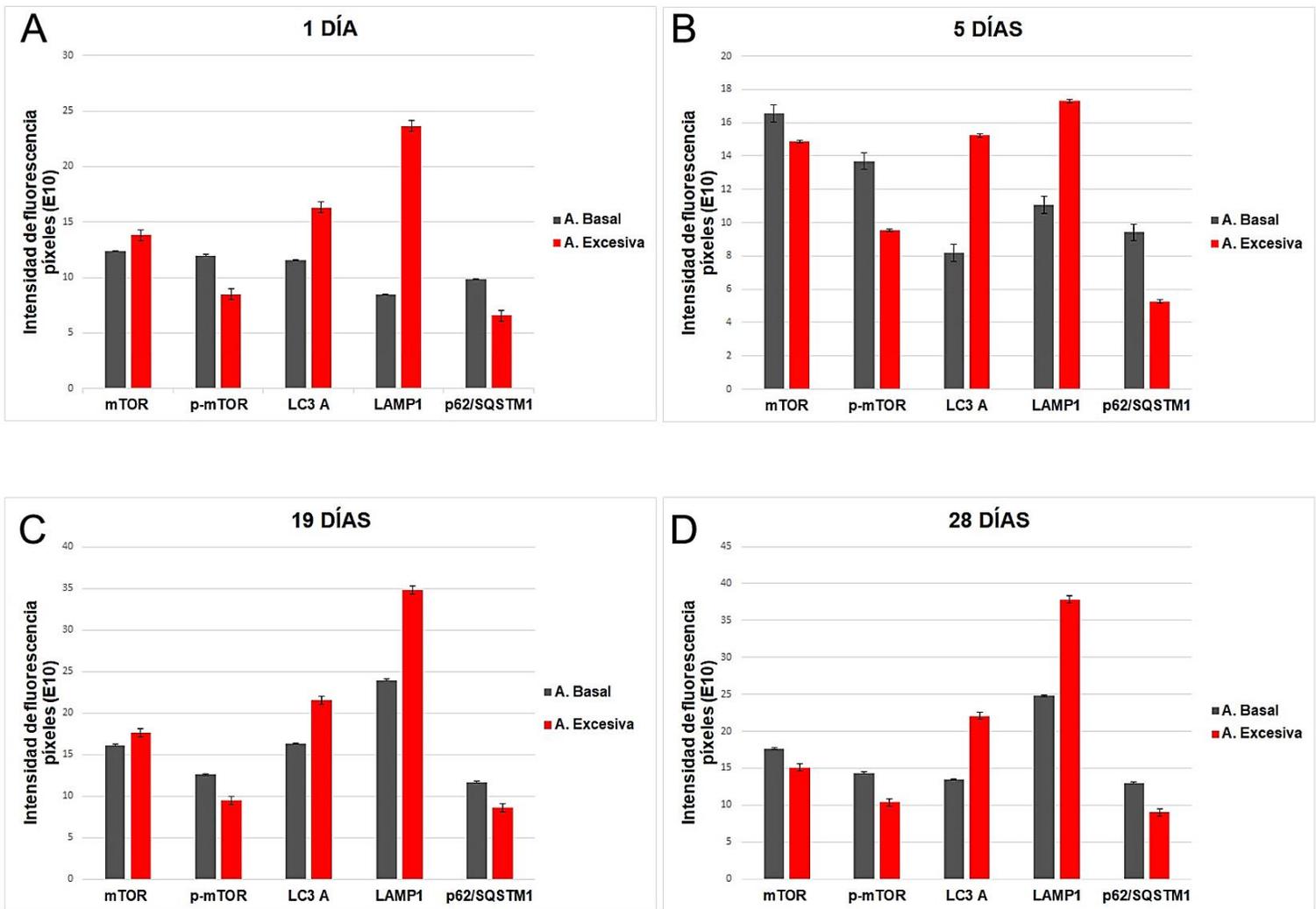


Figura 31. Representación gráfica de los niveles de intensidad de fluorescencia en ovocitos con autofagia basal y con autofagia excesiva de ovarios de ratas de 1, 5, 19 y 28 días edad. Las células germinales con autofagia basal (gris), y autofagia excesiva (rojo). En los ovocitos de 1 y 19 días edad observamos que hay un aumento de la abundancia de mTOR en los que se encuentran alterados pero su actividad mediada por p-mTOR está disminuida; en los ovocitos autofágicos de 5 y 28 días de edad tanto mTOR total como p-mTOR están reducidos con respecto a los sanos. Por otro lado, en todas las edades de este estudio tanto el marcador de autofagia LC3A como el marcador de lisosomas-autofagolisosomas LAMP1 están aumentados en condiciones de alteración morfológica y así mismo el indicador de flujo autofágico p62/SQSTM1 está reducido. Las barras representan la media \pm error estándar (n=40 células con autofagia basal y 40 células con autofagia excesiva). Datos analizados con el Test de Wilcoxon y el nivel de significancia se fijó en $p < 0,05$, para comparar ambos grupos.

Se realizaron dobles inmunolocalizaciones de p-mTOR S2448 con LAMP1 y de p-mTOR S2448 con LC3A, para interpretar la dinámica entre la actividad de p-mTOR y el marcador de autofagolisosomas LAMP1, así como para evaluar el comportamiento de p-mTOR con el marcador de autofagosomas LC3A y si éste coincide con una posible degradación de p-mTOR.

Observamos una marca muy tenue de p-mTOR en los ovocitos en proceso de muerte celular, por el contrario, la presencia de las proteínas LAMP1 y LC3A es muy abundante. Esto fue evidente en los ovocitos de todas las edades estudiadas (Figuras 32-35; A, B). Encontramos regiones de colocalización entre p-mTOR y LAMP1 (Figuras 32-35; A). Esto estaría indicando que mTORC1 se activa en la superficie lisosomal por los aminoácidos sin importar que está sucediendo la muerte celular con autofagia. Con respecto a LC3A, no encontramos colocalización con p-mTOR por lo que no está ocurriendo una degradación de p-mTOR en los autofagosomas.

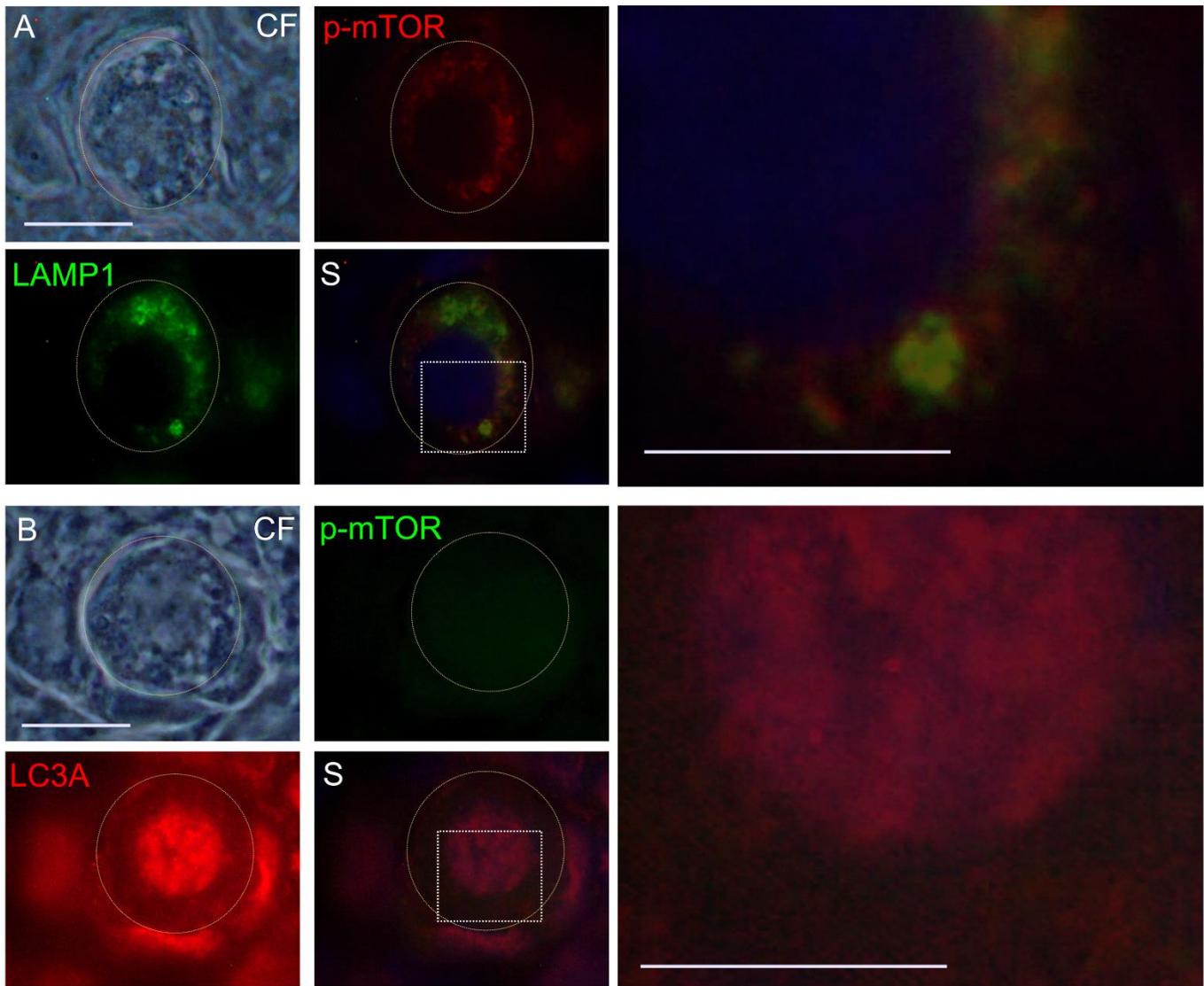


Figura 32. Dobles inmunolocalizaciones de LAMP1/p-mTOR y LC3A/p-mTOR en ovario de rata de 1 día de edad. En A y B se ve observa un ovocito de folículo primordial atrésico. En A se inmunodetectó a LAMP1 en verde y p-mTOR en rojo. En un aumento (a la derecha) de la superposición se ve la colocalización de ambas proteínas. En B se muestran marca positiva para LC3A en rojo y en menor cantidad a p-mTOR en verde. En la superposición se muestra mayor presencia de LC3A. CF: contraste de fase. S: superposición de proteínas localizadas más DAPI en azul. Las líneas punteadas evidencian al ovocito de un folículo primordial. Barra de escala: 10 μm ; 5 μm (aumentos de imágenes).

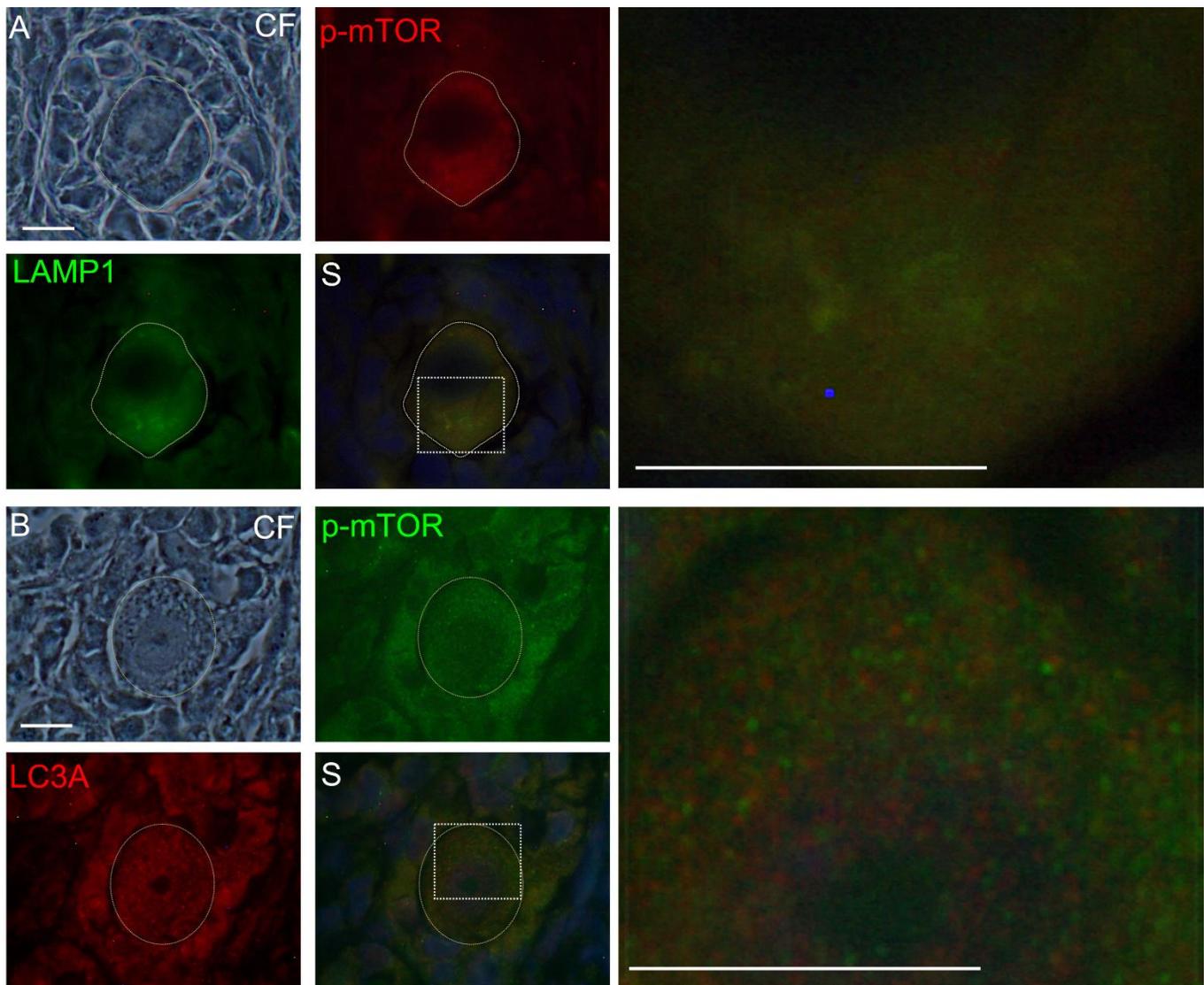


Figura 33. Dobles inmunolocalizaciones de LAMP1/p-mTOR y LC3A/p-mTOR en ovario de rata de 5 días de edad. En A se detalla una célula germinal de folículo secundario atrésico con presencia de LAMP1 y p-mTOR. En mayor aumento (a la derecha) se ve la superposición con colocalización entre ambas proteínas. En B, un ovocito de folículo primario que dio positivo a LC3A en rojo y p-mTOR en verde. A mayor aumento en la superposición no se observa colocalización. CF: contraste de fase. S: superposición de proteínas localizadas más DAPI en azul. Las líneas punteadas evidencian al ovocito de un folículo atrésico. Barra de escalas: 10 μ m.

