



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Estudio inmunohistoquímico de las proteínas
TSC1/2 en ovocitos de folículos atrésicos en
ovarios de rata de 19 y 28 días.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
BIÓLOGO**

P R E S E N T A

BRANDON DANIEL DÍAZ PÉREZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA: MARÍA LUISA ESCOBAR SÁNCHEZ

2023

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX.





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.

Hoja de datos del jurado.

1. Datos del alumno.

Díaz

Pérez

Brandon Daniel

5577520833

Universidad Nacional Autónoma de México.

Facultad de Ciencias

Biología

314048587

2. Datos del asesor.

Dra.

María Luisa

Escobar

Sánchez

3. Datos del sinodal 1.

Dra.

Sandra

Cabrera

Benítez

4. Datos del sinodal 2.

Dr.

Hugo

López

Muñoz

5. Datos del sinodal 4.

Dra.

Lourdes

Agredano

Moreno

6. Datos del sinodal 5.

M. en C.

Miguel Angel

Palomino

Garibay

7. Datos del trabajo escrito

Estudio inmunohistoquímico de las proteínas TSC1/2 en ovocitos de folículos atrésicos en ovarios de rata de 19 y 28 días

85p

2023

Agradecimientos institucionales.

A la Universidad por brindarme la oportunidad de pertenecer a esta casa.

A la beca como ayudante de Investigador Emérito Dr. Gerardo H. Vázquez Nin con una duración del 01 de febrero del 2020 al 31 de marzo del 2022.

El trabajo experimental fue financiado por PAPIIT IN215922 y PAPIIT IA204723.

La investigación se realizó bajo la tutoría de la Dra. Ma. Luisa Escobar Sánchez Gracias Dra. por su paciencia, comprensión y su gran ayuda.

A la Dra. Olga M. Echeverría Martínez y al Dr. Gerardo H. Vázquez Nin, por aceptarme en su taller y permitirme trabajar en su laboratorio, gracias por sus explicaciones de los temas en biología molecular, por compartir sus conocimientos conmigo, por todas las correcciones hechas.

A la Dra. Rosario Ortiz, por su asistencia técnica en el laboratorio.

A la Dra. Nayeli Torres Ramírez, por su apoyo y la asistencia técnica en el laboratorio.

A la Maestra. Silvia Juárez por la asistencia técnica en el laboratorio.

Al Dr. Israel Muñoz Velasco por su asistencia técnica durante los experimentos realizados en el laboratorio.

Agradecimientos.

Gracias, querida Madre. Te quiero muchísimo, te amo, gracias por siempre apoyarme y ofrecerme lo mejor, gracias por ayudarme tanto, he sido bendecido al ser tu hijo y estar contigo 🎵*You Give Me Life*🎵

Gracias abuelita Mari por ser un gran soporte para mí, por sus infinitas muestras de cariño, por su apoyo incondicional para todo, gracias a mis abues, por brindarme siempre su ayuda, los amo mucho a los dos.

Gracias a mi tía Sara, gracias por ser mi maestra, por acompañarme, te quiero mucho y te respeto por el cariño y lo buena persona que eres, en especial conmigo.

Gracias a mi tía Elsa por estar cuando te necesitaba, espero siempre contar contigo.

Gracias a mi papá Ray, por estar y quererme mucho, siempre me he sentido querido por ti.

Gracias a mi primo Santi y a mis primas Bere y Naomi por las risas y todos esos momentos, los quiero y aprecio mucho y también a sus pequeñas, Valeria bonita y mi niña Isabella.

Gracias Waldo por ser mi amigo, gracias por tu compañía durante todo este tiempo, porque siempre estaremos cuando nos hagamos falta, gracias por ser tú. $\sim\exists(x)(H(x)\wedge I(x))$

Gracias Miguel, por siempre tener un buen consejo, un chiste, una buena platica, eres especial querido hermano mío.

Gracias Ivonne por ser tan chida como amiga, gracias por la diversión, las palabras, las anécdotas, por tu genial compañía.

Gracias Ana M., por tu sutileza, tu compañía que siempre es grata, gracias por tu forma tan bonita y pacífica de ser.

Gracias a Luna y Estrella, su amistad, los momentos y la honestidad que me dieron son invaluable.

Gracias a Fer, Marla, Angie, Cora, Regina y Selva, con ustedes la vida siempre es más divertida.

Gracias Samuel por las herramientas, sin tu ayuda no sabría que habría sido de mí.

Gracias a mis profes Héctor, Luis y Ángeles, por la motivación y la forma tan noble de entrenar.

Gracias a Zilonet, José, Edgar, Edu, Gabi, Eli, Luis, Gsus, Sebas, Daf e Isra, gracias por todo lo que hemos compartido.

Gracias a La Dra Aime y a su amable grupo, por las habilidades tan útiles que me enseñaron.

Gracias a Lindsey, Derek, Phil, Andy, Neil y Richard, aprendí mucho gracias a cada uno de ustedes.

Gracias Abraham, te mando un abrazo en donde estes.

Gracias a todos esos compañeritos con los que compartí palabras, comidas, aventuras, tareas, exámenes, desveladas, fiestas etc., todos aquellos momentos fueron diversos, interesantes, por momentos intensos y divertidos.

Gracias a cada uno de ustedes por ser tan buenos conmigo. Gracias por su gran ayuda para con todo.

Gracias a la vida, a las oportunidades, las lecciones y a esos momentos que nos hacen vulnerables, pero también fuertes.

*Nadie ni nada en este mundo
Vive para siempre.*

*Pero solo a nosotros se nos concedió
Saber que debemos morir.*

Y ese es un gran don.

*Esta vida, que es nuestro tormento
y nuestro tesoro, no dura para siempre.*

Es una ola en el mar.

*¿Obligarías al mar a que se quedara quieto
para salvar una ola?
¿Para salvarte a ti mismo?*

Cuentos de terramar.

*Following the light of early stars.
So dark in the night.
Whistling the melody of my life.
Sitting in front of the fire.
Warm memory - Human Tetris.*

*La máxima expresión creativa de un ser humano es ser capaz de crear algo nuevo al enfrentar la
adversidad y mientras mayor sea la adversidad mayor es la oportunidad. P.S.*

Para Begonia Díaz Pérez, Te amo, Gracias por ser la mejor.

Índice.

I. Resumen	8
II. Abreviaturas.....	9
III. Introducción.....	13
1. Autofagia.....	13
1.1. Microautofagia.....	14
1.2. Autofagia mediada por chaperonas (CMA).....	15
1.3. Macroautofagia.....	15
2. Autofagia como muerte celular.....	17
3. Características morfológicas y ultraestructurales de la autofagia.....	18
4. Características bioquímicas de la autofagia.....	19
4.1. El complejo de proteína quinasa ULK1-Atg13-FIP200-Atg101.....	22
4.2. El complejo PtdIns3K clase III que contiene las proteínas centrales Pik3c3/VPS34, PIK3R4/VPS15, BECN1/Beclina 1 y Atg14.....	23
4.3. Complejo WIPI (1,2,3 y 4) de unión a PtdIns3P.....	25
4.4. La proteína transmembrana de extensión múltiple Atg9L1.....	26
4.5. El sistema Atg12-Atg5-Atg16L1.....	27
4.6. el sistema de conjugación Atg8/LC3 similar a ubiquitina.....	28
5. Rutas de señalización de la autofagia.....	30
5.1. mTOR.....	30
5.2. AMPK.....	31
5.3. TSC1/2.....	32
5.4. AKT/PBK.....	34
6. Ovario.....	36
6.1. Atresia folicular.....	40
IV. Antecedentes	41
V. Planteamiento del problema.....	42
VI. Hipótesis.....	42
VII. Objetivos.....	42
VIII. Material y métodos.....	43
i. Procesamiento del material biológico para microscopía óptica.....	43
ii. Tinción Hematoxilina-Eosina.....	43
iii. Inmunolocalización a nivel de microscopía de fluorescencia de BECN1, LC3A, mTORpS2448, TSC1, TSC2, ULK1-555 y ULK1-757.....	44

iv. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia.....	46
IX. Resultados.....	47
X. Análisis de resultados.	71
XI. Conclusiones.	72
XII. Bibliografía.	73

Resumen

La autofagia es un proceso fisiológico conservado por la evolución, en el cual se realiza el reciclaje de constituyentes celulares. La limitación de nutrientes o la supresión de factores de crecimiento pueden desencadenar la autofagia. Cuando los estímulos proautofágicos persisten, la tasa de reciclamiento celular es elevada, por lo que la célula puede ser conducida hacia la muerte celular programada por autofagia. La autofagia como vía de eliminación celular ha sido documentada en el ovario de mamíferos como una vía de muerte de los ovocitos atresicos. La regulación clásica de la autofagia se rige por la vía de mTOR, la que, en condiciones ricas en nutrientes y factores de crecimiento, fosforila a ULK1 para inhibir a la autofagia. Se conoce que en condiciones de inanición mTOR deja de fosforilar a ULK1, incrementando así la tasa de formación de autofagosomas. Adicionalmente, Beclina 1 participa en la creación de la vesícula autofágica, mientras que la elongación y el cierre está determinado por el reclutamiento de LC3. Actualmente se sabe que mTOR puede estar influenciada de forma indirecta por otras proteínas que se activan bajo condiciones de estrés, unas de estas proteínas son las que conforman el complejo TSC1/2. Aunque el papel de la autofagia como medio de eliminación de las células germinales en ovario de rata Wistar ha sido documentada, existen varias rutas de activación del evento que no han sido completamente analizadas, tal es el caso de las proteínas TSC1 y TSC2. En el presente trabajo, se analizó la presencia de TSC1 y TSC2 en ovocitos de ovarios de ratas de 19 y 28 días de edad, los cuales fueron procesados para poder realizar cortes seriados y posteriormente hacer tinciones con hematoxilina y eosina, así como la inmunodetección de las proteínas mTORp (S2448), ULK1 (S555 y S757), BECN1, LC3A, TSC1 y TSC2. Los resultados con la tinción hematoxilina y eosina permitieron identificar folículos normales, así como atresicos. En los folículos atresicos se identificaron ovocitos con características morfológicas de apoptosis y con vesículas claras sugiriendo un evento autofágico. La inmunodetección de las proteínas BECN1 y LC3A, permitió definir ovocitos en vía de eliminación por autofagia; ya que presentaron una marca positiva a las proteínas en cantidades significativamente mayores. La inmunodetección de las proteínas de mTORp (S2448) y ULK1p (S757), permitió identificar a los ovocitos que se encontraban en condiciones altas de nutrientes, adicionalmente, la marca correspondiente a la presencia de la proteína ULK1p (S555), indica que la autofagia está relacionada con una disminución de la disposición de nutrientes, ya que se detectó una marca positiva significativamente mayor en los ovocitos autofágicos. Lo anterior fue reforzado por los resultados de las inmunolocalizaciones de las proteínas TSC1 y TSC2. En particular, se observó un incremento en la marca de TSC2 en los ovocitos autofágicos, lo que sugiere que podría estar influyendo sobre la actividad de mTOR para promover la ruta de la autofagia. En conclusión, todos estos resultados sugieren que la autofagia en los ovocitos de folículos atresicos de ovarios de rata Wistar de 19 y 28 días de edad, puede estar influenciada por el incremento de TSC2, elevando los niveles de autofagia vía la ruta de mTOR, en condiciones de limitación de nutrientes.

II. Abreviaturas

ADCD	Muerte celular dependiente de autofagia (<i>autophagy-dependent cell death</i>)
AKT/PBK	AKT cinasa/Proteína cinasa b (<i>AKT kinase/Protein kinase B</i>)
AMBRA	Molécula activadora y reguladora de Beclina1 de la autofagia (<i>autophagy and beclin 1 regulator 1</i>)
AMP	Monofosfato de adenosina (<i>adenosine monophosphate</i>)
AMPK	Proteína quinasa activada (<i>Protein kinase AMP-Activated</i>)
AL	Autolisosoma (<i>Autolysosome</i>)
AP	Autofagosoma (<i>Autophagosomes</i>)
Apaf-1	Factor activador de la proteasa apoptótica 1 (<i>Apoptosis protease-activating factor-1</i>)
ATG	Proteínas relacionadas con la autofagia (<i>autophagy-related gene</i>)
AVd	Vacuolas autofágicas tardías o degradativas (<i>degradative autophagic vacuole</i>)
AVi	Vacuolas autofágicas iniciales (<i>initial autophagic vacuole</i>)
BAK	Bcl-2 antagonista asesino 1 (<i>BCL2 Antagonist/Killer 1</i>)
BAX	Proteína x asociada a Bcl-2 (<i>bcl-2-like protein 4</i>)
BECN1	Beclina 1 (<i>Beclin 1</i>)
Bcl-2	Beclina 2 (<i>Beclin 2</i>)
CMA	Autofagia mediada por chaperona (<i>Chaperone-mediated autophagy</i>)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol (<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>)

FIP200	Proteína de 200 kDa que interactúa con la cinasa de la familia FAK (<i>Focal adhesion kinase (FAK)-interacting protein of 200 kDa</i>)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GC	Células de la granulosa
HIF-1	Factor inducido por la hipoxia 1 (<i>HIF por Hypoxia Inducible Factor</i>)
hsc70	Proteína de choque térmico de 70 kDa (<i>heat shock cognate</i>)
IGF1R	Receptores del factor de crecimiento similar a la insulina (<i>Insulinlike growth factor1 receptor</i>)
IRS1 e IRS2	Sustratos del receptor de insulina (<i>Insulin receptor substrate-1 and Insulin receptor substrate-2</i>)
LAMP2-2a	Proteína de membrana asociada a lisosomas II-A (<i>lysosomal associated membrane protein 2</i>)
LC3	Proteína asociada a los microtúbulos de cadena ligera 3 (<i>Microtubule-associated protein light chain 3</i>)
LC3-I	Forma citosólica de LC3 (<i>Cytosolic form of LC3</i>)
LC3-II	Forma conjugada de LC3-1 con fosfatidiletanolamina (PE) (<i>LC3-PE conjugate</i>)
LH	Hormona luteinizante (<i>Luteinizing hormone</i>)
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero (<i>mammalian target of rapamycin</i>)
mTORC1	Serina/treonina cinasa 1 blanco de rapamicina (<i>target of rapamycin complex 1</i>)
mTORp(S2448)	mTOR fosforilada en la serina 2448
PAS	Sitios de ensamblaje de estructuras preautofagosómicas (<i>pre-autophagosomal structure</i>)
PBK	Proteína quinasa B (<i>protein kinase b</i>)
PCD	Muerte celular programada (<i>program cell death</i>)

PE	Fosfatidiletanolamina (<i>Phosphatidylethanolamine</i>)
PBS	Buffer de fosfatos salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasa (<i>phosphatidylinositol-3 kinase</i>)
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (<i>phosphatase and tensin homolog</i>)
ProLC3	Proteína precursora de LC3 (<i>LC3 precursor protein</i>)
PtdIns	Fosfatidilinositol (<i>Phosphatidylinositol</i>)
PI3KC3-CI	Complejo de fosfatidilinositol 3-cinasa clase I (<i>class I phosphatidylinositol 3-kinase</i>)
PI3KC3-CII	Complejo de fosfatidilinositol 3-cinasa clase II (<i>class II phosphatidylinositol 3-kinase</i>)
PtdIns3K-CIII	Complejo de fosfatidilinositol 3-quinasa clase III específico de autofagia (<i>phosphatidylinositol 3-kinase complex</i>)
Raptor	Proteína reguladora asociada a mTOR (<i>Regulatory-associated protein of mTOR</i>)
RCD	Muerte celular regulada (<i>Targeting regulated cell death</i>)
RE	Retículo endoplasmático
Rheb	Homólogo de Ras enriquecido en cerebro (<i>Ras homolog enriched in brain</i>)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>Reactive oxygen species</i>)
S555	Serina 555
S6K1	Proteína ribosómica S6 quinasa beta-1 (<i>Ribosomal Protein S6 Kinases</i>)
S757	Serina 757
TGN	Red trans-Golgi (<i>Trans-Golgi Network</i>)

TSC	Complejo de esclerosis tuberosa (<i>Tuberous sclerosis complex</i>)
TSC1/2	Hamartina/tuberina (<i>hamartin and tuberlin</i>)
ULK1	Cinasa 1 activadora de autofagia (<i>Unc-51-like kinase 1</i>)
UVRAG	Gen asociado a la resistencia de rayos UV (<i>UV Radiation Resistance Associated</i>)
WIPI	Proteína de repetición WD que interactúa con fosfoinosítidos (<i>WD repeat protein interacting with phosphoinositides</i>)

III. Introducción.

1. Autofagia.

La autofagia (auto-comer) es un proceso que implica la degradación del contenido celular en los lisosomas. La activación de la autofagia sirve como un mecanismo crucial para que las células sobrevivan a las condiciones ambientales cambiantes **(Li y Wang, 2021)**. Este es un proceso fisiológico conservado por la evolución para el reciclaje de constituyentes celulares, como orgánulos u otros constituyentes celulares o fragmentos de citoplasma **(revisado en Escobar *et al.*, 2011)**. La autofagia es elemental para la renovación celular y forma parte del proceso de desarrollo y de la diferenciación celular en condiciones fisiológicas normales **(Costas y Rubio, 2017)**.