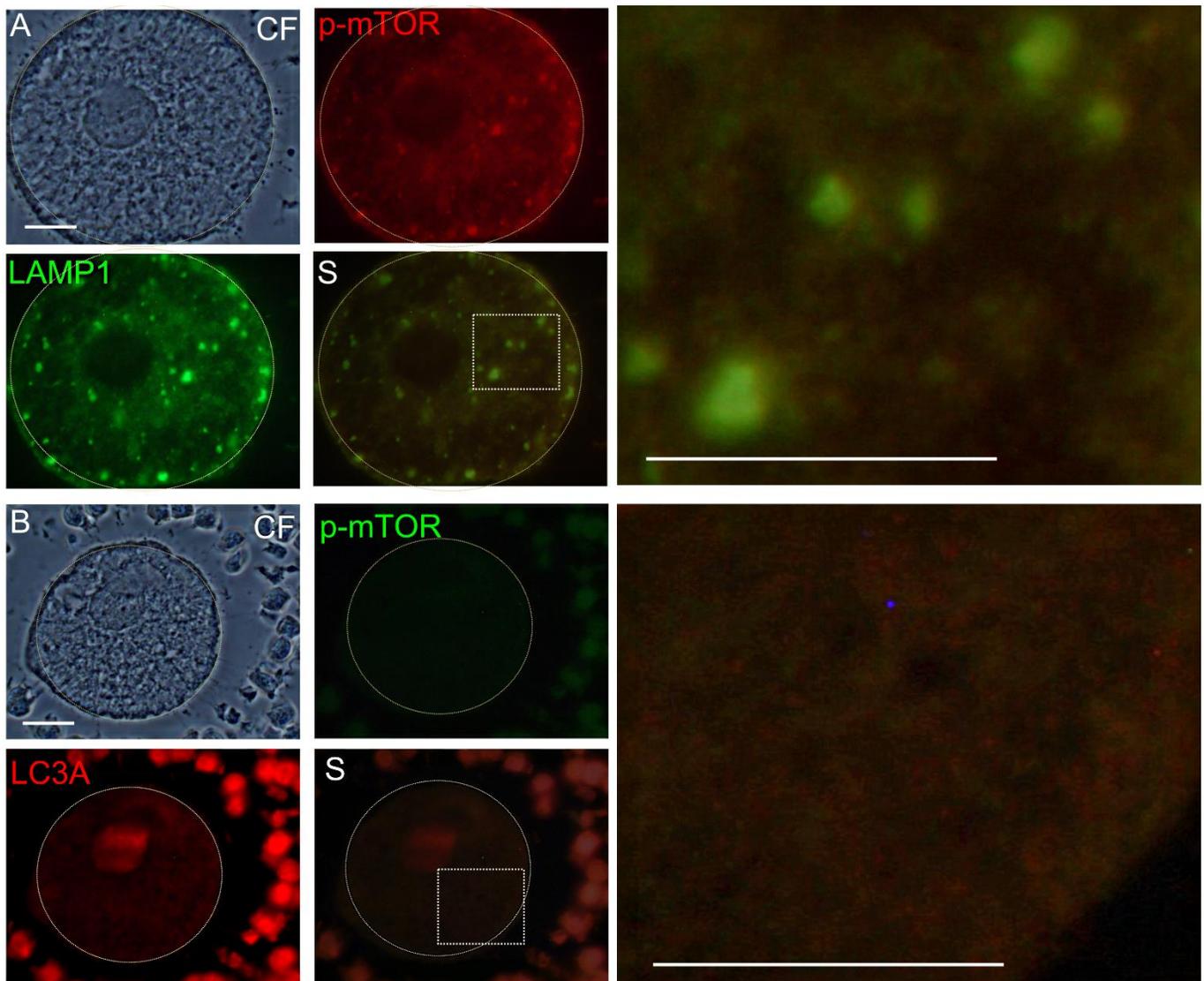


Figura 34. Dobles inmunolocalizaciones de LAMP1/p-mTOR y LC3A/p-mTOR en ovario de 19 días de edad. (A,B) Se observa un ovocito de un folículo pre-antral atrésico. En A se ve un ovocito con muchas vesículas autofágicas, y se inmunodetectó LAMP1 en verde y p-mTOR en rojo. En una ampliación (a la derecha) se ve la superposición y la colocalización de ambas proteínas. En B se expone un ovocito de folículo atrésico, sin uniones con las células de la granulosa y alta densidad de vesículas. Se inmunodetectó LC3A predominantemente en el área nuclear, y una disminución aparente de p-mTOR. CF: contraste de fase. S: superposición de proteínas localizadas más DAPI en azul. Las líneas punteadas evidencian al ovocito de un folículo atrésico. Barra de escalas: 10 μ m.

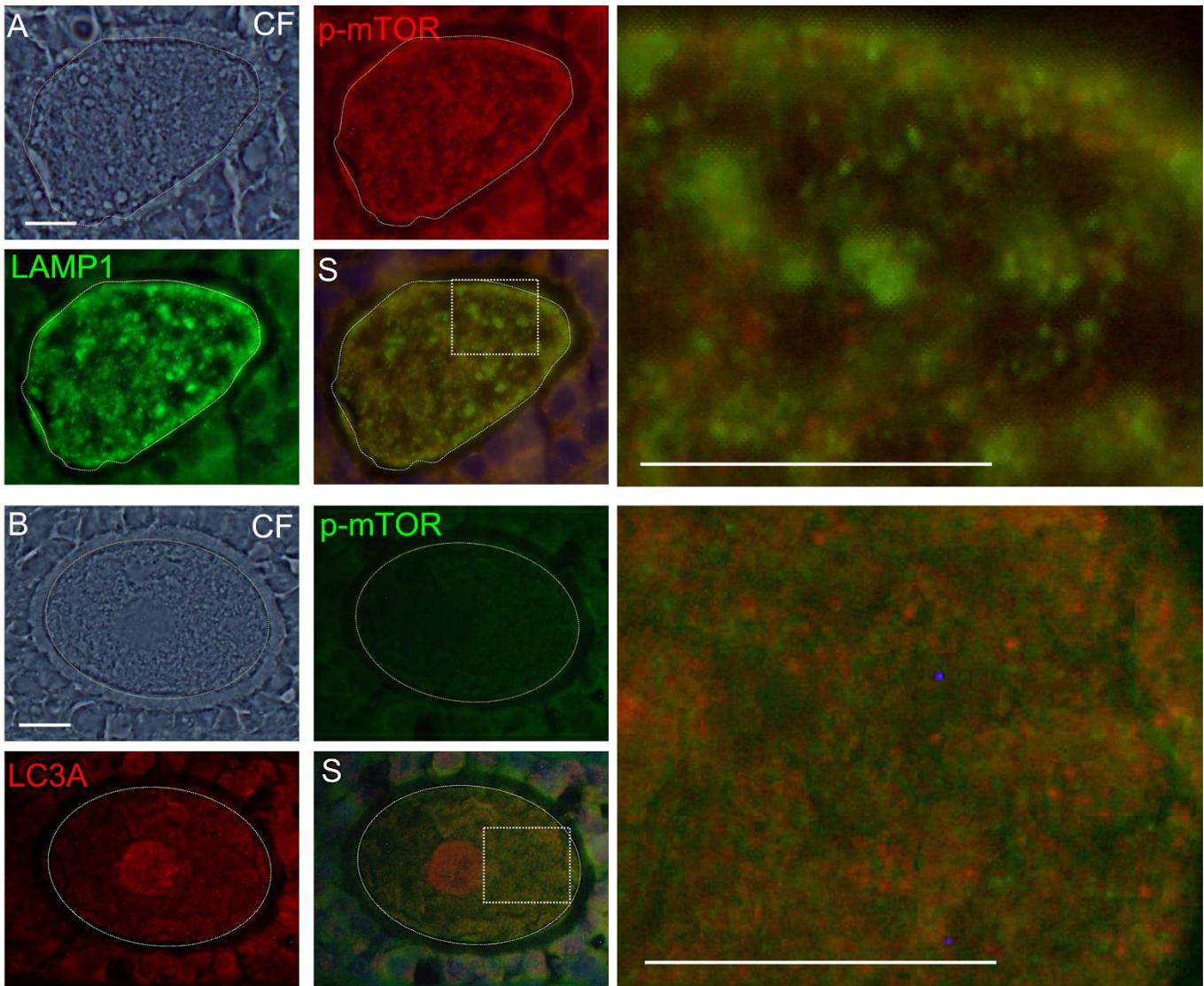


Figura 35. Dobles inmunolocalizaciones de LAMP1/p-mTOR y LC3A/p-mTOR en ovario de rata de 28 días de edad. En A se detalla una célula germinal con muchas vesículas autofágica, se inmunodetectó LAMP1 en verde y p-mTOR en rojo. En una ampliación (a la derecha) se ve la colocalización de ambas proteínas. En B, un ovocito de folículo secundario sano en donde se inmunolocalizó LC3A en rojo y p-mTOR en verde. En el aumento se observa la superposición en donde no hay colocalización. CF: contraste de fase. S: superposición de proteínas localizadas más DAPI en azul. Las líneas punteadas evidencian al ovocito. Barra de escalas: 10 μ m.

Los ensayos realizados *in situ*, permitieron observar diferentes tipos de distribución y presencia de las proteínas relacionadas con la autofagia.

En el caso específico de la proteína mTOR en sus formas no fosforilada y fosforilada presentaron un comportamiento antagónico. Si bien, mTOR total aumenta en 1 y 19 días de edad, y no es así en 5 y 28 días, esto podría deberse a otros factores que estén ocurriendo en cada una de las etapas foliculares; pero es un hecho que mTOR fosforilado activo tenga una cierta reducción en su abundancia durante la muerte celular mediada por la autofagia. Incluso, en el análisis de las dobles inmunolocalizaciones, mTOR fosforilado se encontró reducido con respecto a los marcadores LAMP1 y LC3A (Figuras 32-35; A, B).

Por ello, una vez que identificamos las proteínas autofágicas durante la atresia, se analizaron mediante la técnica de *Western Blot* para medir la abundancia de cada una de ellas, e interpretar la modulación del proceso autofágico.

Parte II “*In vitro*”

Análisis de la cantidad de proteínas autofágicas en ovocitos de 19 y 28 días de edad

Los resultados obtenidos con los análisis morfológicos y de inmunofluorescencia, mostraron que en los ovarios de rata de 19 y 28 días la autofagia es mayor, por lo que para la siguiente etapa del estudio se decidió utilizar poblaciones enriquecidas de ovocitos de esas dos edades, garantizando una proporción importante de ovocitos de folículos atrésicos.

Las fracciones celulares enriquecidas con ovocitos, se obtuvieron por medio de la técnica de cultivo celular primario de ovarios de ratas de 19 y 28 días de edad. Los ovarios fueron extraídos de los organismos y posteriormente disgregados con una solución de tripsina. Se cultivaron durante 24 horas en medio DMEM alto en glucosa y enriquecido con 0.1% de BSA y 10% de suero fetal bovino. Después de las 24 hrs, las células somáticas se adhieren al plato de cultivo y las germinales permanecen suspendidas en el medio débilmente asociadas a las células somáticas, por lo que se extraen por medio de un suave pipeteo. Una vez obtenidos los ovocitos, se extrajeron las proteínas totales, para evaluar la abundancia de las proteínas mTOR, p-mTOR Ser2448, BECN1, ATG14, ATG4b, LC3A, LAMP1, p62/SQSTM1, p-ERK1/2, p-AKT, mediante la técnica de *Western Blot*.

Los resultados fueron analizados realizando una densitometría de las bandas que evidencian cada una de las proteínas analizadas.

Los resultados muestran que en los ovocitos de ratas de 19 y 28 días la fosforilación de la proteína mTOR en la Ser2448 se encuentra disminuida con respecto a la proteína mTOR total (Figuras 36-37), evidenciando una disminución de su actividad (como es bloqueador del proceso autofágico) que concuerda con un aumento de la autofagia.

Con respecto a BECN1, se encontró con mayor abundancia en los ovocitos de ovarios de rata de 28 días de edad (Figuras 36-37), lo que sugiere una mayor actividad autofágica en las células germinales de 28 días que en las de 19 días. Adicionalmente, se observó que la proteína ATG14 también se expresa en ambas poblaciones celulares, lo que en conjunto con la presencia de Beclina-1 permite proponer la idea de la posible formación del complejo PI3K-III durante la autofagia en estas células germinales.

Para determinar la progresión de la formación de las vesículas autofágicas se identificó la abundancia de la proteína LC3A. Encontramos que LC3A se encuentra de forma detectable en ambas edades y localizamos solo la forma lipídada. Con respecto a ATG4B, quién escinde a pro-LC3 encontramos mayor cantidad a los 28 días de edad (Figuras 36 y 37), reiterando que el corte de pro-LC3 es constitutivo en los ovocitos de folículos atrésicos de esta edad.

LAMP1 es una proteína importante en la degradación intracelular. LAMP1 se encuentra en gran cantidad en los ovocitos de ambas edades estudiadas especialmente a los 28 días, indicando una alta actividad lisosomal. Lo anterior, sumado a la disminuida abundancia de p62/SQSTM1 en esas mismas poblaciones celulares, indican no sólo la presencia del proceso autofágico, sino que posiblemente la degradación de contenido intracelular es de forma selectiva (Figuras 36 y 37).