La función de la autofagia se basa en la formación de vesículas de membrana doble o multimembrana denominadas autofagosoma (AP), que desempeña un papel clave en la homeostasis celular al absorber carga que incluye mitocondrias dañadas (mitofagia) y agregados de proteínas. La actividad de la autofagia está modulada principalmente por el tamaño y el número de APs. La producción/acumulación de APs que posteriormente no se fusionan en lisosomas (o acumulación de APs) induce directamente a la toxicidad celular bajo diversas condiciones de estrés, como oxidación y agregación de proteínas tóxicas y este proceso puede estar implicado en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas, tumorigénesis e infecciones, entre otros. El pH ácido y la acción enzimática de las hidrolasas dentro del lisosoma conducen a la ruptura de las membranas internas de los APs, así como del contenido de los APs **(Wei *et al.*, 2018)**.

La autofagia ocurre a niveles basales en cualquier célula para llevar a cabo la degradación adecuada de proteínas de larga duración, agregados de proteínas u orgánulos dañados, asegurando en última instancia la homeostasis intracelular. Sin embargo, diferentes condiciones de estrés pueden provocar la inducción activa de la maquinaria autofágica **(Wesselborg y Stork, 2015)**. Estas condiciones de estrés incluyen escasez de nutrientes, infección por patógenos, infección por toxinas, abstinencia del factor de crecimiento o hipoxia **(Cloonan y Williams, 2011; Li y Wang, 2021; Wesselborg y Stork, 2015)**. Es de destacar que se conserva la maquinaria autofágica básica entre diferentes eucariotas, incluidas levaduras, animales y plantas **(Wesselborg y Stork, 2015)**.

El término "autofagia" generalmente indica macroautofagia a menos que se especifique lo contrario **(Mizushima, 2007)**. Existen tres tipos de autofagia: microautofagia, autofagia mediada por chaperonas (CMA) y macroautofagia (figura 1).

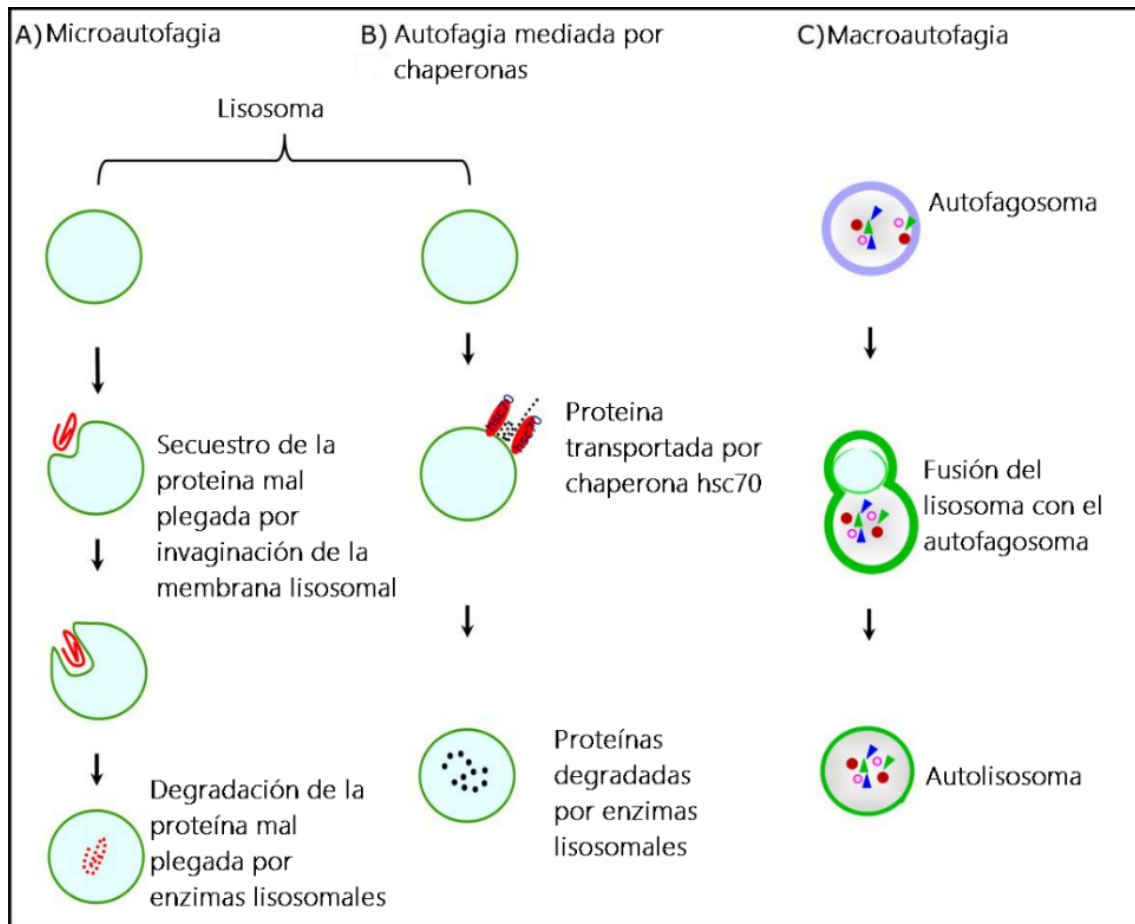


Fig.1 Esquema de las rutas autofágicas. En el esquema: A) Microautofagia: el contenido citoplasmático está directamente encerrado por invaginación directa de la membrana lisosomal. B) Autofagia mediada por chaperonas: los componentes a degradar se transportan selectivamente hacia el lisosoma después de interactuar con la chaperona hsc70. C) Macroautofagia (comúnmente llamada autofagia): el autofagosoma que contiene varias proteínas citosólicas y se fusiona con lisosomas; posteriormente, el contenido del autofagosoma es degradado por las enzimas lisosomales (Esquema tomado y modificado de Escobar *et al.*, 2013).

Las tres vías autofágicas principales (macroautofagia, microautofagia y CMA) contribuyen todas a la degradación lisosomal, pero difieren en su regulación, el tipo de carga preferentemente degradados y los mecanismos que contribuyen a dirigir la carga del compartimento lisosómico (Bejarano y Cuervo, 2010).

1.1. Microautofagia.

En la microautofagia, la carga citosólica se secuestra mediante la absorción directa en los túbulos o invaginaciones de la membrana lisosómica, que luego se pellizca en la luz lisosómica para su degradación. Este es un proceso bien caracterizado en las levaduras, donde se ha identificado un subconjunto de genes directamente involucrados en la microautofagia (Bejarano y Cuervo, 2010). La microautofagia es la absorción directa de material citoplásmico por la membrana lisosomal (Codogno y Meijer, 2013). Por esta vía se degradan moléculas dañadas, truncas o mal procesadas que no adquieren la conformación adecuada. La microautofagia desempeña un rol importante en

la detoxificación de los tejidos, la acumulación de proteínas mal plegadas y toxinas que contribuyen al desarrollo de varias enfermedades que involucran la muerte celular **(Costas y Rubio 2017)**.

1.2. Autofagia mediada por chaperonas (CMA).

Las características que distinguen a la CMA de otras formas de autofagia son el reconocimiento selectivo de la carga por parte de las chaperonas citosólicas y el hecho de que los sustratos no están engullidos, sino que se trasladan a través de la membrana lisosomal de una manera mediada por receptores **(Costas y Rubio 2017)**. En la autofagia mediada por chaperonas, las proteínas con una señal de secuencia específica se transportan desde el citoplasma a través de la membrana lisosomal hasta la luz lisosomal. Estas proteínas se transportan selectivamente después de interactuar con la chaperona hsc70 (*heatshock protein 70*), que es un miembro de 70 kDa de la familia de proteínas de choque térmico. La interacción de hsc70 con el sustrato se produce mediante el pentapéptido KFERQ, que está presente en todos los sustratos que toman esta ruta. El complejo sustrato-chaperona se une a un receptor de membrana de lisosoma, LAMP2A o una proteína similar asociada a la membrana de lisosoma. Después de desplegarse, el sustrato atraviesa la membrana lisosomal con la ayuda de una chaperona que se encuentra en la luz del lisosoma **(revisado en Escobar et al., 2011)**.

1.3. Macroautofagia.

La macroautofagia es el proceso autofágico mejor caracterizado y probablemente el que contribuye al mayor porcentaje de degradación lisosomal dentro de las células **(Bejarano y Cuervo, 2010)**. La macroautofagia (denominada comúnmente como autofagia) implica un sistema de degradación y reciclaje intracelular que, de una manera dependiente del contexto, puede promover la supervivencia celular o acelerar la desaparición celular **(Zhou et al., 2020)**. Es un proceso catabólico en el que los organelos y los componentes celulares solubles y agregados se envuelven en vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas, que finalmente se fusionan con los lisosomas, lo que lleva a la degradación y reutilización del contenido vesicular **(Abounit y McCauley, 2012)**. En la autofagia, la carga está aislada del resto del citosol por una membrana limitante formada de *ново* que se alarga y se sella sobre sí misma para generar una vesícula de doble membrana, conocida como autofagosoma **(Bejarano y Cuervo, 2010)**. El autofagosoma es el compartimento de doble membrana, producto de la expansión y el cierre del fagóforo, que secuestra cargas citoplasmáticas **(Feng et al., 2014)**. Por definición, los autofagosomas, también llamados vacuolas autofágicas iniciales (AVi), aún no contienen proteínas o enzimas de la membrana lisosomal y no son ácidos. Durante el proceso de maduración, los autofagosomas se convierten en vacuolas autofágicas tardías o degradativas (AVd), que son ácidas y contienen proteínas y enzimas de la membrana lisosomal **(Eskelinen, 2008)**. Los componentes citosólicos secuestrados dentro del autofagosoma se degradan tras la fusión de esta vesícula con lisosomas secundarios, que aportan una amplia gama de enzimas necesarias para la hidrólisis de la carga. En el contexto de la autofagia, hay seis pasos principales asociados con el proceso: 1) regulación de la inducción; 2) reclutamiento y nucleación de vesículas; 3) elongación de vesículas; 4) recuperación de proteínas; 5) acoplamiento y fusión de autofagosoma y lisosoma; 6) ruptura y degradación de vesículas **(Gawriluk et al., 2011)**. Los diversos pasos de la autofagia están orquestados por un grupo de proteínas, conocidas genéricamente como proteínas Atg (proteínas relacionadas a la autofagia), que se caracterizaron por primera vez en la levadura y se conservan en toda la escala filogenética. Entre estos Atgs, dos complejos citosólicos principales de cinasa, el complejo Beclina-1/fosfatidilinositol cinasa tipo III y la proteína serina-treonina-cinasa el blanco de la rapamicina en los mamíferos (mTOR) y sus proteínas auxiliares, regulan el inicio de la macroautofagia, mientras que las proteínas y los lípidos organizados en dos cascadas de

conjugación están directamente involucrados en la formación de autofagosomas (Bejarano y Cuervo, 2010).

La autofagia se ha descrito durante mucho tiempo como un proceso no selectivo. Sin embargo, muchos estudios recientes han revelado que la autofagia puede degradar selectivamente cargas, como agregados (agregofagia), mitocondrias (mitofagia), retículo endoplásmico (reticulofagia/ER-fagia), patógenos (xenofagia) y peroxisomas (pexofagia) (figura 2). La autofagia selectiva permite la eliminación eficiente de ciertas sustancias en respuesta a un desencadenante particular (Li y Wang, 2021).

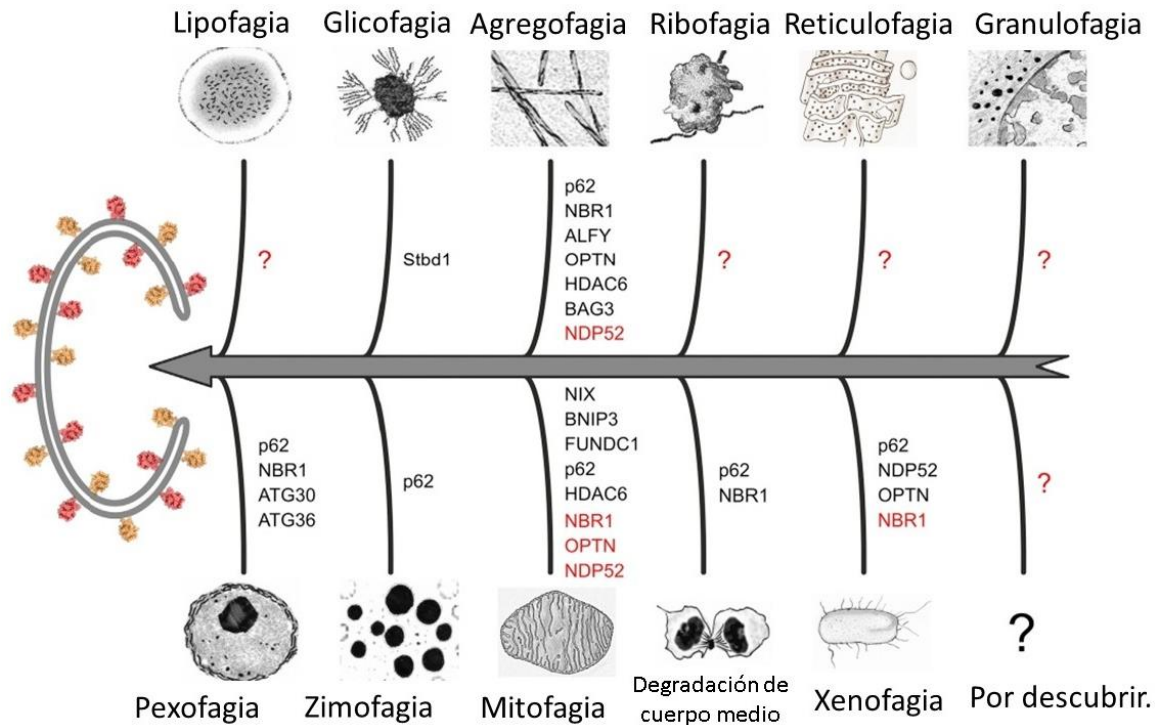


Fig.2. Tipos de autofagia selectiva en células de mamíferos. Los términos agregofagia, glucofagia, ribofagia, etc. reflejan el reconocimiento y degradación de un tipo particular de carga: agregados de proteínas, glucógeno, ribosomas, etc. Se enumeran los receptores de autofagia selectiva establecidos (negro) y putativos (rojo) para los procesos respectivos. Los signos de interrogación indican que aún no se han identificado proteínas receptoras (Imagen tomada y modificada de Rogov et al., 2014).