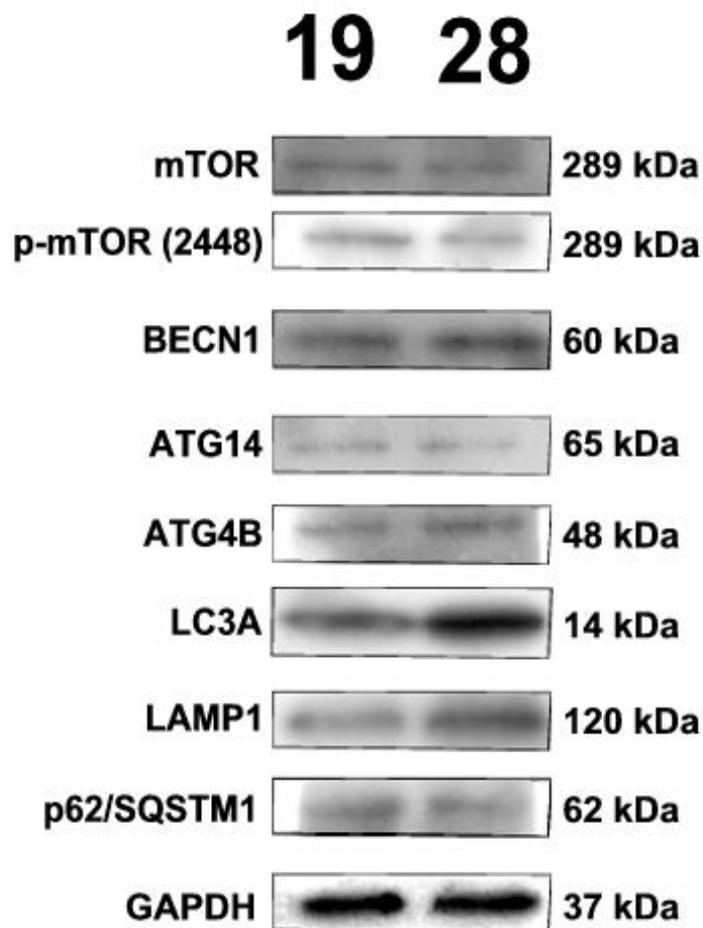


Figura 36. *Western Blot* representativo que muestran la presencia de mTOR, p-mTOR, BECN1, ATG14, ATG4B, LC3A, LAMP1, p62/SQSTM1 durante la autofagia en ovocitos de ovario de 19 y 28 días de edad. Análisis en una misma membrana.

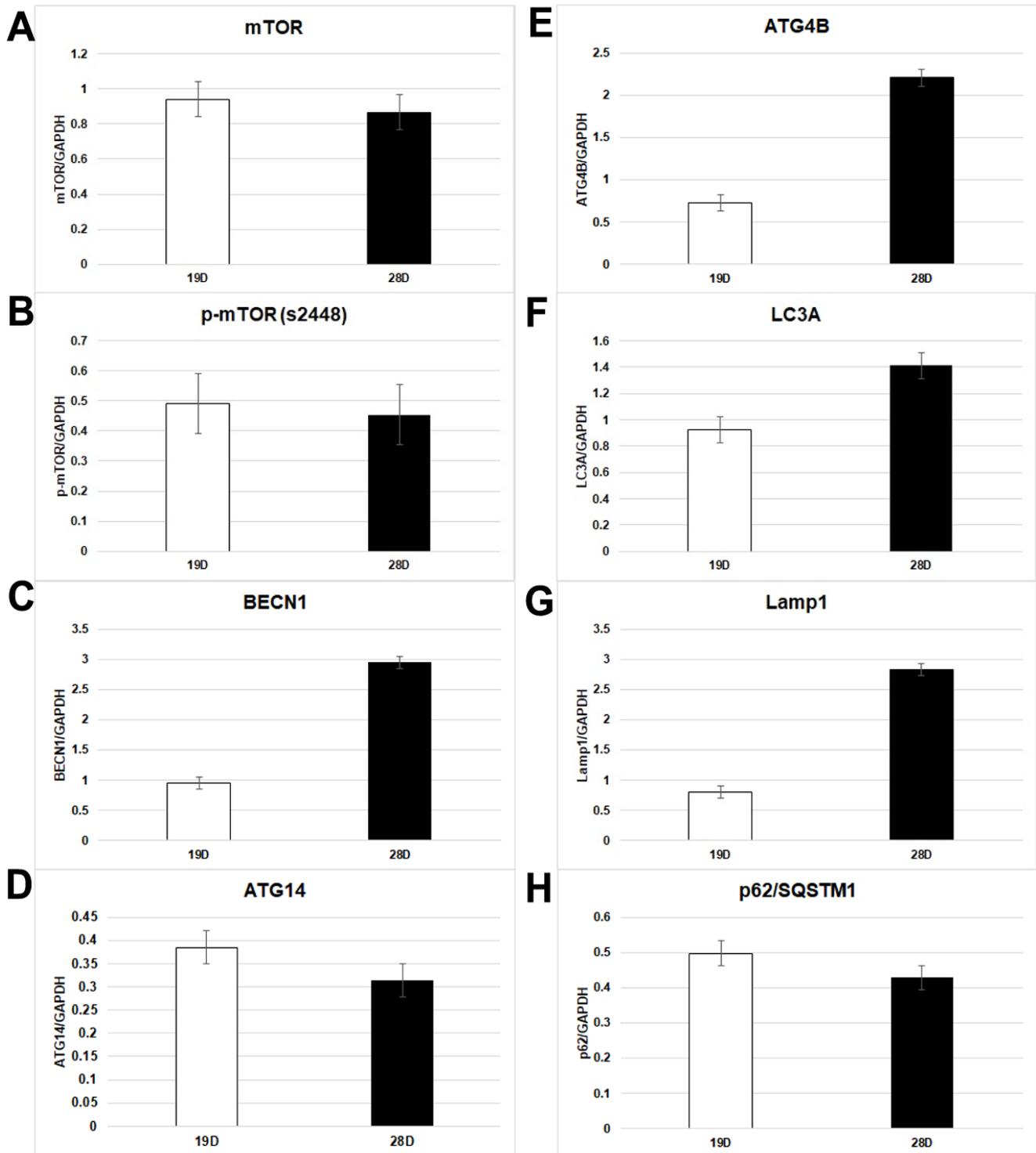


Figura 37. Representación gráfica de la cuantificación densitométrica de *western Blot* de proteínas autofágicas de ovario de 19 y 28 días de edad. (a) mTOR, (b) p-mTOR, (c) BECN1, (d) ATG14, (e) ATG4B, (f) LC3A, (g) LAMP1, (h) p62/SQSTM1, en proteínas totales de ovocitos de ovario de 19 y 28 días de edad. Las barras representan la media \pm error estándar (n=2 membranas diferentes).

Para determinar la participación de las vías de señalización río arriba de mTOR, se analizaron las vías de MAPK y AKT ya que ambas promueven la supervivencia celular y están involucradas en la regulación de la autofagia. Se utilizó un cóctel de anticuerpos para *Western blot* que contiene 5 anticuerpos anti-conejo dirigidos al estado de fosforilación de 4 proteínas de señalización: p-AKT1 S473 y p-RPS6 S235/236 pertenecientes a la vía PI3K/PTEN/AKT/mTOR; p-ERK1/2 Y204/197 y p-P90RSK S380, las que pertenecen a la vía MAPK; y los niveles totales de la proteína de control de carga, Rab11. Los resultados mostraron que p-AKT1 y p-RPS6 no están presentes en los ovocitos de las edades de 19 y 28 días (Figura 38), lo cual sugiere que la vía de PI3K/AKT/mTOR no está inhibiendo a la autofagia. Sin embargo, p-ERK1/2 y p-P90RSK se encontraron de manera detectable con respecto a GAPDH en los ovocitos de ambas edades, lo que nos indica que posiblemente están regulando de una alguna manera a la autofagia.

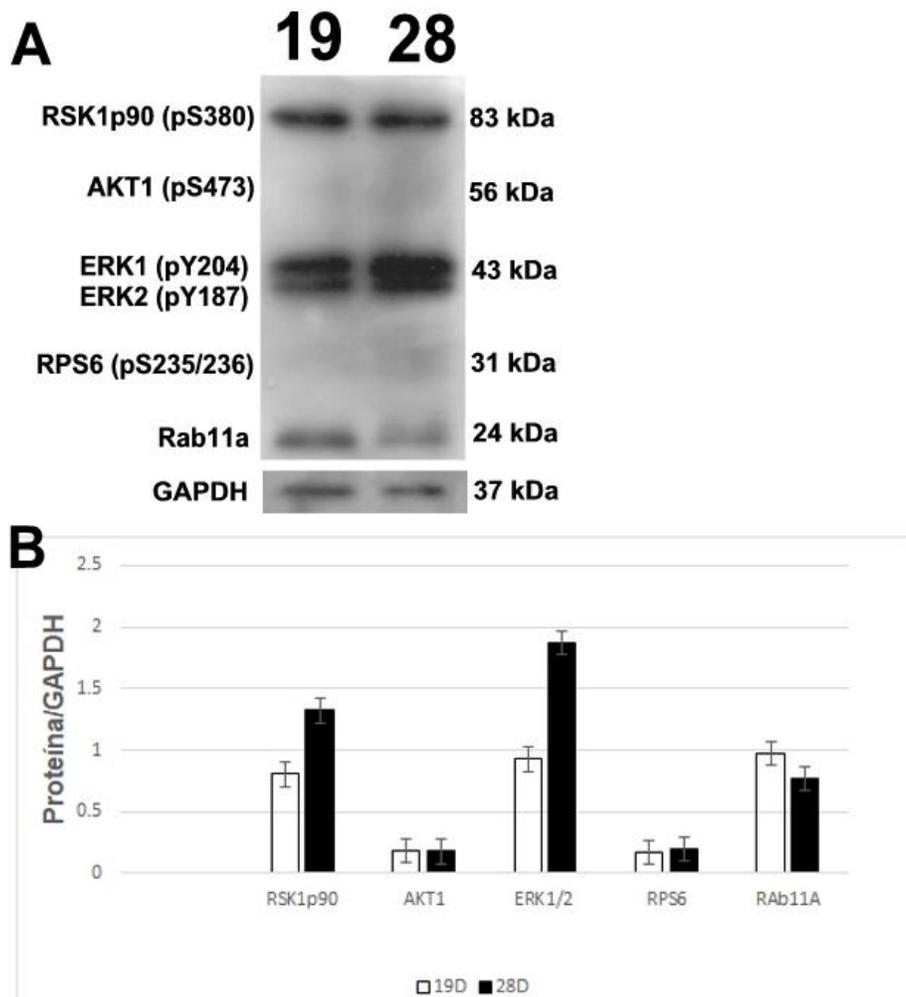


Figura 38. Señalización de AKT y MAPK en proteínas totales de ovocitos de 19 y 28 días. (A) *Western Blot* de las proteínas participantes en la vía de señalización AKT y MAPK, (B) Cuantificación densitométrica. Las barras representan la media \pm error estándar (n=2 membranas diferentes).

DISCUSIÓN

Estudios realizados en ovarios de rata prepúberes han demostrado que es un órgano que se encuentra bajo una constante dinámica de eliminación de folículos (Escobar *et al.*, 2008; 2010; 2019; Ortiz *et al.*, 2006). Una de las vías de muerte celular que se han identificado durante la atresia folicular de ovario de rata es la mediada por la autofagia (Escobar *et al.*, 2008; 2010; 2019; Ortiz *et al.*, 2006). Es necesario recalcar que la autofagia es en principio, un mecanismo de citoprotección (El-Nashar *et al.*, 2021; Gawriluk *et al.*, 2011) por lo que varias observaciones en las células germinales femeninas han sido dirigidas hacia el papel que puede estar jugando la autofagia durante la calidad y envejecimiento del ovocito, la progresión de la meiosis y su maduración (He *et al.*, 2020; Leoni *et al.*, 2015; Peters *et al.*, 2021; Shen *et al.*, 2018; Tingen *et al.*, 2009). A diferencia de los anteriores estudios, el objetivo del presente trabajo fue identificar las moléculas que participan durante la activación de la autofagia durante la muerte celular de ovocitos de ovario de rata prepúber.

Las evidencias morfológicas que se obtuvieron en el presente trabajo permitieron corroborar con otros estudios (Escobar *et al.*, 2008; Ortiz *et al.*, 2006) que en efecto existen ovocitos con una abundante vacuolización citoplasmática, apoyando la idea de la participación de la autofagia como medio de eliminación celular. Esta morfología se presenta en edades tan tempranas del desarrollo de los individuos como desde el primer día de nacimiento (neonatal) hasta la edad peri-puberal, siendo más evidente en las edades de 19 y 28 días.

También logramos identificar que en los ovocitos de folículos atrésicos de ovarios de rata 19 y 28 días de edad, las proteínas mTOR total (inhibición de la autofagia) y p-mTOR Ser2448 (activación de mTOR) se disminuyeron notablemente durante la muerte celular con autofagia, esto verificado con un análisis “*in situ*” de una muestra de 16 ratas y un test de Wilcoxon, así como un análisis “*in vitro*” de una muestra de 16 ratas. En el sentido de la baja actividad de mTOR, se ha demostrado experimentalmente que la inhibición de mTOR por medio de la rapamicina, induce la autofagia (De Felici *et al.*, 2008), dando paso a la formación de autofagosomas. Aquí hemos encontrado que mTOR puede estar funcionando de manera diferencial dependiendo de la etapa de crecimiento de los folículos, por ejemplo, en los folículos primordiales se observó mayor presencia de mTOR total, en donde mTOR participa en la activación folicular (Vizza *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2021).

Enfocándonos en la autofagia como un proceso de muerte celular que como un proceso de supervivencia, hemos encontrado que en ovarios de rata de 19 y 28 días, existe una abundante cantidad de folículos en estadios secundarios, pre-antrales y antrales con amplias zonas citoplasmáticas en proceso de degradación, que al ser analizados a nivel inmunofluorescente,

presentan una elevada marca positiva para las proteínas que tienen un papel en la autofagia como son BECN1, LC3A y LAMP1 remarcando que los ovocitos de folículos que han alcanzado una fase mayor de crecimiento son eliminados, ya que los individuos aún no han alcanzado la etapa de madurez sexual y llevar a cabo la liberación de las células germinales vía el evento de ovulación. Aprovechando esto, hemos realizado el análisis de la abundancia no sólo de las proteínas que participan en la formación (BECN1), elongación (LC3A) y degradación (LAMP1) de las vesículas autofágicas, sino también de las que pueden iniciar el proceso de autofagia vía su influencia sobre la proteína mTOR, que como ya vimos, se ve inhibida. La vía de señalización de ERK1/2 es un potencial candidato en la regulación de la autofagia puesto que regula el estado de energía celular para mantener la homeostasis energética. AMPK estimula la autofagia mediante la inhibición de mTORC1 a nivel de la proteína TSC2 (Inoki *et al.*, 2003). Además, AMPK puede inhibir directamente a *Raptor*, quien es un componente del complejo mTORC1, complejo que inhibe directamente a la autofagia inhibiendo a ULK1. Raptor es un sustrato directo de AMPK, cuya fosforilación en ser792 estimula la activación de la autofagia durante el estrés energético, dando como consecuencia una activación de la autofagia (Gwinn *et al.*, 2008). Por otro lado, en condiciones de inanición de glucosa, AMPK promueve la autofagia activando directamente ULK1 por medio de la fosforilación de S317, S555, S777. En condiciones de suficiencia de nutrientes, la elevada actividad de mTOR inhibe a la proteína iniciadora de la autofagia ULK1 fosforilandola en la Ser757 e inhibiendo a la autofagia (Kim *et al.*, 2011; Holczer *et al.*, 2020).