La autofagia no selectiva se produce por la privación de nutrientes para suministrar a las células bloques de construcción metabólicos esenciales y energía hasta que los nutrientes puedan volver a obtenerse del entorno extracelular. Por el contrario, la autofagia específica de la carga se produce en condiciones ricas en nutrientes para mediar en la eliminación de orgánulos y agregados de proteínas superfluas o dañadas que de otro modo podrían ser tóxicos. Esto puede ocurrir después de cambios en las fuentes de nutrientes y durante los procesos de desarrollo (Youle y Narendra, 2011).

2. Autofagia como muerte celular.

El término muerte celular autofágica se utiliza para describir la muerte celular programada de tipo II, basándose en la presencia de vesículas autofágicas. Actualmente, el Comité de Nomenclatura de Muerte Celular define la muerte celular dependiente de la autofagia (ADCD) como un tipo de muerte celular regulada (RCD) que es precipitada o ejecutada por la maquinaria de autofagia. Además del desarrollo, la ADCD se ha relacionado con múltiples enfermedades humanas como cáncer, enfermedades neurodegenerativas y lesiones tisulares (**Zhou et al., 2020**). La muerte celular por autofagia se manifiesta como vacuolización citoplásmica extensa y culmina de manera similar con la captación fagocítica y la consiguiente degradación lisosómica (**Galluzzi, et al., 2018**). Sin embargo, la interacción entre la autofagia y diversas formas de muerte celular hace que sea difícil distinguir las funciones específicas de la autofagia en la mediación de la muerte celular (figura 3). Como tal, el concepto de muerte celular dependiente por completo de la autofagia ha sido algo controvertido (**Denton y Kumar, 2019**).

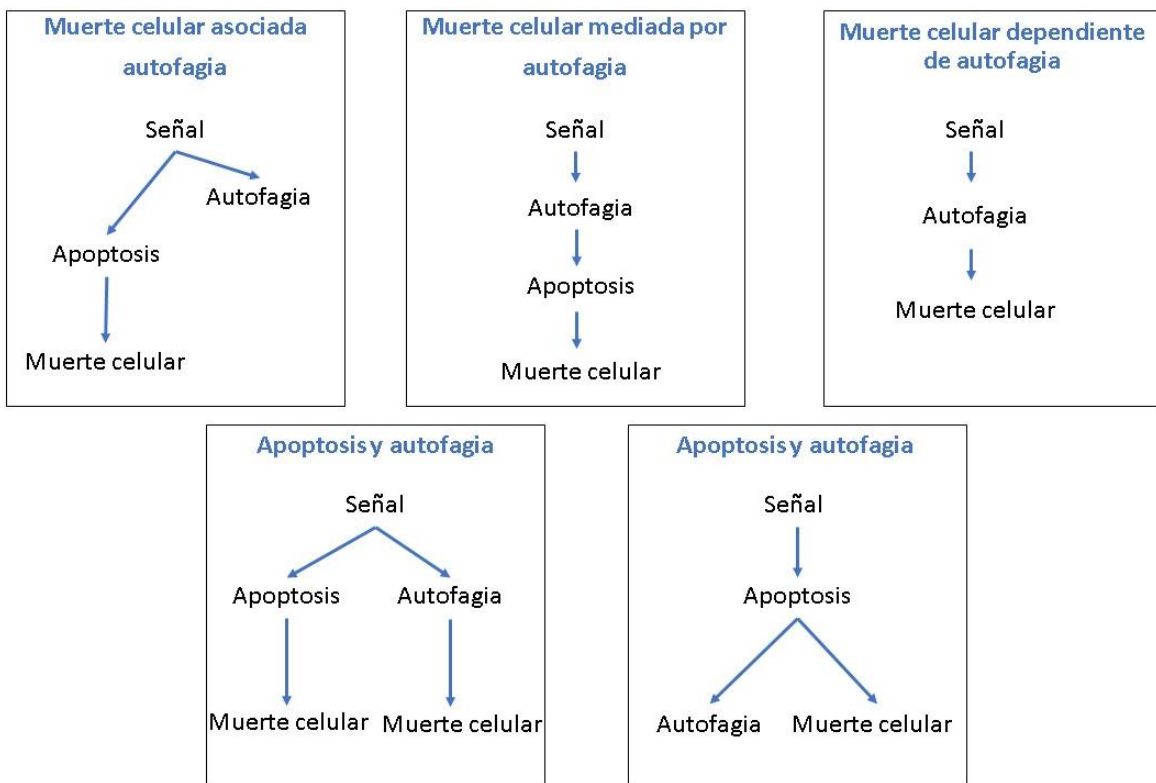


Fig.3. Autofagia en la muerte celular. Las funciones de la autofagia en la muerte celular se pueden definir como: (i) muerte celular asociada a la autofagia, en la que la inducción de la autofagia coincide con la inducción de la apoptosis (u otras vías de muerte celular), donde la autofagia simplemente acompaña al proceso de muerte celular y no tiene un papel activo en él; (ii) muerte celular mediada por autofagia, donde la inducción de la autofagia desencadena la apoptosis; y (iii) muerte celular dependiente de la autofagia (ADCD), un mecanismo distinto de muerte celular que ocurre independientemente de la apoptosis o necrosis (Tomado y modificado de **Denton y Kumar, 2019**).

La autofagia en el estado basal, o después de la estimulación por falta de nutrientes, es un proceso de supervivencia y citoprotector. En ciertos entornos, por ejemplo, en respuesta a los inductores de

muerte, los autofagosomas son parte del proceso de muerte celular autofágica. La muerte celular programada (PCD) de tipo II es una forma de muerte celular independiente de caspasa que se ha observado en células que no pueden morir por mecanismos apoptóticos normales, como en células deficientes en Bax/Bak, en ausencia de vías funcionales dependientes de caspasa como Apaf-1 (Cloonan y Williams, 2011).

3. Características morfológicas y ultraestructurales de la autofagia.

La característica morfológica que hace que la macroautofagia sea única de otros procesos de tráfico mediados por vesículas intracelulares es que las vesículas secuestradoras, denominadas autofagosomas, se forman de *novo* en lugar de a través de la gemación de la membrana; es decir, el autofagosoma se forma por expansión y no brota de un orgánulo preexistente que ya contiene carga (Parzych y Klionsky, 2014). El proceso de secuestro necesita un alto grado de flexibilidad; se deben acomodar diferentes tipos y tamaños de carga. Por tanto, a diferencia de la mayoría de los procesos de transporte vesicular, la macroautofagia no utiliza una vesícula de un solo tamaño (Klionsky & Codogno, 2013).

En los sistemas de mamíferos, la generación de autofagosomas se inicia en múltiples sitios en todo el citoplasma en lugar de en un solo sitio de montaje de fagóforo (PAS). Varios estudios sugieren que las estructuras asociadas al retículo endoplásmico (RE) llamadas omegasomas pueden servir como sitios de iniciación de la formación de autofagosomas en mamíferos. Después de la iniciación, la membrana comienza a expandirse. En esta etapa, se le llama fagóforo, que es el compartimento secuestrador primario de doble membrana. La fuente de la membrana que forma el fagóforo es muy debatida, pero varios estudios han implicado a la membrana plasmática, ER, el complejo de Golgi y las mitocondrias como posibles fuentes. A medida que el fagóforo se expande, la membrana se dobla para generar finalmente un autofagosoma esférico (figura 4) (Parzych y Klionsky, 2014).

Macroautofagia

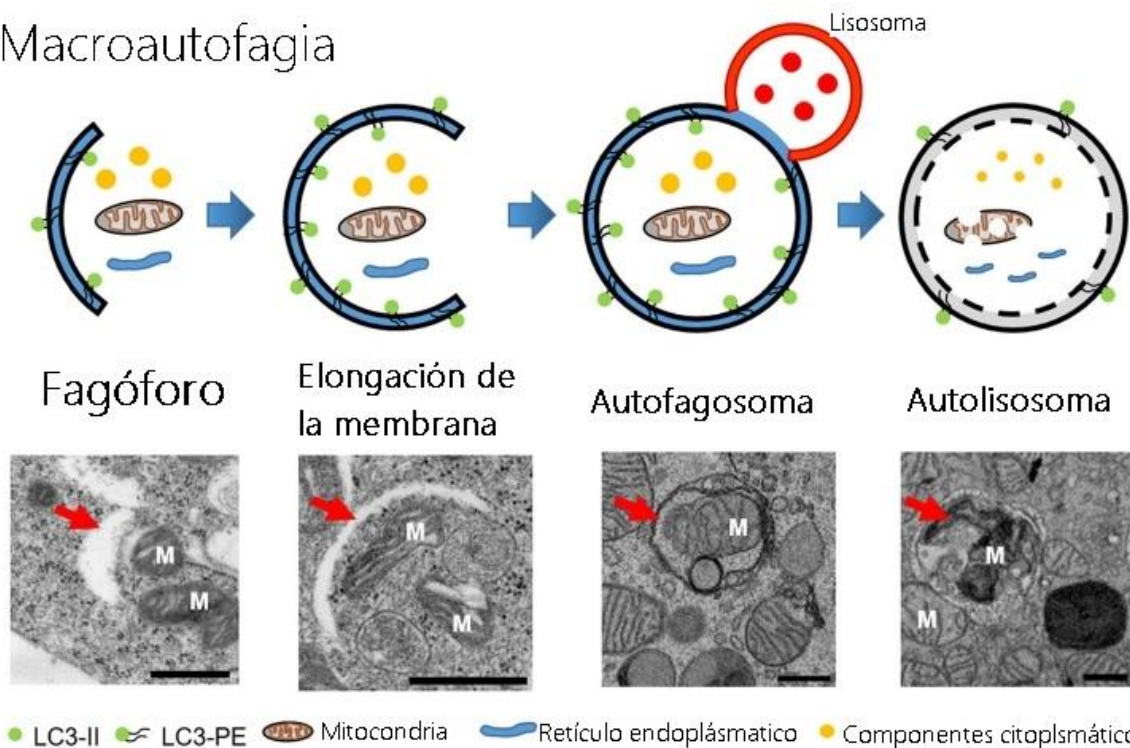


Fig.4. Modelo esquemático e imágenes de microscopía electrónica de transmisión de un fagóforo hasta la formación de un autolisosoma. La autofagia es un proceso de varios pasos que incluye cuatro procesos principales, que son el aislamiento de la membrana, la expansión de las vesículas, la maduración y la fusión del lisosoma y la degradación de los compartimentos. M: mitocondrias, barra de escala: 500 nm (Imagen tomada y modificada de **Jung y Mun, 2019**).

Una vez completado, el fagóforo rodea completamente su carga y se fusiona para formar el autofagosoma de doble membrana. Una vez que se forma el autofagosoma, debe entregar su carga al lisosoma en mamíferos o la vacuola funcionalmente relacionada en levaduras y plantas. Al llegar a su destino, la membrana externa del autofagosoma se fusionará con la membrana lisosomal/vacuolar. El producto de la fusión entre un autofagosoma y un lisosoma en células de mamíferos se denomina autolisosoma. Expuestos al ambiente ácido y a las hidrolasas residentes del lisosoma/vacuola, la membrana interna del autofagosoma y posteriormente, la carga autofágica se degradan y las partes componentes se exportan de nuevo al citoplasma a través de permeasas lisosomales para su uso por la célula en procesos biosintéticos o para generar energía. En los mamíferos, la macroautofagia a menudo converge con la vía endocítica. Por lo tanto, antes de la fusión con los lisosomas, los autofagosomas también pueden fusionarse con los endosomas tempranos o tardíos para formar anfisomas, que luego se fusionan con los lisosomas para convertirse en autolisosomas (**Parzych y Klionsky, 2014**).

Como organelo de doble o multimembrana, el autofagosoma (AP) en el citoplasma es un sello distintivo y el evento inicial clave de la autofagia. A veces, la estructura de doble membrana que contiene parte de los componentes citoplásmicos también puede considerarse AP. El tamaño y el número de AP pueden estar regulados por separado por diferentes subgrupos de proteínas de genes relacionados con la autofagia (ATG) y los miembros de la familia de proteínas Atg8/proteína asociada a microtúbulos de cadena ligera 3 (LC3). La cantidad de proteína Atg8 se correlaciona con el número de cuerpos autofágicos; es decir, los niveles de Atg8 determinan el número de APs. Durante la autofagia no selectiva, el cierre prematuro del fagóforo da como resultado una APs más pequeños (**Wei et al., 2018**). La acumulación de autofagosomas y autolisosomas es una característica morfológica característica de la MCP tipo II (**Zeng et al., 2006**).

Las células en las primeras etapas de la autofagia como vía de eliminación contienen varias vacuolas autofágicas y tanto el nucleoplasma como el citoplasma aparecen levemente oscurecidos, la estructura nuclear todavía parece normal. Se puede presentar la dilatación de mitocondrias, del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi. La membrana plasmática pierde especializaciones como microvellosidades y complejos de unión. En varios casos se observa una endocitosis intensa. Durante las últimas etapas, tanto el número como el tamaño de las vacuolas aumentan y muchas de ellas contienen figuras de mielina o están llenas de lípidos, que aparecen como inclusiones de color gris pálido en el citoplasma (**Revisado en Escobar et al., 2011**).

4. Características bioquímicas de la autofagia.

En 1993, Tsukada y Ohsumi informaron del aislamiento y caracterización de 15 mutantes de *S. cerevisiae* que mostraban autofagia defectuosa y los denominaron Apg1-15 (autofagia). En 2003, se propuso una nomenclatura unificada para los denominados genes/proteínas relacionadas con la autofagia, ATGs/Atgs (tabla 1).