La vía de las MAPK y la AMPK se entrecruzan para regular el estado de energía celular. Se ha demostrado que la AMPK es un regulador río arriba de la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) en la autofagia (Wang *et al.*, 2009). La señalización de ERK1/2 participa en la regulación de la autofagia, influye en la formación de autofagosomas y ajusta la expresión génica para el recambio celular, así como la síntesis de proteínas de autofagia (Thapalia *et al.*, 2016).

Los datos obtenidos por el análisis de la cantidad de ERK1/2, han sido muy interesantes ya que nos brinda una idea de que podrían estar incidiendo sobre la inactivación de mTOR para que pueda dejar de inhibir a la autofagia. La ausencia de la forma activa de AKT, es decir, la forma fosforilada, indica que no está activa la vía de sobrevivencia PI3K/AKT (Yazid *et al.*, 2021), apoyando la idea de la promoción de la autofagia como ruta de eliminación celular vía la inactivación de mTOR de manera independiente a AKT. De hecho, al suprimir la señalización de AKT en células de la granulosa promueve la autofagia durante la atresia folicular en ovario de ratas pre-púber (Choi *et al.*, 2014A). Además, AKT inhibe la activación de ERK1/2 mediante la fosforilación de sitios inhibidores en el extremo N-terminal de Raf (Mendoza *et al.*, 2011).

Por lo tanto, una vez descartada la activación de mTOR como mecanismo de sobrevivencia, se propone que la disminución de mTOR y p-mTOR Ser2448, induce una activación de la autofagia que resulta en niveles tan elevados de degradación intracelular, que conducen las células a la muerte. Aunque nuestros resultados revelan que ERK1/2 se encuentra presente, es evidente que no promueve la inhibición de la autofagia vía mTOR (Cook *et al.*, 2017; Huang & Manning, 2008), si no que estarían jugando el rol de regulador del incremento de la autofagia como sucede durante la regresión del cuerpo lúteo (Choi *et al.*, 2014B).

Adicionalmente, las proteínas que se activan posteriormente a la inactivación de mTOR y que se ven involucradas en las diferentes etapas del proceso autofágico como BECN1 y ATG14, ambas pertenecientes al complejo PI3-K-III-CI, muestran mayor cantidad en los ovocitos de 19 y 28 días. Es importante mencionar que ATG14 es fundamental para la formación del fagóforo, de tal manera que la disminución de esta proteína inhibe el proceso autofágico (Zhong *et al.*, 2009; Menon *et al.*, 2018). En otras proteínas analizadas como LC3A encontramos que, en condiciones basales, la marca que identifica a la proteína se encuentra tanto en el núcleo como en el citoplasma. Sin embargo, en las células germinales alteradas se distribuye predominantemente en el citoplasma. Huang *et al.*, 2015 demostraron que, en condiciones de agotamiento de nutrientes, LC3 nuclear es desacetilada por la desacetilasa nuclear, SIRT1, que facilita su exportación citoplasmática, esta modificación postraduccional es esencial para la interacción LC3-ATG7, que es una interacción indispensable para la autofagia canónica.

En este estudio, también hemos analizado el comportamiento de la proteína p62/SQSTM1, el hecho de que se vea seriamente reducida en los ovocitos en proceso de degeneración, indica que el flujo de la autofagia funciona. Sin embargo, también p62/SQSTM1 podría tener otras funciones con respecto a su papel en la autofagia (Zhang *et al.*, 2013). El análisis a nivel ultraestructural ha evidenciado una abundante cantidad de vesículas autofágicas con contenido mitocondrial (Ortíz *et al.*, 2006). Tanto la baja abundancia de p62/SQSTM1 en las células con autofagia excesiva como la gran cantidad de vesículas autofágicas con restos mitocondriales son evidencias indirectas que apoyan la idea de que la activación de la autofagia en ovocitos de folículos atresicos vía una disminución de los niveles de energía, reducidos tanto por la limitación de nutrientes ocasionado por la separación del ovocito de las células de la granulosa, como por la eliminación selectiva (mitofagia) y masiva de las mitocondrias. Un modelo *in vivo* demostró que la deficiencia de nutrientes al nacer genera una serie de respuestas metabólicas y oxidativas en los ovarios lo que provoca un aumento de la autofagia en el ovocito y las células somáticas (Wang *et al.*, 2017).

CONCLUSIONES

- La muerte celular programada mediada por la autofagia se presenta en ovocitos de folículos atrésicos en organismos de 1, 5, 19 y 28 días de edad, siendo más evidente en las edades de 19 y 28 días.
- La activación de la autofagia durante la eliminación de los ovocitos está medida por la inactivación de la proteína mTOR, medida con p-mTOR Ser2448.
- La autofagia en ovocitos de 19 y 28 días de edad no se activa por la vía PI3K/AKT.
- ERK1/2 podría participar en la regulación de la autofagia en los ovocitos de folículos atrésicos.
- La abundancia de BECN1 y ATG14 en los ovocitos sugiere la participación del complejo PI3-K-III-CI durante la autofagia en las células germinales.

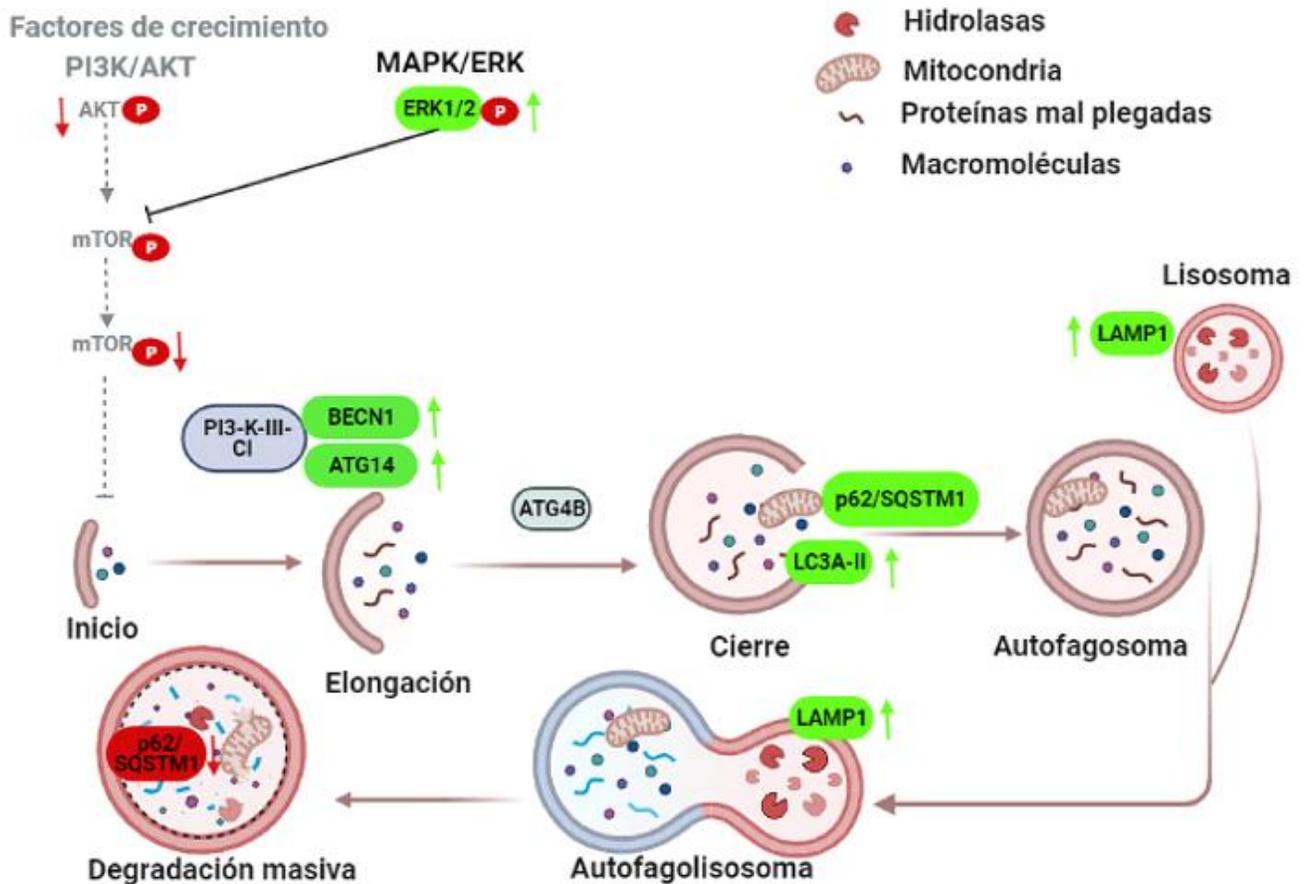


Figura 39. Modelo Hipotético de la autofagia en células germinales de ratas pre-púber (19 y 28 días). Durante la atresia folicular, se interrumpe la interacción de los ovocitos con las células de la granulosa, perdiendo así todos los elementos vitales que requiere para sobrevivir. En la presente tesis, se encontró que hay una pérdida en la señalización de PI3K/AKT (línea gris). Hallamos una disminución de la actividad de mTOR medida por la fosforilación en S2448 (línea gris), por lo que suponemos se evita la inhibición del inicio de la autofagia. Por otro lado, encontramos que está presente la vía de ERK1/2 la cual podría estar regulando la muerte celular. Aunado a lo anterior, es evidente el reclutamiento del complejo PI3-K-III-CI (BECN1 y ATG14), así como el aumento de LC3A y LAMP1 en el citoplasma. Y finalmente la degradación celular medida por la cantidad disminuida de p62/SQSTM1.

PERSPECTIVAS

Como se mencionó en la discusión, una pregunta clave es cómo participa la vía de ERK1/2 en la regulación de la autofagia en los ovocitos atrésicos durante la etapa peri-ovulatoria, así como con qué otras proteínas podrían estar relacionadas. Asimismo, es necesario averiguar la presencia de los complejos TSC1/2 y ULK1 quienes al estar activos pueden mediar la muerte celular autofágica

Dado que la actividad del sensor de nutrientes mTOR se encuentra disminuida, es requerido analizar otros sitios de fosforilación de mTOR para estudiar más a fondo su dinámica y relacionarlo con Raptor, una proteína esencial del complejo.

Finalmente, este estudio se realizó durante la fase pre-púber y se detalló el proceso autofágico en las edades de 19 y 28 días, sería considerable estudiar más a fondo las edades 1 y 5 días; de la misma manera que en organismos posteriores a la primera ovulación.

REFERENCIAS CITADAS

- ✓ Acosta-Jaquez, H. A., Keller, J. A., Foster, K. G., Ekim, B., Soliman, G. A., Feener, E. P., ... & Fingar, D. C. (2009). Site-specific mTOR phosphorylation promotes mTORC1-mediated signaling and cell growth. *Molecular and cellular biology*, 29(15), 4308-4324.
- ✓ Agrotis, A., Pengo, N., Burden, J. J., & Ketteler, R. (2019). Redundancy of human ATG4 protease isoforms in autophagy and LC3/GABARAP processing revealed in cells. *Autophagy*, 15(6), 976-997.
- ✓ Alam, M. H., & Miyano, T. (2020). Interaction between growing oocytes and granulosa cells in vitro. *Reproductive Medicine and Biology*, 19(1), 13-23.
- ✓ Al-Bari, M. A. A., & Xu, P. (2020). Molecular regulation of autophagy machinery by mTOR-dependent and-independent pathways. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1467(1), 3-20.
- ✓ Al-Aamri, H. M., Irving, H. R., Bradley, C., & Meehan-Andrews, T. (2021). Intrinsic and extrinsic apoptosis responses in leukaemia cells following daunorubicin treatment. *BMC cancer*, 21(1), 1-10.
- ✓ Alers, S., Löffler, A. S., Wesselborg, S., & Stork, B. (2012). Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Molecular and cellular biology*, 32(1), 2-11.
- ✓ Allen, E. A., & Baehrecke, E. H. (2020). Autophagy in animal development. *Cell Death & Differentiation*, 27(3), 903-918.
- ✓ Aman, Y., Schmauck-Medina, T., Hansen, M., Morimoto, R. I., Simon, A. K., Bjedov, I., ... & Fang, E. F. (2021). Autophagy in healthy aging and disease. *Nature aging*, 1(8), 634-650.
- ✓ Arsham, A. M., & Neufeld, T. P. (2006). Thinking globally and acting locally with TOR. Current opinion in cell biology, 18(6), 589-597.
- ✓ Babbar, M., Basu, S., Yang, B., Croteau, D. L., & Bohr, V. A. (2020). Mitophagy and DNA damage signaling in human aging. *Mechanisms of ageing and development*, 186, 111207.
- ✓ Bach, M., Larance, M., James, D. E., & Ramm, G. (2011). The serine/threonine kinase ULK1 is a target of multiple phosphorylation events. *Biochemical Journal*, 440(2), 283-291.
- ✓ Baek, K. H., Park, J., & Shin, I. (2012). Autophagy-regulating small molecules and their therapeutic applications. *Chemical Society Reviews*, 41(8), 3245-3263.
- ✓ Baeken, M. W., Weckmann, K., Diefenthaler, P., Schulte, J., Yusufli, K., Moosmann, B., ... & Hajieva, P. (2020). Novel insights into the cellular localization and regulation of the autophagosomal proteins LC3A, LC3B and LC3C. *Cells*, 9(10), 2315.
- ✓ Bagnjuk, K., Stöckl, J. B., Fröhlich, T., Arnold, G. J., Behr, R., Berg, U., ... & Mayerhofer, A. (2019). Necroptosis in primate luteolysis: a role for ceramide. *Cell death discovery*, 5(1), 1-14.
- ✓ Bedoui, S., Herold, M. J., & Strasser, A. (2020). Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications. *Nature reviews Molecular cell biology*, 21(11), 678-695.
- ✓ Bossen, C., Ingold, K., Tardivel, A., Bodmer, J. L., Gaide, O., Hertig, S., & Schneider, P. (2006). Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human. *Journal of Biological Chemistry*, 281(20), 13964-13971.
- ✓ Bosu, W. T., Perez, G. I., & Kujjo, L. L. (1996). Natural and endotoxin-induced atresia of preantral and early antral follicles is characterized by DNA internucleosomal cleavage. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 44(3), 352-359.
- ✓ Brown, D. A., Yang, N., & Ray, S. D. (2014). Apoptosis in Encyclopedia of Toxicology.
- ✓ Brugarolas, J., Lei, K., Hurley, R. L., Manning, B. D., Reiling, J. H., Hafen, E., & Kaelin, W. G. (2004). Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes & development*, 18(23), 2893-2904.
- ✓ Budanov, A. V., & Karin, M. (2008). p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell*, 134(3), 451-460.
- ✓ Byskov, A. G. S. (1974). Cell kinetic studies of follicular atresia in the mouse ovary. *Journal of reproduction and fertility*, 37(2), 277-285.
- ✓ Carroll, B. (2020). Spatial regulation of mTORC1 signalling: Beyond the Rag GTPases. In *Seminars in cell & developmental biology*. Academic Press.
- ✓ Celestino, J. J. H., Chaves, R. N., Matos, M. H. T., Silva, M. S. J., Bruno, J. B., Maia-Júnior, J. E., & Figueiredo, J. R. (2018). Mechanisms of atresia in ovarian follicles. *Animal Reproduction (AR)*, 6(4), 495-508.
- ✓ Chang, M. H., Karageorgos, L. E., & Meikle, P. J. (2002). CD107a (LAMP-1) and CD107b (LAMP-2). *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, 16(2), 147-151.
- ✓ Chen, J., Kos, R., Garssen, J., & Redegeld, F. (2019A). Molecular insights into the mechanism of necroptosis: the necrosome as a potential therapeutic target. *Cells*, 8(12), 1486.