Complejos Atg, conjugaciones Atg12 y LC3 Tomado y modificado de Liu et al., 2017.			
Tabla 1. Genes ATG esenciales para la autofagia en mamíferos.			
Mamíferos	Levaduras	Función	Referencias
ULK1	<i>ATG1</i>	Proteína quinasa, diana de la quinasa mTOR	(Mizushima, 2010).
<i>ATG1 /APG13</i>	<i>ATG13</i>	Proteína fosforilada, diana de la quinasa mTOR	(Hasokawa <i>et al.</i> , 2009)
FIP200	<i>ATG17</i>	Esencial tanto para la estabilidad como para la fosforilación de ULK1	(Hara <i>et al.</i> , 2008)
<i>ATG101</i>		Importante para la estabilidad y la fosforilación basal de Atg13 y ULK1, conservados de <i>S. pombe</i> a mamíferos	(Hosokawa <i>et al.</i> , 2009) (Shintani <i>et al.</i> , 2001)
Complejo Atg9-WIPI1			
Atg9A, B	Atg9	Proteína de membrana	(Young <i>et al.</i> , 2006) (Noda <i>et al.</i> , 2000)
WIPI-1,2,3,4	Atg18	Proteína de unión PI (3) P	(Obara <i>et al.</i> , 2006) (Shintani <i>et al.</i> , 2001)
Complejo Vps34-beclina-1 clase III PI3-quinasa			
PIK3C3/VPS34	VPS34	PI3 quinasa que	(Kihara <i>et al.</i> , 2001)
PIK3R4/VPS15	VPS15	Activador central del complejo quinasa Vps34 PI3	(Kihara <i>et al.</i> , 2001)
BECN1	Atg6	Beclina-1, una de las subunidades centrales, proteína	(Liang <i>et al.</i> , 1999) (Kametaka <i>et al.</i> , 1998)

		que interactúa con Bcl-2	
Atg14	Atg14	Potenciador de la formación de autofagosomas	(Itakura <i>et al.</i> , 2008) (Kametaka <i>et al.</i> , 1998)
UVRAG	VPS38	Potenciador de la fusión de autofagosoma-lisosoma y tráfico endocítico	(Liang <i>et al.</i> , 2006)
Rubicon		Regulador negativo de la fusión de autofagosoma-lisosoma y tráfico endocítico	(Matsunaga <i>et al.</i> , 2009) (Zhong <i>et al.</i> , 2009)
AMBRA1		Dominio WD40 que contiene un regulador positivo de autofagia	(Fimia <i>et al.</i> , 2007)

La mayoría de las Atgs de levaduras tienen homólogos en el sistema de los mamíferos. Sin embargo, a veces la homología se basa únicamente en la función, pero no en la secuencia. Además, existe un Atg de mamífero, Atg101, que no tiene una contraparte obvia en levaduras. Con frecuencia, en los mamíferos existen diferentes isoformas de una determinada levadura Atg. Además, diferentes proteínas no Atg están involucradas en la regulación y el proceso de la autofagia, por ejemplo, la mTOR, AMPK, AKT, AMBRA1, Bcl-2, DFCP1 o proteína de clasificación de proteínas vacuolares 34 (VPS34), que es la subunidad catalítica del fosfatidilinositol 3-quinasa de clase III (PtdIns3K). Finalmente, se han reportado diferentes funciones de los Atg's en procesos no autofágicos y es probable que surjan más en el futuro (**Wesselborg y Stork, 2015**).

La autofagia se basa en una cascada estrechamente regulada e interconectada de complejos de proteínas codificados por más de 30 genes/proteínas conservadas evolutivamente llamados proteínas Atg (genes relacionados con la AuTofaGia) (**Krieg *et al.*, 2018; Tamargo-Gómez y Mariño, 2018**).

Funcionalmente, las proteínas Atg de mamíferos se pueden subdividir en seis grupos funcionales: (1) el complejo de proteína quinasa ULK1 (*unc-51-like kinase-1*)-Atg13-FIP200-Atg101; (2) el complejo PtdIns3K clase III que contiene las proteínas centrales VPS34, VPS15 y BECN1; (3) el complejo WIPI/Atg18-Atg2 de unión a PtdIns3P; (4) la proteína transmembrana de extensión múltiple Atg9A; (5) el sistema Atg5/Atg12 similar a ubiquitina y (6) el sistema de conjugación Atg8/LC3 similar a ubiquitina. Estos seis módulos regulan diferentes pasos durante la biogénesis del autofagosoma, es decir, nucleación de vesículas, alargamiento de la membrana autofagosómica y finalización del autofagosoma (**Wesselborg y Stork, 2015**).

4.1. El complejo de proteína quinasa ULK1-Atg13-FIP200-Atg101.

El inicio de la autofagia comienza con la activación del complejo ULK1 (figura 5). ULK1 es parte de una familia de quinasas ULK1-4 en humanos. La isoforma ULK1 es la más importante de estas en autofagia. El complejo ULK1 consta del propio ULK1 y las subunidades no catalíticas FIP200 (proteína de 200 kDa que interactúan con la familia FAK) también conocida como RB1CC1, Atg13 y Atg101 (Hurley y Young, 2017).

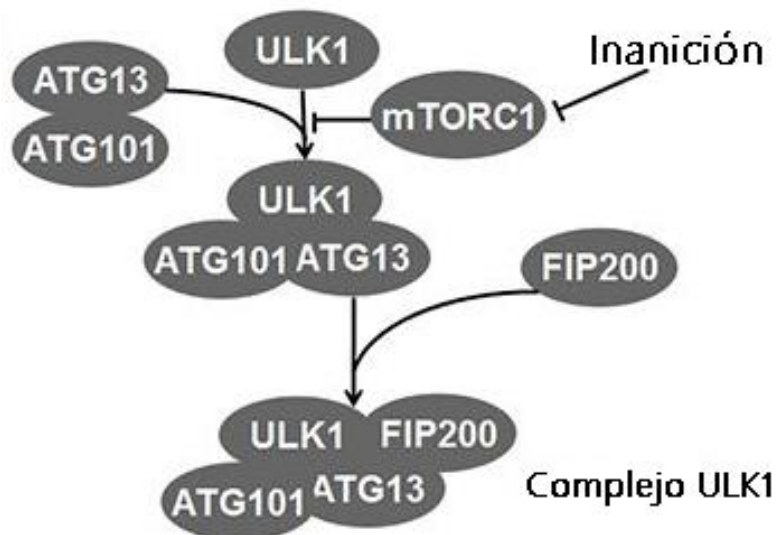


Fig.5. Complejo ULK1: iniciador de la autofagia que se localiza en el fagóforo. En condiciones de inanición, mTORC1 se bloquea y ULK1 y Atg13 activados inducen el inicio de la autofagia. Atg101 participa en el proceso de una manera dependiente de Atg13 y FIP200 es otra proteína crítica para la inducción de autofagia (Imagen tomada y modificada de Liu *et al.*, 2017).

Los dos homólogos de mamíferos de la proteína quinasa serina/treonina Atg1, ULK1, ULK2 (*unc-51-like kinase-2*) y el homólogo de Atg17, FIP200, interactúan con Atg13 de mamífero para formar un complejo estable que se encuentra en el fagóforo durante la inanición. La inactivación de mTOR por inanición o rapamicina activa ULK1 y da como resultado la fosforilación de Atg13 y FIP200 (Hu *et al.*, 2015). Atg101 es importante para la estabilidad y la fosforilación basal de Atg13-Atg101 protege a Atg13 de la degradación proteosomal- y ULK1 (Hu *et al.*, 2015; Tanida, 2011).

FIP200 es importante para la estabilidad y fosforilación de ULK1 (Tanida, 2011). Después de la activación de ULK1 y la posterior fosforilación de Atg13 y FIP200, ULK1 estimula la producción de PtdIns3P a través de la fosforilación de BECN1, que conduce a la activación del fosfatidilinositol 3-quinasa de clase III (PI3KC3, también conocida como PIK3C3) (Proikas-Cezanne *et al.*, 2015). El reclutamiento de los complejos ULK1 y PIK3C3 al sitio de nucleación es el paso inicial para la autofagia y la relocalización de ULK1 es un requisito previo para la focalización del complejo Atg14-PIK3C3 (Yu *et al.*, 2015).

La subunidad catalítica de PIK3C3 es un lípido quinasa de 887 aminoácidos que fosforila el fosfatidilinositol para generar fosfatidilinositol 3-fosfato [PI(3)P] o (PtdIns3P) en el sitio de nucleación, lo que crea un medio enriquecido con PtdIns3P un fosfolípido central para el tráfico de membrana, el PtdIns3P refuerza la localización del complejo ULK1 y otras proteínas Atg en la membrana en crecimiento y nucleación en autofagia, ya que actúa para reclutar proteínas efectoras

que contienen dominios FYVE o PX que controlan el acoplamiento, el alargamiento del fagóforo y la fusión de la membrana durante la formación de vesículas internas. (Ghosh *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2015).

La PI3K genera el fosfolípido PtdIns3P mediante la fosforilación de fosfatidilinositol (PtdIns) en la membrana del fagóforo naciente y el dominio especializado derivado del retículo endoplasmático (ER) conocido como omegasoma (Tornero-Écija *et al.*, 2021). El omegasoma es la estructura que se origina en el retículo endoplásmico enriquecida en PI(3)P, que permite el reclutamiento de diversos complejos de autofagia implicados en la síntesis de autofagosomas (Odle *et al.*, 2021).

4.2. El complejo PtdIns3K clase III que contiene las proteínas centrales

Pik3c3/VPS34, PIK3R4/VPS15, BECN1/Beclina 1 y Atg14.

La primera observación de la regulación diferencial de la autofagia por PI3K de clase I y PtdIns3K de clase III fue informada por Petiot *et al.*, 2000 en células de cáncer de colon humano. Este mecanismo regulador distinto ahora se reconoce como el paradigma canónico: mientras que las PI3K de clase I actúan como el regulador negativo de la autofagia en la membrana plasmática, la PtdIns3K de clase III es la cinasa indispensable que produce PtdIns3P en la membrana precursora que impulsa la progresión de la autofagia (Yu *et al.*, 2015).

En los mamíferos hay al menos 2 complejos de PI3K que juegan un papel clave en la activación de la autofagia al producir fosfatidilinositol-3-fosfato (PtdIns3P) en los fagóforos (Ma *et al.*, 2017; Birgisdottir *et al.*, 2019). El PtdIns3K de clase III forma grandes complejos de múltiples subunidades con Pik3c3 como subunidad catalítica y PIK3R4 como subunidad reguladora y su composición se diversifica en diferentes contextos biológicos y funciona como el regulador positivo más fundamental de la autofagia. En células de mamíferos, PtdIns3K y PI3K se agrupan en 3 clases según sus características estructurales y especificidades de sustrato, como se resume en la Tabla 2 (Yu *et al.*, 2015).

Tabla 2. Composición y preferencia de sustrato de 3 clases de fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) en células de mamíferos. Tomado y modificado de Yu, *et al.*, 2015.

		Subunidades				
Clase		Subunidad catalítica	Subunidad reguladora	Sustratos lipídicos	Productos	Función en la autofagia
Clase I PI3K	Clase IA	PIK3CA	PIK3R1	PtdIns	PtdIn3P	Anti-autofagia
		PIK3CB	PIK3R2	PtdIns4P	PtdIns(4,5)P ₂	
		PIK3CD	PIK3R3	PtdIns(4,5)P ₂	PtdIns(3,4,5)P ₃	
	Clase IB	PIK3CG	PIK3R5			
			PIK3R6			

Clase II PI3K		Clase II PI3K	-	PtdIns	PtdIns3P	Pro- autofagia
		PIK3C2B		PtdIns4P	PtdIns(3,4)P ₂	
		PIK3C2G				
Clase III PtdIns3K		PIK3C3	PIK3R4	PtdIns	PtdIns3P	Pro- autofagia
El guion (-) indica que no se ha demostrado su presencia en células de mamíferos.						

Varios grupos han purificado el complejo PtdIns3K en células de mamíferos y han identificado que contiene al menos 7 subunidades estequiométricas que incluyen Pik3c3, PIK3R4, BECN1, Atg14, UVRAG (resistencia a la radiación UV asociada), RUBCN y NRBF2. Estas 7 subunidades forman 2 subcomplejos que constan de un núcleo compuesto por PIK3C3, PIK3R4 y BECN. El complejo I, que participa en la iniciación de la autofagia, alberga Atg14 forma un complejo específico de autofagia con Pik3c3-PIK3R4-BECN1 en membranas del fagóforo (similar al complejo I en levadura), mientras que el complejo UVRAG y RUBCN con Pik3c3-PIK3R4-BECN1 está presente en membranas endosomales (similar al complejo II en levadura) (tabla 3) (Ma *et al.*, 2017; Birgisdottir *et al.*, 2019).

Tabla 3. Composición y especificidad funcional de los complejos Vps34/PIK3C3 en levaduras y mamíferos. Tomado y modificado de Yu, <i>et al.</i> , 2015.				
	Levaduras		Mamíferos	
Complejo	PtdIns3K complejo I	PtdIns3K complejo II	PtdIns3K-C1	PtdIns3K-C2
Quinasa del núcleo	Vps34	Vps34	PIK3C3	PIK3C3
Subunidades reguladoras	Vps30	Vps30	BECN1	BECN1
	Vps15	Vps15	PIK3R4	PIK3R4
	Atg38		NRBF2	
Componente de definición	Atg14	Vps38	ATG14	UVRAG
Función biológica	Autofagia	Clasificación de proteínas de vacuola	Autofagia	Tráfico de endosomas y autofagia *

* El papel de PtdIns3K-C2 en la autofagia sigue siendo controvertido. Tomado y modificado de **Yu, et al., 2015**.

Beclina 1 (BECN1), el Atg6 de mamíferos, es un supresor de tumores haploinsuficiente y un efector importante de la autofagia (figura 7). BECN1 es una subunidad del complejo PI3K, cuya acción es antagonizada por Bcl-2. BECN1 contiene un dominio BH3 que media su interacción con Bcl-2. La interacción entre Bcl-2 y BECN1 conduce a la inhibición de la autofagia al interferir con la formación y actividad del complejo promotor de la autofagia, BECN1-PI3K (**Grasso et al., 2015**). BECN1 tiene un dominio BH3 e interactúa con Bcl-2, lo que refleja la regulación convergente de apoptosis y muerte celular autofágica. Además, un subconjunto de miembros de la familia de Bcl-2 pro-apoptóticos para BH3-Only, incluidos BNIP3 y BIK, pueden inducir la activación de la muerte celular autofágica (**Degterev y Yuan, 2008**).

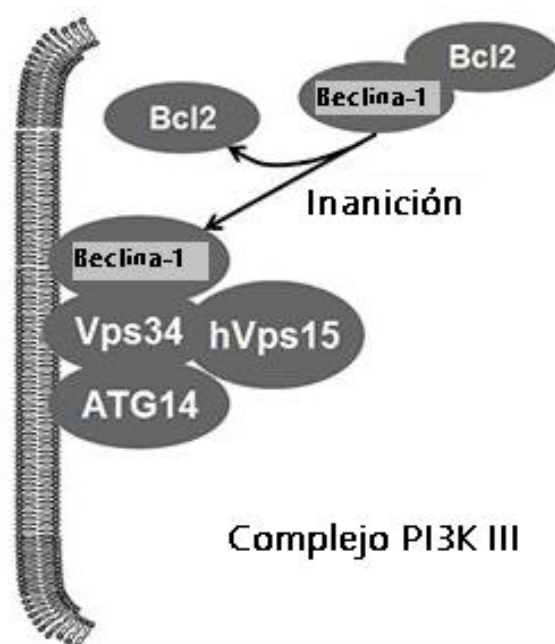


Fig.7. Complejo III de PI3K. El Complejo III de PI3K puede regularse negativamente mediante la unión de Bcl-2 y BECN1, mientras que Bcl-2 liberará BECN1 durante la inanición. Esta estructura se ubica en la membrana interna del fagóforo (Imagen tomada y modificada de **Liu et al., 2017**).