- ✓ Chen, Y., Liu, X., Wang, H., Liu, S., Hu, N., & Li, X. (2019B). Akt regulated phosphorylation of GSK-3 β /cyclin D1, p21 and p27 contributes to cell proliferation through cell cycle progression from G1 to S/G2M phase in low-dose arsenite exposed HaCat cells. *Frontiers in pharmacology*, 10, 1176.
- ✓ Chen, Y., Su, Q. P., & Yu, L. (2019C). Studying autophagic lysosome reformation in cells and by an in vitro reconstitution system. In *Autophagy* (pp. 163-172). Humana Press, New York, NY.
- ✓ Chen, Q., Ma, K., Liu, X., Chen, S. H., Li, P., Yu, Y., ... & Yu, X. (2022). Truncated PARP1 mediates ADP-ribosylation of RNA polymerase III for apoptosis. *Cell discovery*, 8(1), 1-19.
- ✓ Cheng, S. W., Fryer, L. G., Carling, D., & Shepherd, P. R. (2004). Thr2446 is a novel mammalian target of rapamycin (mTOR) phosphorylation site regulated by nutrient status. *Journal of Biological Chemistry*, 279(16), 15719-15722.
- ✓ Cheng, X., Ma, X., Ding, X., Li, L., Jiang, X., Shen, Z., ... & Sun, Q. (2017). Pacer mediates the function of class III PI3K and HOPS complexes in autophagosome maturation by engaging Stx17. *Molecular Cell*, 65(6), 1029-1043.
- ✓ Chiang, G. G., & Abraham, R. T. (2005). Phosphorylation of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) at Ser-2448 Is Mediated by p70S6 Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 280(27), 25485-25490.
- ✓ Choi, J., Jo, M., Lee, E., & Choi, D. (2014A). AKT is involved in granulosa cell autophagy regulation via mTOR signaling during rat follicular development and atresia. *Reproduction*, 147(1), 73-80.
- ✓ Choi, J., Jo, M., Lee, E., & Choi, D. (2014B). ERK1/2 is involved in luteal cell autophagy regulation during corpus luteum regression via an mTOR-independent pathway. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 20(10), 972-980.
- ✓ Clément, F., Yvinec, R., Gallay, N., Gagniac, L., Guillou, F., & Crépieux, P. (2021). The follicle-stimulating hormone signaling network in gonadal cells. In *Cellular Endocrinology in Health and Disease* (pp. 421-443). Academic Press.
- ✓ Cook, S. J., Stuart, K., Gilley, R., & Sale, M. J. (2017). Control of cell death and mitochondrial fission by ERK 1/2 MAP kinase signalling. *The FEBS journal*, 284(24), 4177-4195.
- ✓ Decuypere, J. P., Welkenhuyzen, K., Luyten, T., Ponsaerts, R., Dewaele, M., Molgó, J., ... & Bultynck, G. (2011). Ins (1, 4, 5) P 3 receptor-mediated Ca²⁺ signaling and autophagy induction are interrelated. *Autophagy*, 7(12), 1472-1489.
- ✓ De Felici, M., Lobascio, A. M., & Klinger, F. G. (2008). Cell death in fetal oocytes: many players for multiple pathways. *Autophagy*, 4(2), 240-242.
- ✓ De Martín Garrido, N., & Aylett, C. H. (2020). Nutrient signaling and lysosome positioning crosstalk through a multifunctional protein, folliculin. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 108.
- ✓ Delcour, C., Amazit, L., Patino, L. C., Magnin, F., Fagart, J., Delemer, B., ... & Beau, I. (2019). ATG7 and ATG9A loss-of-function variants trigger autophagy impairment and ovarian failure. *Genetics in Medicine*, 21(4), 930.
- ✓ Denton, D., Chang, T. K., Nicolson, S., Shravage, B., Simin, R., Baehrecke, E. H., & Kumar, S. (2012). Relationship between growth arrest and autophagy in midgut programmed cell death in *Drosophila*. *Cell Death & Differentiation*, 19(8), 1299-1307.
- ✓ Denton, D., & Kumar, S. (2019). Autophagy-dependent cell death. *Cell Death & Differentiation*, 26(4), 605-616.
- ✓ Deter, R. L., Baudhuin, P., & de Duve, C. (1967). Participation of lysosomes in cellular autophagy induced in rat liver by glucagon. *The Journal of cell biology*, 35(2), C11-C16.
- ✓ D'Herde, K., De Prest, B., & Roels, F. (1996). Subtypes of active cell death in the granulosa of ovarian atretic follicles in the quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Reproduction Nutrition Development*, 36(2), 175-189.
- ✓ Dhuriya, Y. K., & Sharma, D. (2018). Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death. *Journal of neuroinflammation*, 15(1), 1-9.
- ✓ Di, J., Tang, J., Qian, H., Franklin, D. A., Deisenroth, C., Itahana, Y., & Zhang, Y. (2017). p53 upregulates PLC ϵ -IP3-Ca²⁺ pathway and inhibits autophagy through its target gene Rap2B. *Oncotarget*, 8(39), 64657.
- ✓ Dikic, I., & Elazar, Z. (2018). Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nature reviews Molecular cell biology*, 19(6), 349-364.
- ✓ Dossou, A. S., & Basu, A. (2019). The emerging roles of mTORC1 in macromanaging autophagy. *Cancers*, 11(10), 1422.
- ✓ Du, Y., Bagnjuk, K., Lawson, M. S., Xu, J., & Mayerhofer, A. (2018). Acetylcholine and necroptosis are players in follicular development in primates. *Scientific Reports*, 8(1), 1-9.
- ✓ Dunlop, E. A., Hunt, D. K., Acosta-Jaquez, H. A., Fingar, D. C., & Tee, A. R. (2011). ULK1 inhibits mTORC1 signaling, promotes multisite Raptor phosphorylation and hinders substrate

- binding. *Autophagy*, 7(7), 737-747.
- ✓ Egan, D. F., Shackelford, D. B., Mihaylova, M. M., Gelino, S., Kohnz, R. A., Mair, W., & Shaw, R. J. (2011). Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science*, 331(6016), 456-461.
 - ✓ Elkouby, Y. M., & Mullins, M. C. (2017). Coordination of cellular differentiation, polarity, mitosis and meiosis—new findings from early vertebrate oogenesis. *Developmental biology*, 430(2), 275-287.
 - ✓ Elliott, M. R., & Ravichandran, K. S. (2010). Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *Journal of Cell Biology*, 189(7), 1059-1070.
 - ✓ El-Nashar, E. M., Alghamdi, M. A., Alasmari, W. A., Hussein, M., Hamza, E., Taha, R. I., ... & Abdelfattah-Hassan, A. (2021). Autophagy Promotes the Survival of Adipose Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Enhances Their Therapeutic Effects in Cisplatin-Induced Liver Injury via Modulating TGF- β 1/Smad and PI3K/AKT Signaling Pathways. *Cells*, 10(9), 2475.
 - ✓ Escobar, M. L., Echeverría, O. M., Ortiz, R., & Vázquez-Nin, G. H. (2008). Combined apoptosis and autophagy, the process that eliminates the oocytes of atretic follicles in immature rats. *Apoptosis*, 13(10), 1253.
 - ✓ Escobar, M. L., Echeverría, O. M., Sánchez-Sánchez, L., Méndez, C., Pedernera, E., & Vázquez-Nin, G.H. (2010). Analysis of different cell death processes of prepubertal rat oocytes in vitro. *Apoptosis*, 15(4), 511- 526.
 - ✓ Escobar, M. L., Vázquez-Nin, G. H., & Echeverría, O. M. (2011). Brief Description of the Histological, Cytological and Functional Aspects of the Ovary. In *Cell Death in Mammalian Ovary* (pp. 3-24). Springer, Dordrecht.
 - ✓ Escobar, M. L., Echeverría, O. M., & Vázquez-Nin, G. H. (2015). Necrosis as programmed cell death. *Cell Death-Autophagy, Apoptosis and Necrosis*.
 - ✓ Escobar, M. L., Echeverría, O. M., Palacios-Martínez, S., Juárez-Chavero, S., Sánchez-Sánchez, L., & Vázquez-Nin, G. H. (2019). Beclin 1 Interacts with Active Caspase-3 and Bax in Oocytes from Atretic Follicles in the Rat Ovary. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 67(12), 873-889.
 - ✓ Fang, C., Gu, L., Smerin, D., Mao, S., & Xiong, X. (2017). The interrelation between reactive oxygen species and autophagy in neurological disorders. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017.
 - ✓ Ferraro, E., & Cecconi, F. (2007). Autophagic and apoptotic response to stress signals in mammalian cells. *Archives of biochemistry and biophysics*, 462(2), 210-219.
 - ✓ Filippi-Chiela, E. C., Viegas, M. S., Thomé, M. P., Buffon, A., Wink, M. R., & Lenz, G. (2016). Modulation of autophagy by calcium signalosome in human disease. *Molecular Pharmacology*, 90(3), 371-384.
 - ✓ Findlay, J. K., Dunning, M., Gilchrist, R. B., Hutt, K. J., Russell, D. L., & Walters, K. A. (2019). Follicle selection in mammalian ovaries. In *The Ovary* (pp. 3-21). Academic Press.
 - ✓ Flores-Romero, H., Hohorst, L., John, M., Albert, M. C., King, L. E., Beckmann, L., ... & Garcia-Saez, A. J. (2022). BCL-2-family protein tBID can act as a BAX-like effector of apoptosis. *The EMBO journal*, 41(2), e108690.
 - ✓ Fogel, A. I., Dlouhy, B. J., Wang, C., Ryu, S. W., Neutzner, A., Hasson, S. A., ... & Youle, R. J. (2013). Role of membrane association and Atg14-dependent phosphorylation in beclin-1-mediated autophagy. *Molecular and cellular biology*, 33(18), 3675-3688.
 - ✓ Fontana, F., Raimondi, M., Marzagalli, M., Di Domizio, A., & Limonta, P. (2020). The emerging role of paraptosis in tumor cell biology: Perspectives for cancer prevention and therapy with natural compounds. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1873(2), 188338.
 - ✓ Ford, E. A., Beckett, E. L., Roman, S. D., McLaughlin, E. A., & Sutherland, J. M. (2020). Advances in human primordial follicle activation and premature ovarian insufficiency. *Reproduction*, 159(1), R15-R29.
 - ✓ Foster, K. G., &ingar, D. C. (2010). Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony. *Journal of Biological Chemistry*, 285(19), 14071-14077.
 - ✓ Fulda, S. (2016). Regulation of necroptosis signaling and cell death by reactive oxygen species. *biological chemistry*, 397(7), 657-660.
 - ✓ Galluzzi, L., & Kroemer, G. (2017). Secondary necrosis: accidental no more. *Trends in cancer*, 3(1), 1-2.
 - ✓ Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., ... & Turk, B. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25(3), 486-541.
 - ✓ García-Arencibia, M., Hochfeld, W. E., Toh, P. P., & Rubinsztein, D. C. (2010). Autophagy, a guardian against neurodegeneration. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 21, No. 7,

- pp. 691-698). Academic Press.
- ✓ Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P. E., Didelot, C., & Kroemer, G. (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death & Differentiation*, 13(9), 1423-1433.
 - ✓ Gartner, L. P. (2020). Textbook of Histology E-Book. Elsevier Health Sciences.
 - ✓ Gawriluk, T. R., Hale, A. N., Flaws, J. A., Dillon, C. P., Green, D. R., & Rucker, E. B. (2011). Autophagy is a cell survival program for female germ cells in the murine ovary. *Reproduction*, 141(6), 759.
 - ✓ Giménez-Cassina, A., & Danial, N. N. (2015). Regulation of mitochondrial nutrient and energy metabolism by BCL-2 family proteins. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 26(4), 165-175.
 - ✓ Grasso, D., Renna, F. J., & Vaccaro, M. I. (2018). Initial steps in mammalian autophagosome biogenesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6, 146.
 - ✓ Green, D. R. (2022A). Inflammasomes and other caspase-activation platforms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 14(7), a041061.
 - ✓ Green, D. R. (2022B). The Mitochondrial Pathway of Apoptosis Part I: MOMP and Beyond. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 14(5), a041038.
 - ✓ Grive, K. J. (2020). Pathways coordinating oocyte attrition and abundance during mammalian ovarian reserve establishment. *Molecular Reproduction and Development*, 87(8), 843-856.
 - ✓ Guo, J., Zhang, T., Guo, Y., Sun, T., Li, H., Zhang, X., ... & Shi, L. (2018). Oocyte stage-specific effects of MTOR determine granulosa cell fate and oocyte quality in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(23), E5326-E5333
 - ✓ Guo, Y. J., Pan, W. W., Liu, S. B., Shen, Z. F., Xu, Y., & Hu, L. L. (2020). ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 19(3), 1997-2007.
 - ✓ Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., ... & Shaw, R. J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular cell*, 30(2), 214-226.
 - ✓ Hamasaki, M., Furuta, N., Matsuda, A., Nezu, A., Yamamoto, A., Fujita, N., ... & Amano, A. (2013). Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*, 495(7441), 389-393.
 - ✓ Han, J. H., Park, J., Kang, T. B., & Lee, K. H. (2021). Regulation of caspase-8 activity at the crossroads of pro-inflammation and anti-inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3318.
 - ✓ He, M., Zhang, T., Zhu, Z., Qin, S., Wang, H., Zhao, L., & Xin, Q. (2020). LSD1 contributes to programmed oocyte death by regulating the transcription of autophagy adaptor SQSTM1/p62. *Ageing Cell*.
 - ✓ Herzig, S., & Shaw, R. J. (2018). AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 19(2), 121-135.
 - ✓ Hirshfield, A. N. (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. In *International review of cytology* (Vol. 124, pp. 43-101). Academic Press.
 - ✓ Hoeffler, C. A., & Klann, E. (2010). mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends in neurosciences*, 33(2), 67-75.
 - ✓ Holczer, M., Hajdú, B., Lőrincz, T., Szarka, A., Bánhegyi, G., & Kapuy, O. (2020). Fine-tuning of AMPK-ULK1-mTORC1 regulatory triangle is crucial for autophagy oscillation. *Scientific reports*, 10(1), 1-12.
 - ✓ Holness, M. J., Sugden, P. H., Silvestre, M. F., & Sugden, M. C. (2012). Actions and interactions of AMPK with insulin, the peroxisomal-proliferator activated receptors and sirtuins. *Expert review of endocrinology & metabolism*, 7(2), 191-208.
 - ✓ Høyer-Hansen, M., Bastholm, L., Szyniarowski, P., Campanella, M., Szabadkai, G., Farkas, T., & Jäättelä, M. (2007). Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase- β , and Bcl-2. *Molecular cell*, 25(2), 193-205.
 - ✓ <https://www.uniprot.org/uniprot/P42345> (consultado el 02/02/2022).
 - ✓ Hu, Y., Bi, Y., Yao, D., Wang, P., & Li, Y. (2019). Omi/HtrA2 protease associated cell apoptosis participates in blood-brain barrier dysfunction. *Frontiers in molecular neuroscience*, 12, 48.
 - ✓ Hu, Z., Sankar, D. S., Vu, B., Leytens, A., Vionnet, C., Wu, W., ... & Dengjel, J. (2021). ULK1 phosphorylation of striatin activates protein phosphatase 2A and autophagy. *Cell Reports*, 36(13), 109762.
 - ✓ Huang, J., & Manning, B. D. (2008). The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochemical Journal*, 412(2), 179-190.
 - ✓ Huang, J., Dibble, C. C., Matsuzaki, M., & Manning, B. D. (2008). The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. *Molecular and cellular biology*, 28(12), 4104-4115.