La condición fosforilada o no fosforilada de PtdIns3P impacta directamente en el proceso autofágico, ya que se ha observado que la actividad de la proteína Jumpy (fosfatasa de PtdIns3P) sobre PtdIns3P, regula negativamente la autofagia. Contrariamente, a la promoción de la formación de vesículas autofágicas en condiciones de inanición se ve favorecida por la activación de la proteína FYVE (proteína de doble dominio FYVE), ya que se une de los dominios de la membrana del ER, sitio el que los grupos se forman bajo este estímulo (**Polson et al., 2010**).

4.3. Complejo WIPI (1,2,3 y 4) de unión a PtdIns3P.

En mamíferos se han identificado cuatro proteínas WIPI (proteína de repetición WD que interactúa con fosfoinosítidos). Éstas son efectos de fosfoinosítidos esenciales para la biogénesis de autofagosomas. En levadura las proteínas con las mismas funciones que WIPI se denominan PROPPIN (Atg18, Atg21 y Hsv2) (**Proikas-Cezanne, 2015**).

WIPI1 fue el primer miembro de la familia WIPI en ser identificado como participante en la autofagia. Los tratamientos con células prototípicas que inducen la autofagia por encima del nivel basal, como la inanición y el tratamiento con rapamicina, promueven una notable relocalización de WIPI1 citoplasmático en membranas de autofagosomas positivas para Atg12, Atg16L y LC3. Además, los tratamientos de células prototípicas que inhiben la autofagia, como el bloqueo de la generación de PtdIns3P, previenen la formación de membranas autofagosómicas, lo que hace que WIPI1 permanezca en el citoplasma (**Proikas-Cezanne, 2015**).

WIPI2, asistido por WIPI1, recluta Atg16L1, que se ensambla con el conjugado Atg12-Atg5 en un complejo multimérico e inicia la formación de fagóforo. Por el contrario, tanto WIPI3 como WIPI4 controlan la elongación del fagóforo, por lo que WIPI3 se asocia específicamente con las proteínas Atg2 (**Filali-Mouncef et al., 2021**). Se conoce que WIPI4 forma un complejo con Atg2A/B que puede actuar como factor de anclaje para la expansión del autofagosoma, mientras que WIPI2 interactúa con Atg16L1 para el reclutamiento eficiente del complejo Atg12-Atg5-Atg16L1 y la lipidación de LC3 (**Ren et al., 2020**).

Tras la inducción de la autofagia, WIPI1 se localiza de manera prominente en la membrana plasmática y el RE, particularmente en la envoltura nuclear, lo que sugiere que estas estructuras actúan como fuentes de membrana para los autofagosomas. La regulación positiva de la actividad efectora de PtdIns3P de WIPI1 humano sigue la ruta canónica hacia la formación de autofagosomas, es decir, la inhibición de mTORC1, la activación de ULK1 y PI3KC3 y la producción de PtdIns3P. En consecuencia, WIPI1 se ubica de manera prominente con el adaptador de autofagia p62 (también conocido como SQSTM1) (**Proikas-Cezanne, 2015**).

Al igual que WIPI1, WIPI2 funciona corriente abajo de ULK1 y se une específicamente a PtdIns3P en las membranas autofagosómicas tempranas que poseen ULK1, DFCP1, Atg16L1 y LC3 durante la autofagia inducida por inanición. Por lo tanto, WIPI2 se localiza tanto en omegasomas asociados a RE como en membranas de fagóforos. Es importante destacar que un estudio reciente demuestra que WIPI2 conecta la producción de PtdIns3P con la lipidación de LC3 al inicio de la autofagia, porque se ha descubierto que WIPI2 se une específicamente a Atg16L1, reclutando así el complejo Atg12-Atg5-Atg16L1 que se requiere para la lipidación de LC3 (**Proikas-Cezanne, 2015**).

La evidencia sugiere que WIPI1, WIPI2 y WIPI4 funcionan como efectores de PtdIns3P esenciales y no redundantes corriente abajo de la producción de PtdIns3P mediada por PI3KC3 al inicio de la autofagia. De esta manera, WIPI2 recluta el complejo Atg12-Atg5-Atg16L1, que media la lipidación de LC3, para la cual WIPI1 también es esencial. Además, WIPI4 interactúa con Atg2 y se prevé que funcione corriente abajo de LC3 (**Proikas-Cezanne, 2015**).

4.4. La proteína transmembrana de extensión múltiple Atg9L1.

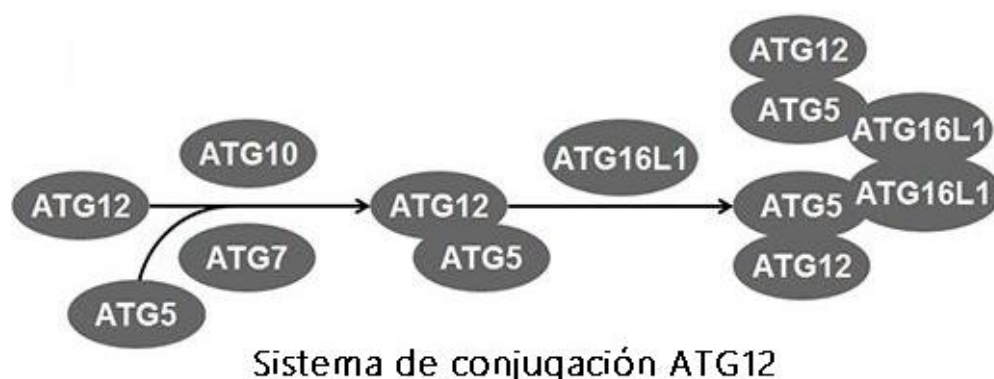
En 2006, se informó que el ortólogo Atg9 de mamífero Atg9A (también denominado mAtg9 o Atg9L1) se localiza en la red trans-Golgi (TGN) y en endosomas tempranos, tardíos y de reciclaje. Tras la inanición, ATG9L1 se redistribuye a las membranas endosómicas periféricas positivas para el marcador autofagosómico GFP-LC3 (**Wesselborg y Stork, 2015**). Después de que se forma el complejo ULK, el siguiente paso es el reclutamiento de vesículas citoplasmáticas que contienen Atg9A, que es un paso crucial en la formación de autofagosomas y juega un papel esencial en el paso de nucleación de la formación de autofagosomas en eucariotas (desde levaduras hasta mamíferos) (**Li et al., 2020**).

En respuesta a la inanición, varias vesículas de Atg9L1 se ensamblan individualmente en la estructura pre-autofagosomal y finalmente, se incorporan en el exterior de la membrana autofagosomal. El papel putativo de Atg9L1 es transportar lípidos y/o servir como plataforma para reclutar efectores al fagóforo. Estudios recientes han implicado que Atg9L1 se localiza en la membrana mitocondrial externa e incluso en la membrana plasmática, lo que sugiere que múltiples fuentes de membrana pueden contribuir a la biogénesis del autofagosoma (Hu *et al.*, 2015).

El Atg9A puede ser fosforilado por ULK y luego se requiere el Atg9A fosforilado para el reclutamiento de LC3 y WIPI1/2 al sitio de formación del autofagosoma y la expansión y elongación del fagóforo. Recientemente se informó que TBC1D5 y el complejo AP2 son importantes reguladores del tráfico de Atg9A hacia los sitios de formación de autofagosomas. Finalmente, Atg9A se localiza en la membrana plasmática en estructuras recubiertas de clatrina y se internaliza a través de endosomas tempranos y luego reciclados (Wesselborg y Stork, 2015).

4.5. El sistema Atg12-Atg5-Atg16L1.

Dos sistemas, Atg12-Atg5-Atg16L1 y LC3-PE (complejos de 3-fosfatidil etanolamina con la proteína de cadena ligera 3 asociada a microtúbulos), son esenciales para que el autofagosoma en formación se expanda y actúe secuencialmente (Hu *et al.*, 2015).



Sistema de conjugación ATG12

Fig.8. Sistema de conjugación Atg12. Atg12 se conjuga irreversiblemente a Atg5 de una manera dependiente de Atg7 y Atg10. El complejo Atg12-Atg5 se une a Atg16L1 y luego forma multimerización en el fagóforo (Imagen tomada y modificada de Liu *et al.*, 2017).

Atg5 y Atg12 están involucrados en la primera de dos reacciones de tipo ubiquitilación que controlan la autofagia. Atg12 se conjuga con Atg5 en una reacción que requiere Atg7 [similar a la enzima activadora de ubiquitina (E1)] y Atg10 [similar a la enzima conjugadora de ubiquitina (E2)]. Atg5-Atg12 interactúa de forma no covalente con Atg16L (similar a Atg16) para formar un complejo de aproximadamente 800 kDa. La segunda reacción similar a la ubiquitilación implica la conjugación de MAP1-LC3; también conocida como Atg8 y LC3, con fosfatidiletanolamina (PE). LC3 se escinde en su extremo C-terminal por Atg4 para formar LC3-I citosólico, que se conjuga covalentemente con PE para formar LC3-II asociado a la membrana, un proceso que requiere las actividades de Atg7 (similar a E1) y Atg3 (similar a E2). El conjugado Atg5-Atg12 parece modular la conjugación LC3-I a PE actuando de una manera similar a E3 y la ubicación del complejo Atg5-Atg12: Atg16L en el fagóforo dicta la ubicación de la reacción de conjugación LC3 (figura 9). De esta manera, LC3 se dirige específicamente a las membranas asociadas a Atg5-Atg12, que son fagóforos expandidos (Hu *et al.*, 2015).

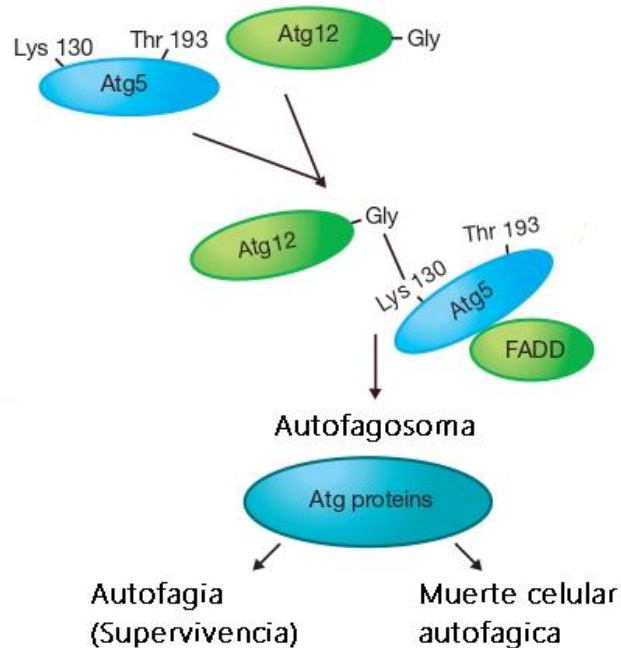
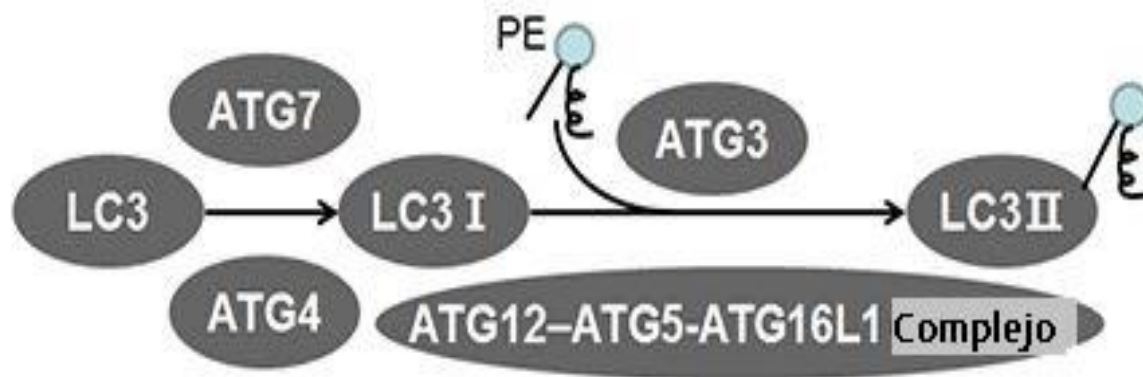


Fig.9. Proteínas asociadas a Atg5 y su papel en la autofagia. La unión de Atg12 y Atg5 requiere la actividad de Atg7 y Atg10, que funcionan de manera similar en las enzimas E1 y E2 en el sistema de ubiquitina. El residuo de lisina en la posición 130 en Atg5 forma un enlace isopeptídico con el residuo de glicina C-terminal en Atg12, junto con otras proteínas Atg, Atg5–Atg12 contribuye a la formación del autofagosoma, que secuestra material citoplasmático antes de la liberación lisosomal (Imagen tomada y modificada de **Codogno, y Meijer, 2006**).

Después de la activación del complejo Ulk1, la nucleación de vesículas se produce mediante la activación del complejo de fosfatidilinositol 3-quinasa de clase III (PtdIns3K), que incluye PtdIns3K y Beclin 1. En la autofagia, estos pasos ocurren a través de dos vías de conjugación similares a la ubiquitina, la vía Atg5-Atg12 y la vía de la LC3. La conjugación de fosfatidiletanolamina a LC3 está mediada por las acciones de Atg3 y el complejo Atg5-Atg12, E2 y E3, respectivamente (**Shimizu, 2018**)

4.6. El sistema de conjugación Atg8/LC3 similar a ubiquitina.

En los mamíferos LC3 es el homólogo de Atg8, es una proteína importante involucrada en el proceso de autofagia. En las células de mamíferos, existen varios homólogos de la levadura Atg8, incluidos LC3A, LC3B, GATE16, GABARAP y Atg8L. La LC3 ha sido mejor investigada y caracterizada como un marcador autofagosomal en células de mamíferos, que forma un sistema de conjugación similar a Atg8, llamado sistema de conjugación LC3 (figura 10).



Sistema de conjugación LC3

Fig.10. Sistema de conjugación LC3. LC3 es procesado por Atg4 y Atg7 para generar LC3-I activado. El complejo Atg12-Atg5-Atg16L1 y Atg3 participan en la conjugación de fosfatidiletanolamina (PE) con LC3-I para crear LC3-II. Y luego LC3-II se inserta en la membrana del fagóforo en elongación. LC3-II se localiza en dos lados del fagóforo hasta la formación del autofagosoma, que se escinde de la membrana externa de esta estructura (Imagen tomada y modificada de Liu *et al.*, 2017).

LC3 está presente en los autofagosomas y se sintetiza en primer lugar como una proteína precursora (pro-LC3), luego el péptido C-terminal del precursor pro-LC3 es escindido por Atg4B en mamíferos para formar LC3-I (inactiva) con una glicina C-terminal expuesta. Catalizada por homólogos de mamíferos Atg7 y Atg3, la LC3-I citosólica es luego activada por la enzima E1/Atg7 y transferida a la enzima E2/Atg3 y finalmente es modificada una proteína unida a la membrana, LC3-II alcanza su forma lapidada al ser conjugada al grupo amino del lípido fosfatidiletanolamina (PE) (LC3-I/PE) luego se asocia con membranas de autofagosoma recién formadas. Se ha descrito que la Atg4B es la única enzima que escinde eficazmente los precursores de LC3 y LC3-I/PE entre cuatro homólogos humanos de la levadura Atg4 (Atg4A-D). Por tanto, ambos sistemas similares a la ubiquitina están íntimamente implicados en la formación de PAS, el ensamblaje y formación de autofagosoma y la subsiguiente biogénesis de la autofagia, además se ha sugerido que la cantidad de LC3-II se correlaciona con el número de autofagosomas presentes. LC3-II permanece en autofagosomas maduros hasta su fusión con lisosomas (Revisado en Escobar *et al.*, 2013; Grasso *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2020). La conversión de LC3-I a LC3-II es bien conocida como marcador de autofagia. Sin embargo, el aumento de LC3-II no es suficiente para mostrar la activación de la autofagia porque la inhibición de la degradación de LC3-II en el lisosoma por el flujo alterado de autofagia también puede causar su acumulación (Grasso *et al.*, 2015). Después de la conversión de su forma citosólica, LC3-I, a su forma asociada a la membrana del autofagosoma, LC3-II, durante la autofagia, LC3-II finalmente es degradado por las enzimas lisosomales en los autolisosomas (Liu *et al.*, 2019).

5. Rutas de señalización de la autofagia.

5.1. mTOR.

mTOR es una proteína quinasa de serina/treonina conservada evolutivamente y el núcleo catalítico de dos complejos distintos: mTOR 1 y 2 (mTORC1 y mTORC2) definidos por la presencia de las proteínas accesorias clave Raptor y Rictor, respectivamente (Deleyto-Seldas y Efeyan, 2021; Ikenoue *et al.*, 2009).

Estos complejos (mTORC1 y mTORC2) tienen una especificidad de sustrato diferente que está determinada por las proteínas únicas que interactúan con mTOR que se encuentran en cada complejo. El complejo mTORC1 contiene mTOR, Raptor, mLST8 y PRAS40 (1-4), mTOR impulsa la mayoría de los procesos anabólicos en la célula, incluida la síntesis de proteínas, lípidos, colesterol y nucleótidos, mientras que simultáneamente aumenta la absorción extracelular de nutrientes y bloquea el catabolismo autofágico, además regula el crecimiento celular y la traducción en parte mediante la fosforilación de la quinasa S6 (S6K) y la proteína de unión eIF-4E 1 (Copp *et al.*, 2009; Deleyto-Seldas y Efeyan, 2021).

La regulación clásica de la autofagia se rige por la vía mTOR, ésta se produce tras la inhibición de mTOR y activación del complejo ULK1 o el parálogo ULK2-Atg13-FIP200-Atg101. Durante la inanición que inhibe la actividad de mTORC1 (figura 11), la inducción de la autofagia recicla los componentes intracelulares para proporcionar una fuente de energía.

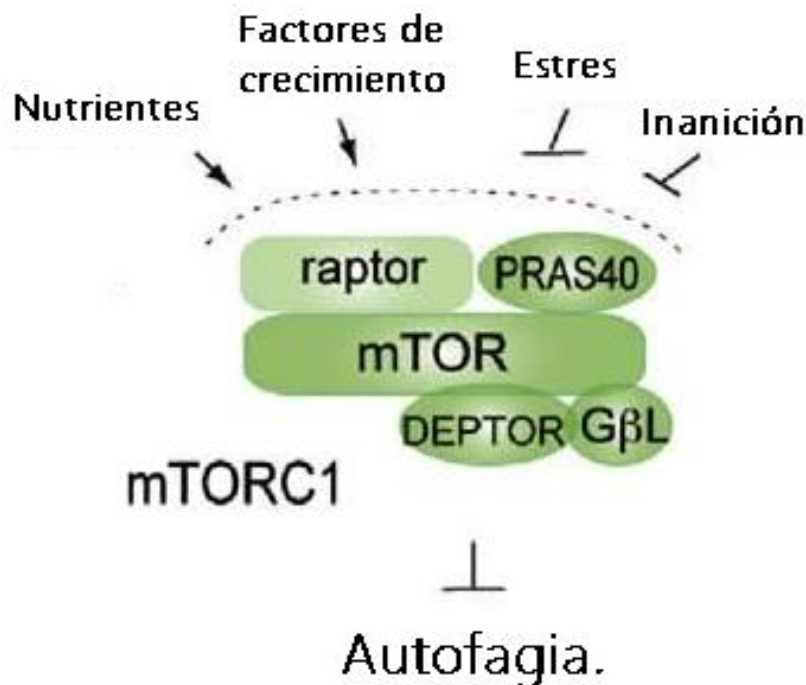


Fig.11. Complejo mTOR. mTORC1 es el complejo proteico responsable de la inducción de la autofagia en respuesta a la falta de nutrientes, el estrés y la reducción de la señalización del factor de crecimiento (Imagen tomada y modificada de Jung *et al.*, 2010).

La inhibición de mTORC1 y la inducción de autofagia se asocia con una reducción de la fosforilación de varios componentes del complejo ULK1. Generalmente, la mTORC1 activa interactúa con ULK1 y luego fosforila Atg13 y las subunidades ULK1 en la serina 258 y la serina 757 (S757), respectivamente, para reprimir la actividad de ULK1 bajo condición enriquecida con nutrientes. La reducción de la disponibilidad de aminoácidos y glucosa, el estrés oxidativo, perturbaciones ambientales o un bloqueo farmacológico directo pueden inhibir a mTOR (Bialik *et al.*, 2018; Kim, *et al.*, 2018; Matsuzawa-Ishimoto *et al.*, 2018; Petherick *et al.*, 2015; Sarkar, 2013). En respuesta al estrés, mTOR se transloca a la superficie de los lisosomas, donde Rheb, una pequeña GTPasa, coloca estratégicamente mTOR muy cerca de AKT y p70S6 quinasa también conocida como proteína ribosómica S6 quinasa beta-1 (S6K1), que fosforilan mTOR en S2448 (Hwang *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2011).

Además de la inducción de aminoácidos y glucosa, la estimulación de IGF1R (receptores del factor de crecimiento similar a la insulina) es una de las vías más cruciales para regular la vía mTOR cuando se une al factor de crecimiento similar a la insulina. A través de la transducción de señales de efectores como IRS1 e IRS2 (sustratos del receptor de insulina), la fosforilación de AKT se activa e inhibe la actividad del complejo TSC1/TSC2 (proteína de esclerosis tuberosa 1/2), que finalmente actúa como un regulador negativo de la vía mTOR a través de Rheb (Zhou *et al.*, 2019). Por tanto, la abstinencia del factor de crecimiento conduciría finalmente a la inactivación de mTORC1 y a su vez, a la inducción de autofagia (Akers *et al.*, 2012).

5.2. AMPK.

La proteína quinasa activada-(AMPK) por monofosfato de adenosina (AMP) generalmente se considera el sensor de energía maestro porque promueve el cambio del anabolismo al catabolismo cuando se activa por una mayor proporción de AMP a ATP en condiciones de privación de energía (Krieg *et al.*, 2018). La proteína quinasa activada-AMP (AMPK) es una quinasa Ser/Thr conservada filogenéticamente que ha surgido como un importante integrador de señales para controlar el equilibrio energético celular. A nivel de todo el cuerpo, AMPK también integra respuestas de estrés como el ejercicio, así como señales de nutrientes y hormonales, para controlar la ingesta de alimentos, el gasto de energía y la utilización de sustratos (Oakhill *et al.*, 2018).

Una de las vías independientes de mTOR puede estar mediada por la vía IP3 (mioinositol-1,4,5-trifosfato) y la vía de la proteína alfa estimuladora de Ca²⁺ 12 -calpaína-G. La generación de IP3 induce la liberación de Ca²⁺ de las reservas en el retículo endoplásmico y los niveles altos de Ca²⁺ citosólico inhiben la autofagia al activar a las calpaínas. Después de la escisión por las calpaínas, la vía de la proteína alfa estimuladora Ca²⁺-calpaína-G se activa, lo que, a su vez, provoca la producción de más AMPc inhibidor (Pinton *et al.*, 2008; Rizzuto *et al.*, 2008). Por otro lado, la disminución de los niveles de señalización de IP3 conduce a una liberación reducida de Ca²⁺ del retículo endoplásmico y tasas más bajas de captación mitocondrial de Ca²⁺, lo que provoca una reducción en la actividad mitocondrial y el agotamiento de ATP, lo que da como resultado AMPK. La AMPK activada fosforila directamente ULK1, inactivando indirectamente el complejo mTOR, lo que conduce a la inducción de la autofagia (Sun *et al.*, 2016).

En condiciones de inanición de glucosa, AMPK promueve la autofagia al activar directamente ULK1 a través de la fosforilación de Ser317 y Ser777 (Kim, *et al.*, 2011). Uno de los procesos catabólicos activados por AMPK es la autofagia (figura 12), AMPK por un lado inhibe mTORC1 a través de la fosforilación de su subunidad reguladora Raptor en Ser792 y por otro lado a través de una fosforilación de activación ULK1/Atg1 en Ser555 (Krieg *et al.*, 2018).

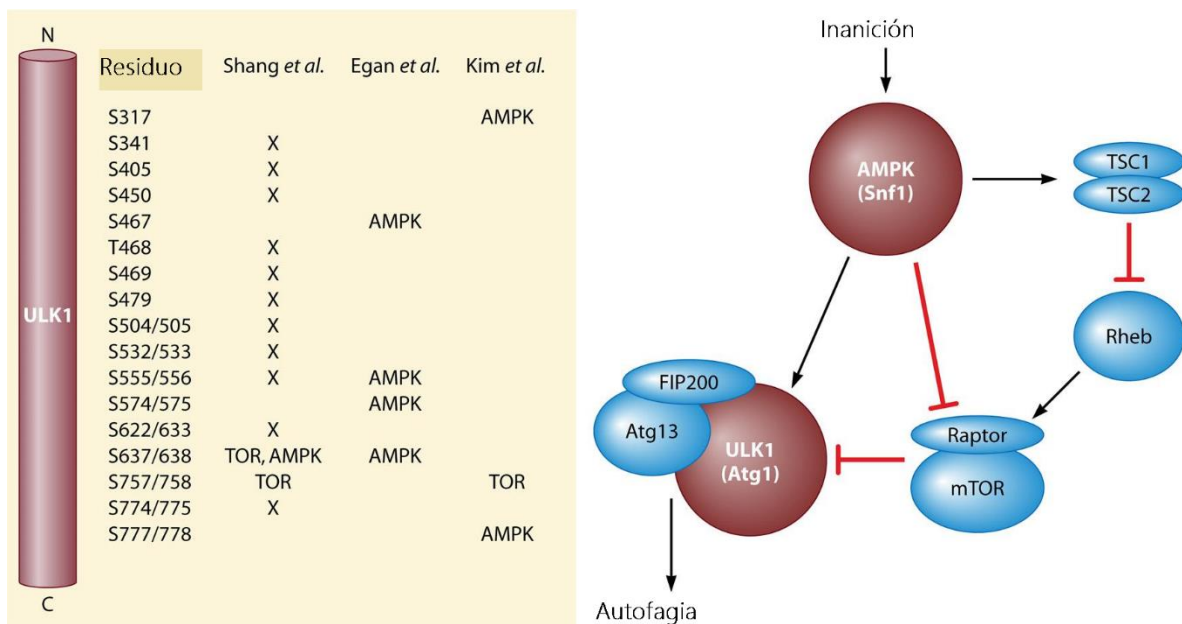


Fig.12. Papel de la proteína quinasa activada-AMP en el control de la autofagia. En los mamíferos, el mecanismo más establecido para la regulación de la autofagia por AMPK implica la inactivación de la vía TORC1 por deficiencia de nutrientes (I) por fosforilación y activación del factor de intercambio TSC2, que a su vez desactivará la Rheb GTPasa, y (II) por fosforilación de Raptor. A la izquierda, el recuento actual de los sitios de fosforilación ULK1 están vinculados a diferentes estudios correspondiente por **Egan *et al.*, 2011**; **Kim, *et al.*, 2011**; **Shang *et al.*, 2011**. Y la proteína quinasa potencialmente responsable, donde sea posible. “X” indica fosforilación por una proteína quinasa no identificada. Los nombres de los ortólogos de levadura de AMPK y ULK1, Snf1 y Atg1, se indican entre paréntesis. Los números de residuos ULK1 se enumeran como ratón/humano donde difieren (Imagen tomada y modificada de **Roach, 2011**).

5.3. TSC1/2.

El complejo de esclerosis tuberosa 1 (TSC1) y TSC2 son genes supresores de tumores que regulan negativamente la activación de mTORC1 (**Leung & Adashi 2019**). TSC1, un componente esencial de la vía de señalización pro-supervivencia PI3K/AKT/mTOR, juega un papel importante en procesos como el desarrollo, crecimiento y proliferación celular, supervivencia, autofagia y desarrollo de cilios al cooperar con una variedad de moléculas reguladoras (**Mallela y Kumar, 2021**).

TSC1 se encuentra en el cromosoma 9q34 y consta de 23 exones, que codifican la proteína TSC1 de 130 kDa, hamartina. TSC2 se encuentra en el cromosoma 16p13.3 y consta de 42 exones que codifican la proteína TSC2 de 200 kDa, la tuberina. TSC1 y TSC2, junto con una tercera subunidad, TBC1D7 5, forman un complejo proteico estable, el complejo TSC. El complejo TSC1/2 (hamartina-tuberina), a través de su actividad GAP (proteína activadora de GTPasa) hacia la pequeña proteína G Rheb (homólogo de Ras enriquecido en el cerebro), controla el crecimiento, el metabolismo y la proliferación celular suprimiendo la activación de mTORC1 a través de mecanismos tipo GTPasas (**Di Nardo, *et al.*, 2014**; **Huang, *et al.*, 2013**; **Larsen y Møller, 2020**).

mTORC1 controla los procesos anabólicos para promover el crecimiento celular y posee una alta sensibilidad a las alteraciones en las condiciones de crecimiento celular. A través de numerosos eventos de fosforilación, el complejo TSC1-TSC2 ha emergido como el sensor e integrador de estas

condiciones de crecimiento, transmitiendo señales de diversas vías celulares para modular adecuadamente la actividad de mTORC1 (Huang y Manning, 2008).

TSC1 interactúa con TSC2 y TBC1D7 [miembro 7 de la familia de dominios Tre2-Bub2-Cdc16 (TBC) 1] en el citoplasma para formar un complejo multimérico TSC1-TSC2-TBC1D7, que suprime el crecimiento celular al inhibir la actividad de mTORC1 a través de una pequeña proteína GTPasa RHEB. Este complejo, que es el nodo central de la vía PI3K/AKT/mTOR, actúa como un integrador de varias vías de señalización, incluida la hormona del crecimiento (vías de insulina-IGF-AKT, WNT/GSK3, ERK/RSK), el estado energético de la célula (AMPK), factores de estrés como la hipoxia (REDD1) y las citocinas (IKK β /NF κ B), y desempeña un papel crucial en el crecimiento celular, la proliferación, la supervivencia y la autofagia (Mallela y Kumar, 2021).