- ✓ Huang, J., & Manning, B. D. (2009). A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochemical Society Transactions*, 37(1), 217-222.
- ✓ Huang, R., Xu, Y., Wan, W., Shou, X., Qian, J., You, Z., & Liu, W. (2015). Deacetylation of nuclear LC3 drives autophagy initiation under starvation. *Molecular cell*, 57(3), 456-466.
- ✓ Hughes, J. R. F. M., & Gorospe, W. C. (1991). Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology*, 129(5), 2415-2422.
- ✓ Hussein, M. R. (2005). Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Human reproduction update*, 11(2), 162-178.
- ✓ Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., & Guan, K. L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature cell biology*, 4(9), 648-657
- ✓ Inoki, K., Zhu, T., & Guan, K. L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, 115(5), 577-590.
- ✓ Islam, M., Nguyen, N. U. N., Diwan, A., & Rothermel, B. A. (2022). Autophagy in germ cells, stem cells, and induced pluripotent stem cells. In *Autophagy in Health and Disease* (pp. 99-111). Academic Press.
- ✓ Itakura, E., Kishi, C., Inoue, K., & Mizushima, N. (2008). Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Molecular biology of the cell*, 19(12), 5360-5372.
- ✓ Jantas, D., & Lasoń, W. (2021). Preclinical Evidence for the Interplay between Oxidative Stress and RIP1-Dependent Cell Death in Neurodegeneration: State of the Art and Possible Therapeutic Implications. *Antioxidants*, 10(10), 1518.
- ✓ Jolly, P. D., Tisdall, D. J., Heath, D. A., Lun, S., & McNatty, K. P. (1994). Apoptosis in bovine granulosa cells in relation to steroid synthesis, cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate response to follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and follicular atresia. *Biology of reproduction*, 51(5), 934-944.
- ✓ Joo, J. H., Wang, B., Frankel, E., Ge, L., Xu, L., Iyengar, R., & Kundu, M. (2016). The noncanonical role of ULK/ATG1 in ER-to-Golgi trafficking is essential for cellular homeostasis. *Molecular cell*, 62(4), 491-506.
- ✓ Jozwiak, J. (2006). Hamartin and tuberlin: working together for tumour suppression. *International journal of cancer*, 118(1), 1-5.
- ✓ Jung, C.H, Seung-Hyun, R., Jing, C., Otto, N.M., Do-Hyung Kim (2010) mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett.* 2010 April 2; 584(7): 1287–1295.
- ✓ Jung, M., Choi, H., & Mun, J. Y. (2019). The autophagy research in electron microscopy. *Applied Microscopy*, 49(1), 1-7.
- ✓ Jung, S., Jeong, H., & Yu, S. W. (2020). Autophagy as a decisive process for cell death. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(6), 921-930.
- ✓ Kageyama, S., Gudmundsson, S. R., Sou, Y. S., Ichimura, Y., Tamura, N., Kazuno, S., ... & Komatsu, M. (2021). p62/SQSTM1-droplet serves as a platform for autophagosome formation and anti-oxidative stress response. *Nature communications*, 12(1), 1-16.
- ✓ Kale, J., Osterlund, E. J., & Andrews, D. W. (2018). BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death & Differentiation*, 25(1), 65-80.
- ✓ Kang, R., Zeh, H. J., Lotze, M. T., & Tang, D. J. C. D. (2011). The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, 18(4), 571-580.
- ✓ Kang, W., Ishida, E., Yamatoya, K., Nakamura, A., Miyado, M., Miyamoto, Y., & Kawano, N. (2018). Autophagy- disrupted LC3 abundance leads to death of supporting cells of human oocytes. *Biochemistry and biophysics reports*, 15, 107-114.
- ✓ Karch, J., & Molkenin, J. D. (2015). Regulated necrotic cell death: the passive aggressive side of Bax and Bak. *Circulation research*, 116(11), 1800-1809.
- ✓ Katsuragi, Y., Ichimura, Y., & Komatsu, M. (2015). p62/SQSTM 1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. *The FEBS journal*, 282(24), 4672-4678.
- ✓ Ke, F. F., Vanyai, H. K., Cowan, A. D., Delbridge, A. R., Whitehead, L., Grabow, S., ... & Strasser, A. (2018). Embryogenesis and adult life in the absence of intrinsic apoptosis effectors BAX, BAK, and BOK. *Cell*, 173(5), 1217-1230.
- ✓ Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), 239.
- ✓ Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., & Guan, K. L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology*, 13(2), 132-141.
- ✓ Kim, J., Kim, Y. C., Fang, C., Russell, R. C., Kim, J. H., Fan, W., ... & Guan, K. L. (2013). Differential

- regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. *Cell*, 152(1-2), 290-303.
- ✓ Kim, S. Y., & Kurita, T. (2018). New insights into the role of phosphoinositide 3-kinase activity in the physiology of immature oocytes: lessons from recent mouse model studies. *European Medical Journal. Reproductive health*, 3(2), 119.
 - ✓ Kim, E. H., Wong, S. W., & Martinez, J. (2019). Programmed necrosis and disease: we interrupt your regular programming to bring you necroinflammation. *Cell Death & Differentiation*, 26(1), 25-40.
 - ✓ Kim, E., Lee, D. M., Seo, M. J., Lee, H. J., & Choi, K. S. (2021). Intracellular Ca²⁺ imbalance critically contributes to paraptosis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 607844.
 - ✓ King, K. E., Losier, T. T., & Russell, R. C. (2021). Regulation of autophagy enzymes by nutrient signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, 46(8), 687-700.
 - ✓ Kirkin, V., & Rogov, V. V. (2019). A diversity of selective autophagy receptors determines the specificity of the autophagy pathway. *Molecular cell*, 76(2), 268-285.
 - ✓ Kishi-Itakura, C., Koyama-Honda, I., Itakura, E., & Mizushima, N. (2014). Ultrastructural analysis of autophagosome organization using mammalian autophagy-deficient cells. *J Cell Sci*, 127(18), 4089-4102.
 - ✓ Kitada, M., & Koya, D. (2021). Autophagy in metabolic disease and ageing. *Nature Reviews Endocrinology*, 17(11), 647-661.
 - ✓ Klionsky, D. J., Petroni, G., Amaravadi, R. K., Baehrecke, E. H., Ballabio, A., Boya, P., ... & Pietrocola, F. (2021). Autophagy in major human diseases. *The EMBO journal*, 40(19), e108863.
 - ✓ Klionsky, D. J., Abdel-Aziz, A. K., Abdelfatah, S., Abdellatif, M., Abdoli, A., Abel, S., ... & Bartek, J. (2021). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *autophagy*, 17(1), 1-382.
 - ✓ Kopitz, J., Kisen, G. O., Gordon, P. B., Bohley, P., & Seglen, P. O. (1990). Nonselective autophagy of cytosolic enzymes by isolated rat hepatocytes. *Journal of Cell Biology*, 111(3), 941-953.
 - ✓ Kosta, A., Roisin-Bouffay, C., Luciani, M. F., Otto, G. P., Kessin, R. H., & Golstein, P. (2004). Autophagy gene disruption reveals a non-vacuolar cell death pathway in Dictyostelium. *Journal of Biological Chemistry*, 279(46), 48404-48409.
 - ✓ Koukourakis, M. I., Kalamida, D., Giatromanolaki, A., Zois, C. E., Sivridis, E., Pouliliou, S., ... & Harris, A. L. (2015). Autophagosome proteins LC3A, LC3B and LC3C have distinct subcellular distribution kinetics and expression in cancer cell lines. *PloS one*, 10(9), e0137675.
 - ✓ Kovasc, J., Forgó, V., & Péczely, P. (1992). The fine structure of the follicular cells in growing and atretic ovarian follicles of the domestic goose. *Cell and tissue research*, 267(3), 561-569.
 - ✓ Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., ... & Melino, G. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death & differentiation*, 16(1), 3-11.
 - ✓ Kulbay, M., Bernier-Parker, N., & Bernier, J. (2021). The role of the DFF40/CAD endonuclease in genomic stability. *Apoptosis*, 1-15.
 - ✓ Lai, M., Zou, W., Han, Z., Zhou, L., Qiu, Z., Chen, J., ... & Bai, X. (2021). Tsc1 regulates tight junction independent of mTORC1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(30).
 - ✓ Lamark, T., Svenning, S., & Johansen, T. (2017). Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm. *Essays in biochemistry*, 61(6), 609-624.
 - ✓ Lamark, T., & Johansen, T. (2021). Mechanisms of selective autophagy. *Annual review of cell and developmental biology*, 37, 143-169.
 - ✓ Lee, E. B., Chakravarthi, V. P., Wolfe, M. W., & Rumi, M. K. (2021). ER β regulation of gonadotropin responses during folliculogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10348.
 - ✓ Leoni, G. G., Palmerini, M. G., Satta, V., Succu, S., Pasciu, V., Zinellu, A., ... & Berlinguer, F. (2015). Differences in the kinetic of the first meiotic division and in active mitochondrial distribution between prepubertal and adult oocytes mirror differences in their developmental competence in a sheep model. *PloS one*, 10(4), e0124911.
 - ✓ Levine, B., & Yuan, J. (2006). Autophagy in cell death: an innocent convict?. *The Journal of clinical investigation*, 116(12), 3293-3293.
 - ✓ Li, X., He, S., & Ma, B. (2020). Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Molecular cancer*, 19(1), 1-16.
 - ✓ Licheva, M., Raman, B., Kraft, C., & Reggiori, F. (2022). Phosphoregulation of the autophagy machinery by kinases and phosphatases. *Autophagy*, 18(1), 104-123.
 - ✓ Lin, F. H., Zhang, W. L., Li, H., Tian, X. D., Zhang, J., Li, X., ... & Tan, J. H. (2018). Role of autophagy in modulating post-maturation aging of mouse oocytes. *Cell death & disease*, 9(3), 1-12.
 - ✓ Liu, X., Xie, X., Ren, Y., Shao, Z., Zhang, N., Li, L., ... & Zhang, L. (2021). The role of necroptosis in

- disease and treatment. *MedComm*, 2(4), 730-755.
- ✓ Lőrincz, P., & Juhász, G. (2020). Autophagosome-lysosome fusion. *Journal of molecular biology*, 432(8), 2462-2482.
 - ✓ Lübke, T., Lobel, P., & Sleat, D. E. (2009). Proteomics of the lysosome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1793(4), 625-635.
 - ✓ Luke, J. J., Van de Wetering, C. I., & Knudson, C. M. (2003). Lymphoma development in Bax transgenic mice is inhibited by Bcl-2 and associated with chromosomal instability. *Cell Death & Differentiation*, 10(6), 740-748.
 - ✓ Luo, X., O'Neill, K. L., & Huang, K. (2020). The third model of Bax/Bak activation: a Bcl-2 family feud finally resolved?. *F1000Research*, 9.
 - ✓ Mailler, E., Guardia, C. M., Bai, X., Jarnik, M., Williamson, C. D., Li, Y., ... & Bonifacino, J. S. (2021). The autophagy protein ATG9A enables lipid mobilization from lipid droplets. *Nature communications*, 12(1), 1-19.
 - ✓ Mandal, R., Barrón, J. C., Kostova, I., Becker, S., & Strebhardt, K. (2020). Caspase-8: The double-edged sword. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1873(2), 188357.
 - ✓ Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 129(7), 1261-1274.
 - ✓ Martínez-Escardó, L., Alemany, M., Sánchez-Osuna, M., Sánchez-Chardi, A., Roig-Martínez, M., Suárez-García, S., ... & Yuste, V. J. (2021). Gossypol Treatment Restores Insufficient Apoptotic Function of DFF40/CAD in Human Glioblastoma Cells. *Cancers*, 13(21), 5579.
 - ✓ Matsuda, F., Inoue, N., Manabe, N., & Ohkura, S. (2012). Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *Journal of Reproduction and Development*, 58(1), 44-50.
 - ✓ McEvoy, M. J., Sinderewicz, E., Creedon, L., McAfee, M., Jonczyk, A. W., Piotrowska-Tomala, K. K., & Skarzynski, D. J. (2021). Death processes in bovine theca and granulosa cells modelled and analysed using a systems biology approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4888.
 - ✓ McGee, E. A., & Hsueh, A. J. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine reviews*, 21(2), 200-21.
 - ✓ McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(4), a008656.
 - ✓ Mebratu, Y., & Tesfagzi, Y. (2009). How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer?. *Cell cycle*, 8(8), 1168-1175.
 - ✓ Medema, J. P., Scaffidi, C., Kischkel, F. C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P. H., & Peter, M. E. (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *The EMBO journal*, 16(10), 2794-2804.
 - ✓ Mendoza, M. C., Er, E. E., & Blenis, J. (2011). The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends in biochemical sciences*, 36(6), 320-328.
 - ✓ Meng, L., Jan, S. Z., Hamer, G., van Pelt, A. M., van der Stelt, I., Keijer, J., & Teerds, K. J. (2018). Preantral follicular atresia occurs mainly through autophagy, while antral follicles degenerate mostly through apoptosis. *Biology of reproduction*, 99(4), 853-863.
 - ✓ Meng, L., Jan, S. Z., Hamer, G., van Pelt, A. M., van der Stelt, I., Keijer, J., & Teerds, K. J. (2018). Preantral follicular atresia occurs mainly through autophagy, while antral follicles degenerate mostly through apoptosis. *Biology of reproduction*, 99(4), 853-863.
 - ✓ Menon, M. B., & Dhamija, S. (2018). Beclin 1 phosphorylation—at the center of autophagy regulation. *Frontiers in cell and developmental biology*, 6, 137.
 - ✓ Metlagel, Z., Otomo, C., Takaesu, G., & Otomo, T. (2013). Structural basis of ATG3 recognition by the autophagic ubiquitin-like protein ATG12. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(47), 18844-18849.
 - ✓ Monget, P., & Monniaux, D. (2019). Les réserves ovariennes. *Médecine de la Reproduction*, 21(2), 127-135.
 - ✓ Monniaux, D., Cadoret, V., Clément, F., Dalbès-Tran, R., Elis, S., Fabre, S., Maillard, V., Monget, P., & Uzbekova, S. (2019). Folliculogenesis. Chapter in *Encyclopedia of endocrine diseases Vol. II*. Second edition. Academic Press. Pag: 377-398.
 - ✓ Moura, M. T., Latorraca, L. B., & Paula-Lopes, F. F. (2021). Contextualizing Autophagy during Gametogenesis and Preimplantation Embryonic Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6313.
 - ✓ Nguyen, N., Shteyn, V., & Melia, T. J. (2017). Sensing membrane curvature in macroautophagy. *Journal of molecular biology*, 429(4), 457-472.