Un mecanismo de regulación de mTORC1 implica la señalización del factor de crecimiento, que promueve la actividad de mTORC1 en gran parte a través de la inhibición del complejo TSC1/2 (figura 13).

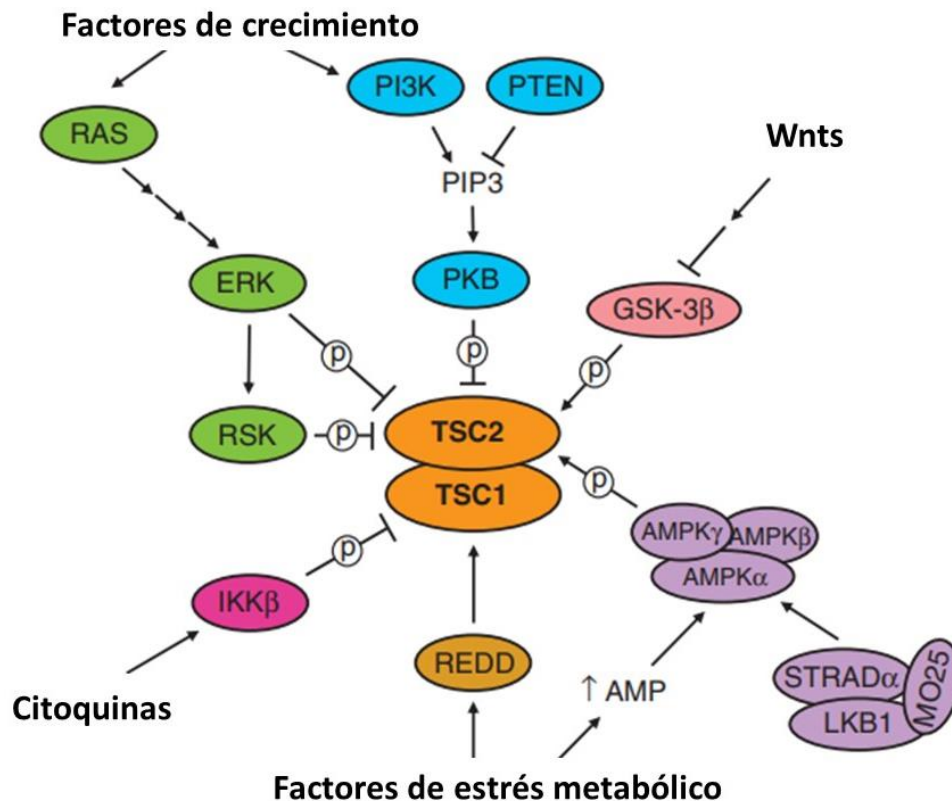


Fig.13. Regulación del complejo TSC1/2. El complejo TSC1/2 se regula a través de varias vías de señalización y sirve como nexo que integra información sobre recursos intra y extracelulares de crecimiento, nutrientes y factores metabólicos. Tras el estrés metabólico, la activación de AMPK dependiente de AMP por parte de LKB1 da como resultado la fosforilación y activación de TSC2. En condiciones de hipoxia, se activa la transcripción de REDD, lo que induce el complejo TSC1/2. TSC2 también es activado por su fosforilación por GSK3 β , que es inhibida por la señalización Wnt activada por ligando Wnt. La estimulación del factor de crecimiento de sus receptores correspondientes activa las vías RAS/ERK y PI3K/PKB, que posteriormente conducen a la fosforilación e inhibición de

TSC2. La inhibición del complejo TSC1/2 también es provocada por la fosforilación inducida por citoquinas por IKKb (imagen tomada y modificada de **van Veelen et al., 2011**).

La regulación de TSC1/2 en este entorno se produce como resultado de la fosforilación de TSC2 a través de múltiples vías de señalización de factores de crecimiento, incluidas PI3K/AKT, MEK/ERK/RSK y MAPK/MK2. De manera antagónica, TSC2 es activado por fosforilación a través de la vía LKB1/AMPK, contribuyendo a la inhibición de mTORC1 en situaciones de privación de energía y estrés hipóxico a largo plazo (**DeYoung et al., 2008**).

La activación de IGF1R es una de las vías cruciales para regular a mTOR cuando se une al factor de crecimiento similar a la insulina. A través de la transducción de señales de efectores como IRS1 e IRS2, la fosforilación de AKT se activa e inhibe la actividad del complejo TSC1/TSC2, que eventualmente actúa como un regulador negativo de la vía mTOR a través de Rheb (**Zhou et al., 2019**). Rheb pertenece a una familia única dentro de la superfamilia Ras de proteínas G, está muy conservada desde la levadura hasta el humano. Los eucariontes poseen una Rheb mientras que en las células de mamíferos se presentan dos (**Parmar y Tamanoi, 2010**).

En mamíferos, TSC2 es fosforilada por la AKT activada y ello contribuye al desensamble y/o degradación del complejo TSC1/2 (**Zhang et al., 2003**). El complejo TSC1/2 suprime el crecimiento celular al regular negativamente una proteína quinasa, p70S6K (S6K1), que generalmente requiere señales PI3K para su activación (**Harrington et al., 2004**).

Cuando se genera estrés celular por depleción de glucosa y/o hipoxia, aumentan los niveles de AMP y disminuyen los de ATP por falta en la producción de energía. La proteína LKB1 (STK11, serina quinasa treonina 11) forma un complejo con STRAD (proteína adaptadora relacionada a Ste-20) y MO25 (proteína murina 25), LKB1-STRAD-MO25, forma mediante la cual se hace más activa. Este complejo fosforila a AMPK, sensor de estrés celular y lo activa. AMPK ejerce, su actividad quinasa sobre TSC2, activando el complejo TSC1/TSC2, lo que permite el secuestro de Rheb, el consecuente bloqueo de la vía raptor/mTOR y por tanto del crecimiento celular permitiendo la conservación energética en condiciones adversas (**Pinzón et al., 2009**).

5.4. AKT/PBK.

AKT, también conocida como proteína quinasa B (PBK), es una serina-treonina quinasa que desempeña un papel importante en una variedad de procesos biológicos incluida la supervivencia celular, el crecimiento celular, la expresión génica, la oncogénesis, la organización citoesquelética, el tráfico de vesículas, el transporte de glucosa y la función plaquetaria (**Park et al., 2002; Noguchi, et al., 2014**). La desregulación o mal funcionamiento de AKT contribuye a una amplia variedad de enfermedades humanas, incluidos cánceres, intolerancia a la glucosa, esquizofrenia, infecciones virales y enfermedades autoinmunes (**Noguchi et al., 2014**).

La vía de señalización PI3K/AKT/mTOR regula una amplia gama de procesos celulares que incluyen la supervivencia, la proliferación, el crecimiento, el metabolismo, la angiogénesis, la transcripción, la traducción, la metástasis y juega un papel importante en la autofagia (figura 14).

La inducción de la autofagia puede ocurrir a través de PI3K de clase 1 (PI3K-1) y mTORC2 o mediante mTORC1. La señalización de PI3K1/mTORC2 fosforila AKT en respuesta a ligandos extracelulares. A continuación, AKT fosforila mTOR en la serina 2448 y activa mTORC1, que inhibe la autofagia dirigiéndose a la proteína Atg 13 (Datan *et al.*, 2014).

La AKT activa promueve la acción de mTORC1 por dos medios: (1) reduciendo la interacción del sustrato de AKT rico en prolina de 40 kDa (PRAS40) con mTORC1 y (2) fosforilando e inactivando al complejo proteico compuesto de TSC1/TSC2 y TBC1D7 (Laplante y Sabatini, 2013). Además, el componente PRAS40 de mTORC1 se ha identificado como un sustrato directo de AKT y los datos sugieren que esta fosforilación es responsable de la activación de mTORC1 a través de la señalización de la insulina (Alers *et al.*, 2012).

6. Ovario.

El ovario es el órgano reproductor de las hembras en los animales vertebrados, está conformado por cuatro estructuras: corteza, médula, epitelio superficial y la túnica albugínea (figura 15) (Ross, 2015).

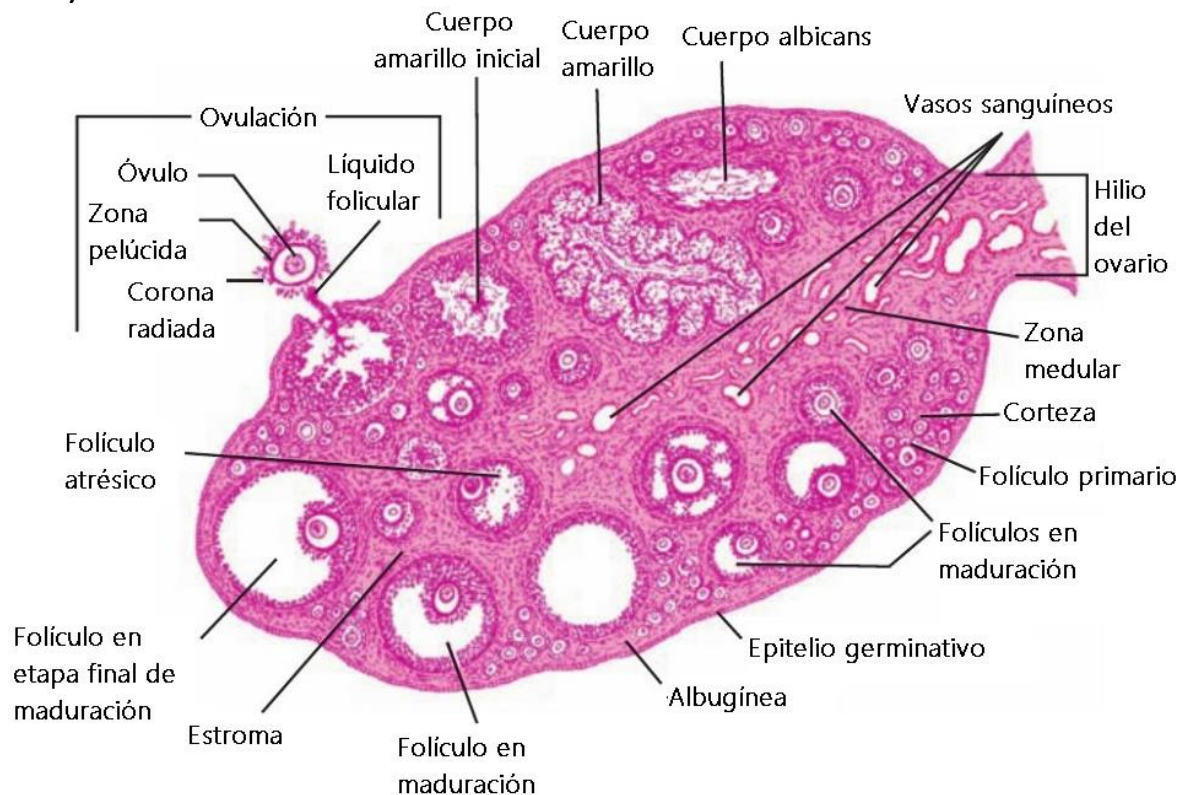


Fig.15. Esquema de un corte longitudinal de ovario. Estructura ovárica en donde se observan vasos sanguíneos, zona medular, corteza, células epiteliales y túnica albugínea. También se muestran las etapas del desarrollo de los folículos, desde el folículo primordial hasta el folículo de Graaf y un ovocito en ovulación (Imagen tomada y modificada de Valentich *et al.*, 2008).

El epitelio germinal o superficial está constituido por epitelio simple cúbico, estas células recubren al ovario, la túnica albugínea está localizada debajo del epitelio cúbico y está compuesto por tejido conectivo denso irregular. La corteza incluye a los folículos en diferentes niveles de maduración, está recubierta por un estroma con células de fibroblasto y una espesa capa de fibras de colágena.

La región medular se encuentra en el centro del ovario y está compuesto por fibras de colágena, fibras elásticas, tejido conectivo laxo, nervios, vasos linfáticos y vasos sanguíneos, además presenta una alta vascularización (Gartner y Hiatt, 2006; Geneser *et al.*, 2015; Junqueira, 2015; Ross, 2015).

La morfofisiología del ovario posee una dinámica que está relacionada con la etapa de desarrollo de los organismos. Desde la fase de desarrollo embrionario, el ovario adquiere una organización que permite el establecimiento de estructuras altamente especializadas denominadas folículos (Kierszenbaum y Tres, 2015). Los folículos ováricos están formados por un ovocito y la capa de epitelio circundante (figura 16), además tienen dos funciones principales, la producción de hormonas y ovocitos (Geneser *et al.*, 2015; Kierszenbaum y Tres, 2015). El ciclo ovárico abarca tres fases: 1. La fase folicular (foliculogénesis), 2. La fase ovulatoria y 3. La fase lútea (Kierszenbaum y Tres, 2015). La fase folicular consiste en el desarrollo secuencial de varios folículos primordiales: a. Folículo primario (de una sola capa), b. Folículo secundario (multicapa), c. Folículo preantral., d. Folículo antral y e. Folículo preovulatorio (folículo de Graaf) (Kierszenbaum y Tres, 2015).

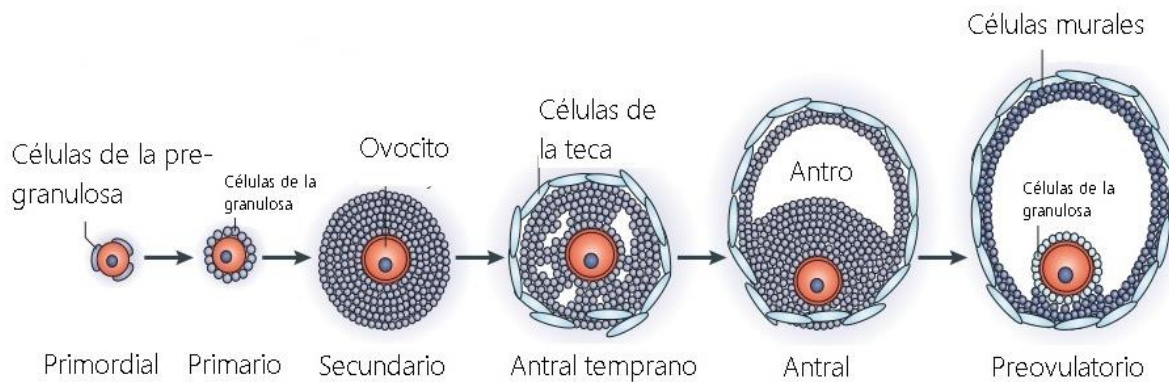


Fig.16. Desarrollo folicular e interacción del ovocito con células somáticas. Los ovocitos de mamíferos se desarrollan dentro de los folículos ováricos, que consisten en células estromales (conocidas como células de la teca) en el exterior de una membrana basal (no se muestra) y células epiteliales (conocidas como células de la granulosa) dentro de la membrana basal que hacen contacto directo con la superficie del ovocito. A medida que crecen los folículos, las células de la granulosa proliferan mitóticamente hasta que aparece una cavidad llena de líquido (el antro) en las últimas etapas del desarrollo del folículo (Imagen tomada y modificada de Li y Albertini, 2013).