- ✓ Noda, N. N. (2021). Atg2 and Atg9: Intermembrane and interleaflet lipid transporters driving autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1866(8), 158956.
- ✓ Onishi, M., Yamano, K., Sato, M., Matsuda, N., & Okamoto, K. (2021). Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy. *The EMBO journal*, 40(3), e104705.
- ✓ Ortiz, R., Echeverria, O. M., Salgado, R., Escobar, M. L., & Vazquez-Nin, G. H. (2006). Fine structural and cytochemical analysis of the processes of cell death of oocytes in atretic follicles in new born and prepubertal rats. *Apoptosis*, 11(1), 25-37.
- ✓ Özdemir, A., İbiboğlu, B., Demir, Y. D. Ş., Benhür, E., Valipour, F., & Ark, M. (2021). A novel proteolytic cleavage of ROCK 1 in cell death: Not only by caspases 3 and 7 but also by caspase 2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 547, 118-124.
- ✓ Palikaras, K., Lionaki, E., & Tavernarakis, N. (2018). Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology. *Nature cell biology*, 20(9), 1013-1022.
- ✓ Park, N. Y., Jo, D. S., & Cho, D. H. (2022). Post-Translational Modifications of ATG4B in the Regulation of Autophagy. *Cells*, 11(8), 1330.
- ✓ Parrish, A. B., Freel, C. D., & Kornbluth, S. (2013). Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(6), a008672.
- ✓ Parzych, K. R., & Klionsky, D. J. (2014). An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants & redox signaling*, 20(3), 460-473.
- ✓ Perez, G. I., & Tilly, J. L. (1997). Cumulus cells are required for the increased apoptotic potential in oocytes of aged mice. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 12(12), 2781-2783.
- ✓ Peters, A. E., Caban, S. J., McLaughlin, E. A., Roman, S. D., Bromfield, E. G., Nixon, B., & Sutherland, J. M. (2021). The Impact of Aging on Macroautophagy in the Pre-ovulatory Mouse Oocyte. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9.
- ✓ Plant, T. M., & Zeleznik, A. J. (Eds.). (2014). *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. Academic Press.
- ✓ Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S., & Seger, R. (2011). The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(9), 1619-1633.
- ✓ Puente, C., Hendrickson, R. C., & Jiang, X. (2016). Nutrient-regulated phosphorylation of ATG13 inhibits starvation-induced autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 291(11), 6026-6035.
- ✓ Quirk, S. M., Cowan, R. G., Joshi, S. G., & Henrikson, K. P. (1995). Fas antigen-mediated apoptosis in human granulosa/luteal cells. *Biology of reproduction*, 52(2), 279-287.
- ✓ Reggiori, F., & Ungermann, C. (2017). Autophagosome maturation and fusion. *Journal of molecular biology*, 429(4), 486-496.
- ✓ Rehman, N. U., Zeng, P., Mo, Z., Guo, S., Liu, Y., Huang, Y., & Xie, Q. (2021). Conserved and diversified mechanism of autophagy between plants and animals upon various stresses. *Antioxidants*, 10(11), 1736.
- ✓ Rosner, M., Hanneder, M., Siegel, N., Valli, A., Fuchs, C., & Hengstschläger, M. (2008). The mTOR pathway and its role in human genetic diseases. *Mutation Research/reviews in Mutation Research*, 659(3), 284-292.
- ✓ Rosner, M., Siegel, N., Valli, A., Fuchs, C., & Hengstschläger, M. (2010). mTOR phosphorylated at S2448 binds to raptor and rictor. *Amino acids*, 38(1), 223-228.
- ✓ Roux, P. P., & Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiology and molecular biology reviews*, 68(2), 320-344.
- ✓ Rubinsztein, D. C., Codogno, P., & Levine, B. (2012). Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nature reviews Drug discovery*, 11(9), 709-730.
- ✓ Russell, R. C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H. W., Chang, Y. Y., Kim, J., ... & Guan, K. L. (2013). ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nature cell biology*, 15(7), 741-750.
- ✓ Rusten, T. E., Lindmo, K., Juhász, G., Sass, M., Seglen, P. O., Brech, A., & Stenmark, H. (2004). Programmed autophagy in the Drosophila fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K pathway. *Developmental cell*, 7(2), 179-192.
- ✓ SAGARPA (México). SENASICA [en línea]: NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. [fecha de consulta: 2020]. Disponible desde https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf
- ✓ Sangawa, A., Shintani, M., Yamao, N., & Kamoshida, S. (2014). Phosphorylation status of Akt and caspase-9 in gastric and colorectal carcinomas. *International journal of clinical and experimental*

- pathology*, 7(6), 3312.
- ✓ Santagostino, S. F., Assenmacher, C. A., Tarrant, J. C., Adedeji, A. O., & Radaelli, E. (2021). Mechanisms of regulated cell death: Current perspectives. *Veterinary Pathology*, 58(4), 596-623.
 - ✓ Sarkar, S., Floto, R. A., Berger, Z., Imarisio, S., Cordenier, A., Pasco, M., ... & Rubinsztein, D. C. (2005). Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *The Journal of cell biology*, 170(7), 1101-1111.
 - ✓ Sarkar, S., Ravikumar, B., Floto, R. A., & Rubinsztein, D. C. (2009). Rapamycin and mTOR-independent autophagy inducers ameliorate toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin and related proteinopathies. *Cell Death & Differentiation*, 16(1), 46-56.
 - ✓ Sarkar, S. (2013). Regulation of autophagy by mTOR-dependent and mTOR-independent pathways: autophagy dysfunction in neurodegenerative diseases and therapeutic application of autophagy enhancers. *Biochemical Society Transactions*, 41(5), 1103-1130.
 - ✓ Scheibye-Knudsen, M. (2013). Rapamycin: Current and Future Uses. In *Antitumor Potential and other Emerging Medicinal Properties of Natural Compounds* (pp. 239-247). Springer, Dordrecht.
 - ✓ Schwartz, L. M. (2021). Autophagic Cell Death During Development—Ancient and Mysterious. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 656370.
 - ✓ Schweichel, J. U., & Merker, H. J. (1973). The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*, 7(3), 253-266.
 - ✓ Scott, R. C., Schuldiner, O., & Neufeld, T. P. (2004). Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Developmental cell*, 7(2), 167-178.
 - ✓ Shefa, U., Jeong, N. Y., Song, I. O., Chung, H. J., Kim, D., Jung, J., & Huh, Y. (2019). Mitophagy links oxidative stress conditions and neurodegenerative diseases. *Neural regeneration research*, 14(5), 749.
 - ✓ Shen, X. H., Jin, Y. X., Liang, S., Kwon, J. W., Zhu, J. W., Lei, L., & Kim, N. H. (2018). Autophagy is required for proper meiosis of porcine oocytes maturing in vitro. *Scientific Reports*, 8(1), 1-12.
 - ✓ Shi, Z., Yuan, S., Shi, L., Li, J., Ning, G., Kong, X., & Feng, S. (2021). Programmed cell death in spinal cord injury pathogenesis and therapy. *Cell Proliferation*, 54(3), e12992.
 - ✓ Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C. B., & Tsujimoto, Y. (2004). Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nature cell biology*, 6(12), 1221-1228.
 - ✓ Shimobayashi, M., Hall, M.N. (2014). Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 15(3):155-62.
 - ✓ Shiozaki, E. N., & Shi, Y. (2004). Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. *Trends in biochemical sciences*, 29(9), 486-494.
 - ✓ Singh, R., Letai, A., & Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature reviews Molecular cell biology*, 20(3), 175-193.
 - ✓ Sobrido-Cameán, D., & Barreiro-Iglesias, A. (2018). Role of caspase-8 and Fas in cell death after spinal cord injury. *Frontiers in molecular neuroscience*, 11, 101.
 - ✓ Soliman, G. A., Acosta-Jaquez, H. A., Dunlop, E. A., Ekim, B., Maj, N. E., Tee, A. R., & Fingar, D. C. (2010). mTOR Ser-2481 autophosphorylation monitors mTORC-specific catalytic activity and clarifies rapamycin mechanism of action. *Journal of Biological Chemistry*, 285(11), 7866-7879.
 - ✓ Song, Z. H., Yu, H. Y., Wang, P., Mao, G. K., Liu, W. X., Li, M. N., ... & Sun, Q. Y. (2015). Germ cell-specific Atg7 knockout results in primary ovarian insufficiency in female mice. *Cell death & disease*, 6(1), e1589-e1589.
 - ✓ Song, S., Guo, Q., Zhu, Y., Yuan, P., Yan, Z., Yan, L., & Qiao, J. (2022). Exploring the role of autophagy during early human embryonic development through single-cell transcriptome and methylome analyses. *Science China Life Sciences*, 65(5), 940-952.
 - ✓ Stolz, A., Ernst, A., & Dikic, I. (2014). Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nature cell biology*, 16(6), 495-501.
 - ✓ Stolz, A., Putyrski, M., Kutle, I., Huber, J., Wang, C., Major, V., & Dikic, I. (2017). Fluorescence-based ATG 8 sensors monitor localization and function of LC 3/GABARAP proteins. *The EMBO journal*, 36(4), 549-564.
 - ✓ Strauss III, J. F., & Williams, C. J. (2019). Ovarian Life Cycle. In *Yen and Jaffe's reproductive endocrinology* (pp. 167-205).
 - ✓ Su, Z., Yang, Z., Xie, L., DeWitt, J. P., & Chen, Y. (2016). Cancer therapy in the necroptosis era. *Cell Death & Differentiation*, 23(5), 748-756.
 - ✓ Sukumaran, P., Nascimento Da Conceicao, V., Sun, Y., Ahamad, N., Saraiva, L. R., Selvaraj, S., & Singh, B. B. (2021). Calcium signaling regulates autophagy and apoptosis. *Cells*, 10(8), 2125.

- ✓ Sun, Y. C., Wang, Y. Y., Sun, X. F., Cheng, S. F., Li, L., Zhao, Y., ... & Chen, H. (2018). The role of autophagy during murine primordial follicle assembly. *Aging (Albany NY)*, 10(2), 197.
- ✓ Suzuki, H., Osawa, T., Fujioka, Y., & Noda, N. N. (2017). Structural biology of the core autophagy machinery. *Current opinion in structural biology*, 43, 10-17.
- ✓ Takahara, T., Amemiya, Y., Sugiyama, R., Maki, M., & Shibata, H. (2020). Amino acid-dependent control of mTORC1 signaling: A variety of regulatory modes. *Journal of biomedical science*, 27(1), 1-16.
- ✓ Takahashi, Y., Coppola, D., Matsushita, N., Cualing, H. D., Sun, M., Sato, Y., ... & Wang, H. G. (2007). Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nature cell biology*, 9(10), 1142-1151.
- ✓ Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., & Ohsumi, Y. (1992). Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *Journal of cell biology*, 119(2), 301-311.
- ✓ Tanida, I. (2011). Autophagy basics. *Microbiology and immunology*, 55(1), 1-11.
- ✓ Thapalia, B. A., Zhou, Z., & Lin, X. (2016). Sauchinone augments cardiomyocyte viability by enhancing autophagy proteins-PI3K, ERK (1/2), AMPK and Beclin-1 during early ischemia-reperfusion injury in vitro. *American Journal of Translational Research*, 8(7), 3251.
- ✓ Tilly, J. L., Kowalski, K. I., Johnson, A. L., & Hsueh, A. J. (1991). Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology*, 129(5), 2799-2801.
- ✓ Tilly, J. L. (1993). Ovarian follicular atresia: a model to study the mechanisms of physiological cell death. *Endocrinol. J.*, 1, 67-72.
- ✓ Tilly, J. L. (2001). Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2(11), 838-848.
- ✓ Tingen, C. M., Bristol-Gould, S. K., Kiesewetter, S. E., Wellington, J. T., Shea, L., & Woodruff, T. K. (2009). Prepubertal primordial follicle loss in mice is not due to classical apoptotic pathways. *Biology of Reproduction*, 81(1), 16-25.
- ✓ Tomasoni, R., & Mondino, A. (2011). The tuberous sclerosis complex: balancing proliferation and survival. *Biochemical Society transactions*, 39(2), 466-471.
- ✓ Torres-Ramírez, N., Escobar, M. L., Vázquez-Nin, G. H., Ortiz, R., & Echeverría, O. M. (2016). Paraptosis-like cell death in Wistar rat granulosa cells. *Development, growth & differentiation*, 58(8), 651-663.
- ✓ Tsukamoto, S., Kuma, A., Murakami, M., Kishi, C., Yamamoto, A., & Mizushima, N. (2008). Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. *Science*, 321(5885), 117-120.
- ✓ Ueno, T., & Komatsu, M. (2020). Monitoring autophagy flux and activity: principles and applications. *Bioessays*, 42(11), 2000122.
- ✓ Van Opdenbosch, N., & Lamkanfi, M. (2019). Caspases in cell death, inflammation, and disease. *Immunity*, 50(6), 1352-1364.
- ✓ Vazquez-Nin, G. H., & Sotelo, J. R. (1967). Electron microscope study of the atretic oocytes of the rat. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 80(4), 518-533.
- ✓ Vizza, D., Perri, A., Toteda, G., Lupinacci, S., Perrotta, I., Lofaro, D., ... & Bonfiglio, R. (2018). Rapamycin-induced autophagy protects proximal tubular renal cells against proteinuric damage through the transcriptional activation of the nerve growth factor receptor NGFR. *Autophagy*, 14(6), 1028-1042.
- ✓ Wang, J., Whiteman, M. W., Lian, H., Wang, G., Singh, A., Huang, D., & Denmark, T. (2009). A non-canonical MEK/ERK signaling pathway regulates autophagy via regulating Beclin 1. *Journal of Biological Chemistry*, 284(32), 21412-21424.
- ✓ Wang, W., Liu, H. L., Tian, W., Zhang, F. F., Gong, Y., Chen, J. W., ... & Shi, F. X. (2010). Morphologic observation and classification criteria of atretic follicles in guinea pigs. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 11(5), 307-314.
- ✓ Wang, Y. Y., Sun, Y. C., Sun, X. F., Cheng, S. F., Li, B., Zhang, X. F., ... & Shen, W. (2017). Starvation at birth impairs germ cell cyst breakdown and increases autophagy and apoptosis in mouse oocytes. *Cell death & disease*, 8(2), e2613-e2613.
- ✓ Wang, H., Lu, Q., Cheng, S., Wang, X., & Zhang, H. (2013). Autophagy activity contributes to programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Autophagy*, 9(12), 1975-1982.
- ✓ Wang, L., Ye, X., & Zhao, T. (2019). The physiological roles of autophagy in the mammalian life cycle. *Biological Reviews*, 94(2), 503-516.
- ✓ Wang, X. L., Feng, S. T., Wang, Y. T., Yuan, Y. H., Li, Z. P., Chen, N. H., ... & Zhang, Y. (2021).

- Mitophagy, a form of selective autophagy, plays an essential role in mitochondrial dynamics of parkinson's disease. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 1-19.
- ✓ Wauson, E. M., Dbouk, H. A., Ghosh, A. B., & Cobb, M. H. (2014). G protein-coupled receptors and the regulation of autophagy. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 25(5), 274-282.
 - ✓ Weber, J. J., Pereira Sena, P., Singer, E., & Nguyen, H. P. (2019). Killing two angry birds with one stone: autophagy activation by inhibiting calpains in neurodegenerative diseases and beyond. *BioMed Research International*, 2019.
 - ✓ Weikel, K. A., Cacicedo, J. M., Ruderman, N. B., & Ido, Y. (2015). Glucose and palmitate uncouple AMPK from autophagy in human aortic endothelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 308(3), C249-C263.
 - ✓ Wilkinson, J. C., Wilkinson, A. S., Scott, F. L., Csomos, R. A., Salvesen, G. S., & Duckett, C. S. (2004). Neutralization of Smac/Diablo by inhibitors of apoptosis (IAPs): A caspase-independent mechanism for apoptotic inhibition. *Journal of biological chemistry*, 279(49), 51082-51090.
 - ✓ Williams, R. S., Cheng, L., Mudge, A. W., & Harwood, A. J. (2002). A common mechanism of action for three mood-stabilizing drugs. *Nature*, 417(6886), 292-295.
 - ✓ Williams, A., Sarkar, S., Cuddon, P., Ttofi, E. K., Saiki, S., Siddiqi, F. H., & Rubinsztein, D. C. (2008). Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nature chemical biology*, 4(5), 295-305.
 - ✓ Winter, J. N., Jefferson, L. S., & Kimball, S. R. (2011). ERK and Akt signaling pathways function through parallel mechanisms to promote mTORC1 signaling. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 300(5), C1172-C1180.
 - ✓ Wolf, B. B., Schuler, M., Echeverri, F., & Green, D. R. (1999). Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated DNase inactivation. *Journal of Biological Chemistry*, 274(43), 30651-30656.
 - ✓ Xu, J., Su, S. M., Zhang, X., Chan, U. I., Adhav, R., Shu, X., ... & Xu, X. (2022). ATP11B inhibits breast cancer metastasis in a mouse model by suppressing externalization of nonapoptotic phosphatidylserine. *The Journal of clinical investigation*, 132(5).
 - ✓ Yamamoto, A., Mizushima, N., & Tsukamoto, S. (2014). Fertilization-induced autophagy in mouse embryos is independent of mTORC1. *Biology of reproduction*, 91(1), 7-1.
 - ✓ Yan, Y., Mukherjee, S., Harikumar, K. G., Strutzenberg, T. S., Zhou, X. E., Suino-Powell, K., ... & Melcher, K. (2021). Structure of an AMPK complex in an inactive, ATP-bound state. *Science*, 373(6553), 413-419.
 - ✓ Yazid, M. D., & Hung-Chih, C. (2021). Perturbation of PI3K/Akt signaling affected autophagy modulation in dystrophin-deficient myoblasts. *Cell Communication and Signaling*, 19(1), 1-20.
 - ✓ Yin, Z., Pascual, C., & Klionsky, D. J. (2016). Autophagy: machinery and regulation. *Microbial cell*, 3(12), 588.
 - ✓ Yin, S., Liu, L., & Gan, W. (2021). The Roles of Post-Translational Modifications on mTOR Signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1784.
 - ✓ Yu, J., Zhong, B., & Chen, X. (2020). Induction of programmed necrosis by phytochemicals in colorectal cancer. In *Drug Resistance in Colorectal Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies* (pp. 117-133). Academic Press.
 - ✓ Yun, H. R., Jo, Y. H., Kim, J., Shin, Y., Kim, S. S., & Choi, T. G. (2020). Roles of autophagy in oxidative stress. *International journal of molecular sciences*, 21(9), 3289.
 - ✓ Yuan, Z., Wang, S., Tan, X., & Wang, D. (2022). New Insights into the Mechanisms of Chaperon-Mediated Autophagy and Implications for Kidney Diseases. *Cells*, 11(3), 406.
 - ✓ Zachari, M., & Ganley, I. G. (2017). The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. *Essays in biochemistry*, 61(6), 585-596.
 - ✓ Zaffagnini, G., & Martens, S. (2016). Mechanisms of selective autophagy. *Journal of molecular biology*, 428(9), 1714-1724.
 - ✓ Zhang, L., Yu, J., Pan, H., Hu, P., Hao, Y., Cai, W., ... & Yuan, J. (2007). Small molecule regulators of autophagy identified by an image-based high-throughput screen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(48), 19023-19028.
 - ✓ Zhang, X. J., Chen, S., Huang, K. X., & Le, W. D. (2013). Why should autophagic flux be assessed?. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(5), 595-599.
 - ✓ Zhang, X., Dowling, J. P., & Zhang, J. (2019). RIPK1 can mediate apoptosis in addition to necroptosis during embryonic development. *Cell death & disease*, 10(3), 1-11.
 - ✓ Zhang, T., He, M., Zhao, L., Qin, S., Zhu, Z., Du, X., Zhou, B., Yang, Y., Liu, X., Xia, G., Chen, T., Wang, Y., Zhang, H., & Wang, C. (2021). HDAC6 regulates primordial follicle activation through mTOR signaling pathway. *Cell Death Dis* 12, 559.

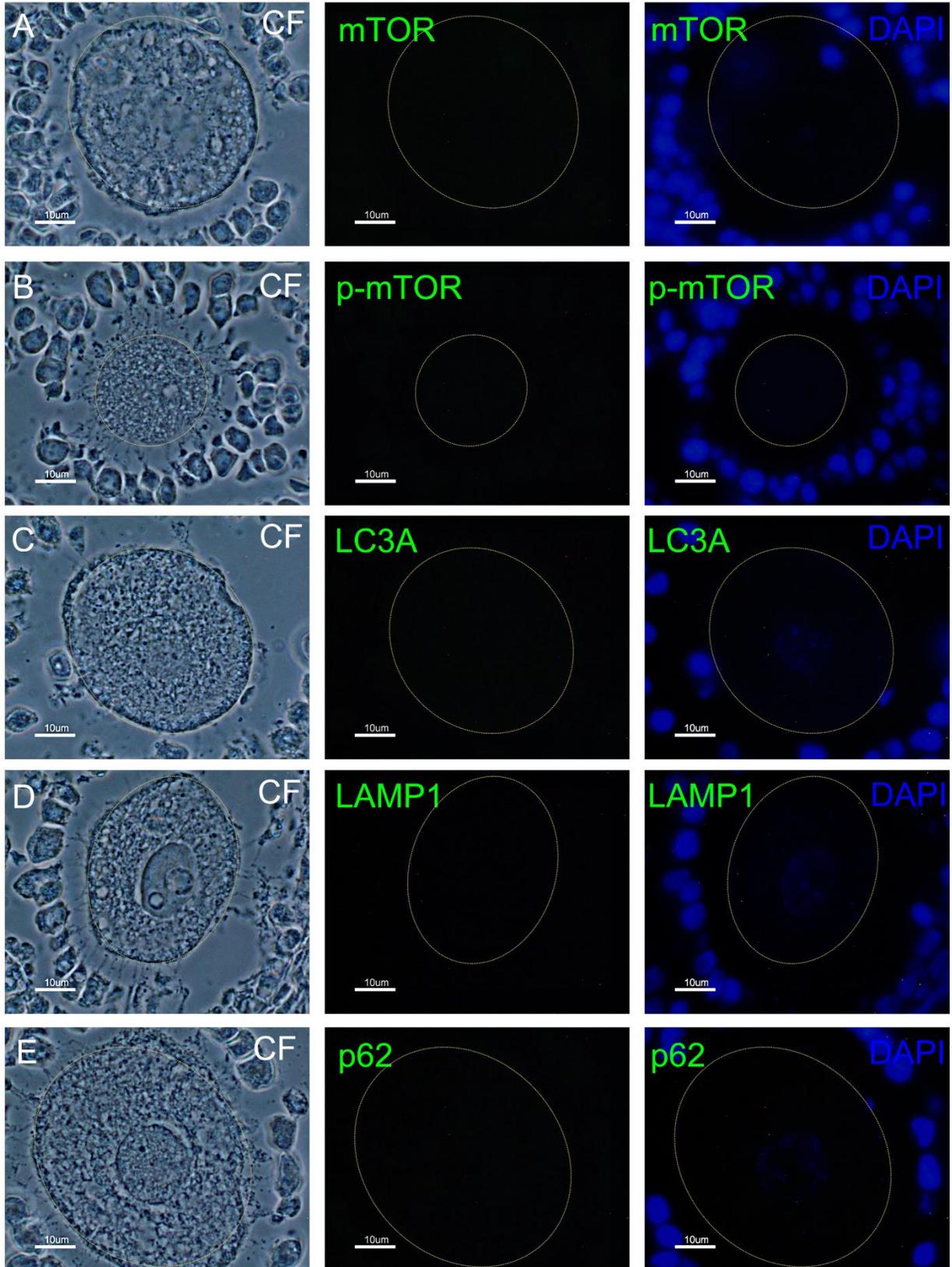
- ✓ Zhong, Y., Wang, Q. J., Li, X., Yan, Y., Backer, J. M., Chait, B. T., & Yue, Z. (2009). Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1–phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nature cell biology*, 11(4), 468-476.
- ✓ Zou, Z., Tao, T., Li, H., & Zhu, X. (2020). mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: progress and challenges. *Cell & bioscience*, 10(1), 1-11.

ANEXOS

Anexo 1 Anticuerpos utilizados para Inmunohistoquímica (IHQ) y Western Blot (WB)

	Especies hospedadoras	Proveedor/ Catálogo	Lote	Ensayo/Dilución
Anticuerpos primarios				
Cocktail AKT/MAPK	Conejo	Abcam, Cat: ab151279	GR3231384	WB 1:250
Anti- ATG4B	Conejo, monoclonal	Sigma Aldrich, Cat: A2981	089M4802V	WB 1:1500
Anti-ATG14	Conejo, policlonal	Sigma Aldrich, Cat: SAB3500814	70431201	WB 1:1000
Anti-BECN1	Ratón, monoclonal	Abcam, Cat: ab114071	GR289434-1	IHQ 1:50; WB 1:1000
Anti- mTOR	Conejo, monoclonal	Abcam, Cat: ab32028	GR245538-16	IHQ 1:50; WB 1:2500
Anti- p-mTOR Ser2448	Conejo, policlonal	Abcam, Cat: ab84400	GR306782-1	IHQ: 1:50; WB 1:1000
Anti- LAMP1	Conejo, policlonal	Abcam, Cat: ab24170	GR127403-1	IHQ 1:100; WB 1:1000
Anti- LC3A	Ratón, monoclonal	Abcam, Cat: ab168803	GR3187649-9	IHQ 1:100; WB 1:1000
Anti- P62/SQSTM1	Conejo, policlonal	Abcam, Cat: ab155686	GR199733-33	IHQ 1:50; WB 1:1500
Anti-GADPH	Conejo, policlonal	Merck Millipore, ABS16	2625354	WB 1:10,000
Anticuerpos secundarios				
AlexaFluor 488	Conejo, IgG	Invitrogen	764842	IHQ 1:200
AlexaFluor 594	Ratón, IgG	Invitrogen		IHQ 1:200
Estreptavidina acoplada a Rojo Texas		NEN Life science products, Inc. NEL721	194245	IHQ 1:200
Anticuerpo con peroxidasa	Conejo, IgG	Jackson ImmunoResearch	70380	WB 1:10,000
Anticuerpo con peroxidasa	Ratón, IgG	Jackson ImmunoResearch		WB 1:10,000

Anexo 2. Control negativo sin anticuerpo primario en ovocitos de ovario de rata de 19 días. Inmunodetección negativa de las proteínas autofágicas mTOR (A), p-mTOR (B), LC3A (C), LAMP1 (D), p62 (E). CF: imágenes en contraste de fase. Las líneas punteadas indican un ovocito. Núcleo (DAPI). Barra de escala: 10 μ m.



Anexo 3. Membrana con proteínas totales de ovocitos 19 y 28 días de edad. Se muestra un ejemplo de la membrana de PVDF que se utilizó para los ensayos *Western Blot*. Contiene proteínas totales de ovocitos de 19 y 28 días de edad y el marcador de peso molecular (MPM). Tinción Rojo Ponceau.