Folículos primordiales. Se encuentran en gran número en la corteza ovárica por debajo de la túnica albugínea. Un folículo primordial (figura 17) se compone de un único ovocito y una capa circundante de células epiteliales aplanadas, las células foliculares (Geneser *et al.*, 2015; Kierszenbaum y Tres, 2015).

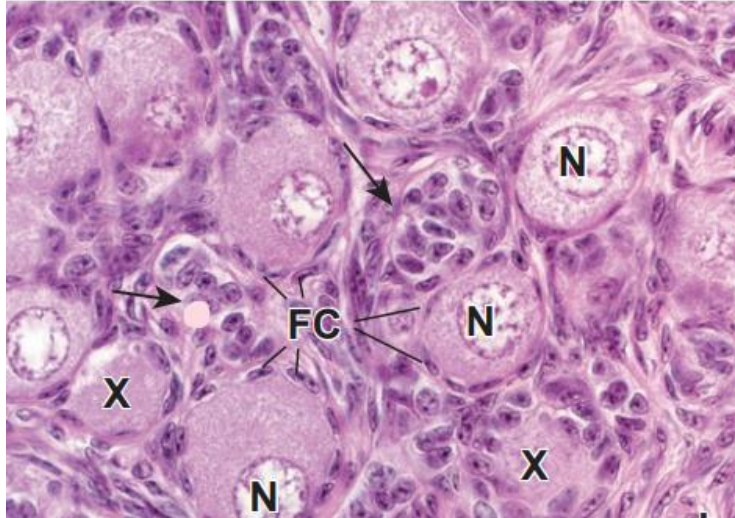


Fig.17. Folículos primordiales. Imagen tomada y modificada de **Ross 2015**. Fotomicrografía de los folículos primordiales, en la profase de la primera división meiótica. Muestra los ovocitos rodeados por una capa simple de células foliculares aplanadas (FC), el núcleo (N). Se señalan dos ovocitos en los cuales el núcleo no está incluido en el plano de corte (X). En forma similar, hay dos folículos (flechas) que se cortaron tangencialmente y por ello sólo se ven las células foliculares y no el ovocito que ha quedado en otro plano. 640X (**Ross 2015**).

Folículos primarios (una sola capa de células foliculares cúbicas). Los folículos primordiales se convierten en folículos primarios (figura 18). El ovocito aumenta de tamaño y las células foliculares aplanadas crecen en altura hasta tornarse una forma cuboidal. Adquieren un aspecto granular y se denominan células de la granulosa, que proliferan y forman un epitelio estratificado (**Geneser et al., 2015; Kierszenbaum y Tres, 2015**).

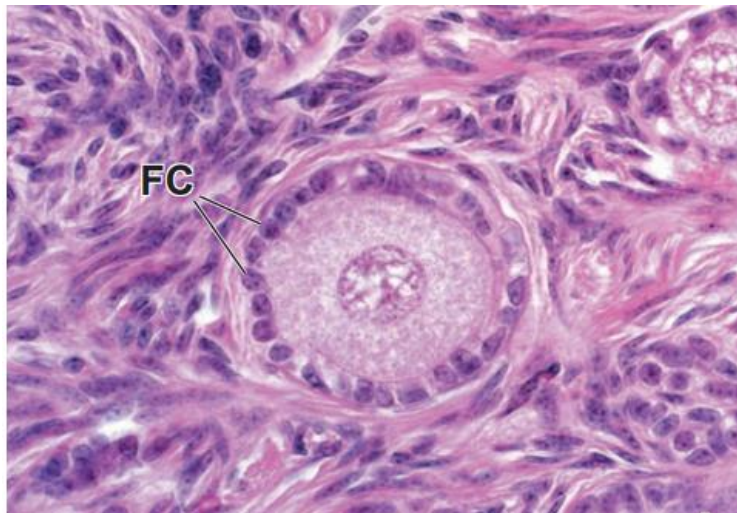


Fig.18. Fotomicrografía de un folículo primario. Imagen tomada y modificada de **Ross 2015**. Una capa simple de células foliculares (FC) cúbicas rodea el ovocito en crecimiento 640 X (**Ross 2015**).

Folículos secundarios (multicapa de células foliculares cúbicas) (Figura 19). Las células de la granulosa proliferan en un epitelio cuboidal estratificado. Una capa celular o teca rodea el folículo.

La teca comienza a organizarse en dos capas distintas: 1. La teca interna, constituida por una capa de células vascularizadas adyacente a la lámina basal que sostiene a las células de la granulosa del folículo. 2. La teca externa, que es una capa celular fibrosa continua con el estroma ovárico (**Kierszenbaum y Tres, 2015**).

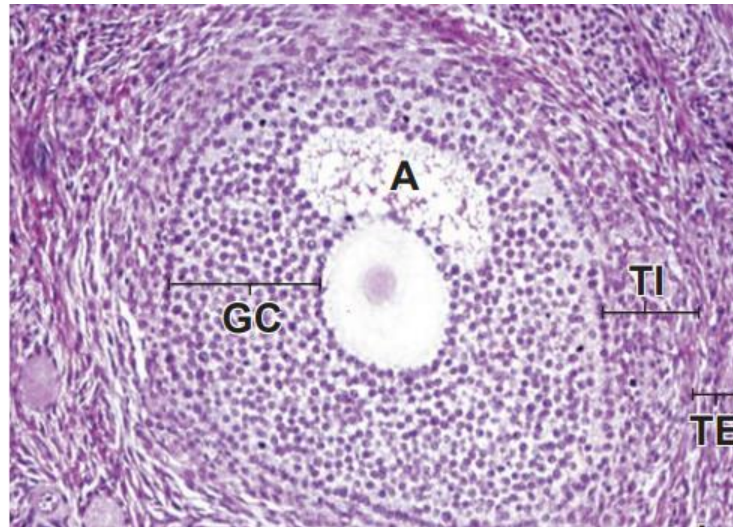


Fig. 19. Fotomicrografía de un folículo secundario. Dentro del estrato granuloso (GC) es visible el antro (A), lleno de líquido folicular. Por fuera de la lámina basal del folículo secundario se pueden observar múltiples capas de células de la teca interna (TI) y de células de la teca externa (TE). 853 X (Imagen tomada y modificada de **Ross, 2015**).

Folículos preantrales. Se desarrollan pequeños espacios intercelulares, llamados cuerpos de *Call-Exner*, entre las células de la granulosa. Estos espacios contienen líquido folicular (folículos licorosos) (**Kierszenbaum y Tres, 2015**).

Folículo antral. Los cuerpos de *Call-Exner* se fusionan en un solo espacio llamado antro (figura 20). En esta etapa, las células de la granulosa, estimuladas por la FSH, sintetizan y secretan activamente estrógeno (**Kierszenbaum y Tres, 2015**).

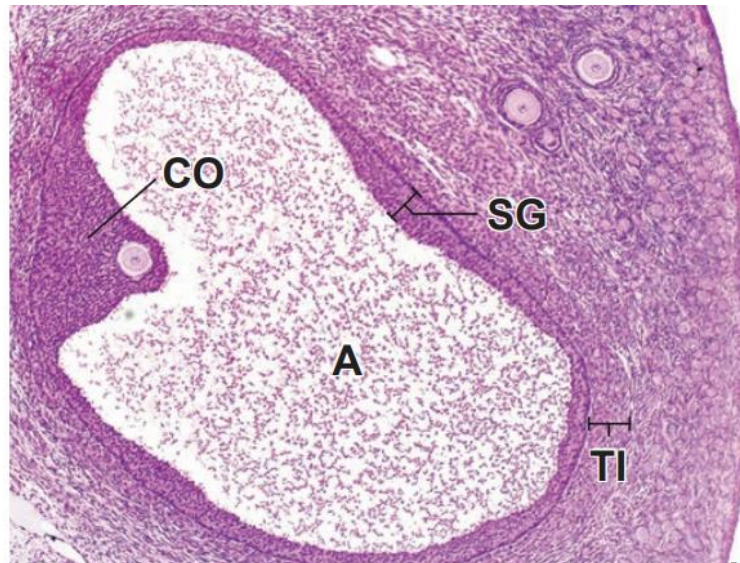


Fig. 20. Folículo antral en una etapa avanzada de su desarrollo. Nótese el gran antro (A) lleno de líquido y el cúmulo ovóforo (CO) que contiene al ovocito. Las células restantes que rodean la luz del antro forman la membrana granulosa (el estrato granuloso, SG). La superficie del ovario es visible sobre la derecha. Se debe notar la presencia de dos folículos primarios (arriba, a la derecha). TI, teca interna. 453 X (Imagen tomada y modificada de **Ross, 2015**).

Folículo preovulatorio (folículo de Graaf). El antro alcanza su tamaño máximo. El líquido del antro segrega las células de la granulosa en tres regiones específicas: 1. El *cumulus oophorus*, 2. Las células murales de la granulosa, que recubren la pared del folículo y 3. La corona radiata (**Kierszenbaum y Tres, 2015**). El ovocito grande y redondo tiene un núcleo esférico colocado excéntricamente con cromatina dispersa y una envoltura nuclear irregular. El citoplasma del ovocito circundante contiene una serie de orgánulos que incluyen filamentos citoplasmáticos muy compactos, mitocondrias esféricas, ribosomas libres, vesículas variadas y perfiles de retículo endoplásmico. La zona pelúcida es una capa extracelular gruesa entre el ovocito y las células de la granulosa del folículo. Las microvellosidades delgadas del ovocito y las células de la granulosa se extienden hacia la zona pelúcida (**William, 2013**).

6.1. Atresia folicular.

Muchos factores regulan el proceso de desarrollo del folículo ovárico, que incluye factores endocrinos, paracrinos y autocrinos destinados a promover la ovulación; sin embargo, solo el 1% o menos de los folículos del ovario alcanzan la etapa preovulatoria y aproximadamente el 99% de los folículos sufren atresia en los ovarios de mamíferos, por lo que solo unos pocos folículos ovulan durante la vida sexual activa (**Hirshfield, 1991; Zheng, et al., 2019**). La atresia folicular es un fenómeno consistente en la pérdida o eliminación de la mayoría de los ovocitos antes de llegar a la ovulación (**Flores-Pérez, et al, 2005**). Este proceso degenerativo es natural y ocurre en diferentes etapas de desarrollo, es esencial para la homeostasis ovárica en vertebrados (**Zhou, et al., 2019**). A partir del desarrollo fetal y progresando hasta la pubertad, la madurez y la menopausia, la mayoría de los folículos, ya sean folículos primordiales o etapas posteriores del desarrollo, degeneran (figura 21).

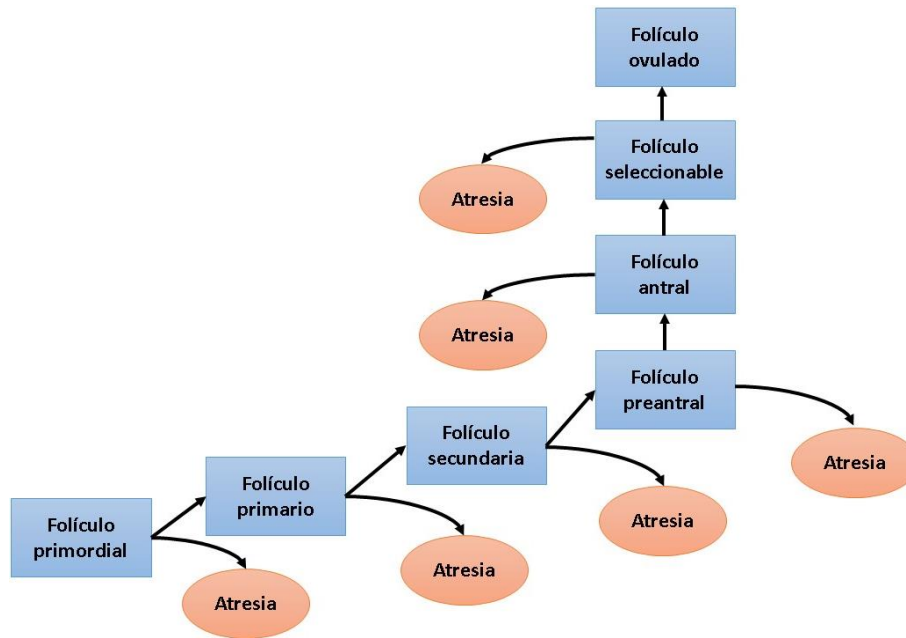


Fig. 21. Atresia folicular en diferentes estados del desarrollo del ovocito. La atresia folicular puede ocurrir en diferentes fases foliculares. Los folículos que no se eliminan durante este proceso, continúan creciendo hasta llegar a la fase de ovulación (Imagen tomada y modificada de **Vázquez-Nin et al., 2011**).

La atresia o involución de los folículos, ocurre primero en el ovocito, que se encoge y se somete a citólisis. Entonces se produce la degeneración de las células foliculares: se vuelven picnóticas, se desprenden unas de otras. La zona pelúcida se hincha y puede durar largos períodos. Las células de la teca se organizan en cordones vascularizados, se degeneran y son reemplazadas por tejido conectivo (**William, 2013**).

IV. Antecedentes

Diversos estudios han descrito la presencia del proceso autofágico en el ovario de diferentes organismos como ratón, rata, ganso, puerco, ave e incluso en humanos (**Kumariya et al., 2021**). El abordaje de este proceso dentro del ovario ha incluido su análisis como un evento de citoprotección, de progresión de desarrollo y maduración de las células germinales (**Costas y Rubio, 2017**). Sin embargo, también se ha evidenciado que la autofagia puede participar como un proceso de eliminación adicional a la apoptosis durante el evento de atresia folicular (**Escobar et al., 2010, 2012**) En el caso específico de ratas Wistar en etapa prepúber, ha sido documentado que la autofagia se presenta como un proceso de eliminación de ovocitos (**revisado en Vázquez-Nin et al., 2011**). El análisis puntual de edades previas a la ovulación ha permitido establecer que la muerte tipo autofágica tiene un papel importante a la edad de 19 y 28 días, incluso se ha mostrado que los ovocitos pueden ser eliminados por una combinación entre apoptosis y autofagia (**Escobar et al., 2008**).

La participación de la autofagia durante la atresia folicular, no se ha limitado al ovocito, ya que se ha evidenciado que proteínas importantes para que se lleve a cabo el proceso autofágico como LC3, pueden estar expresadas en células de la granulosa (**Liu et al., 2021**). Así mismo, en sistemas

experimentales se ha demostrado que la autofagia juega un papel importante en la regulación del desarrollo folicular y la atresia (Choi *et al.*, 2010).

V. Planteamiento del problema

La atresia folicular en ovario de rata prepúber es un proceso que implica la eliminación de los folículos en diferentes estados de desarrollo incluyendo a los que han alcanzado la etapa antral y que sin embargo no serán ovulados. Lo anterior debido a las condiciones fisiológicas de los organismos en donde no se ha establecido el eje hipófisis-hipotálamo-ovario, ya que los individuos no han alcanzado la pubertad. Lo anterior, permite tener un modelo fisiológicamente normal, en donde la muerte celular es elevada sin necesidad de introducir agentes extraños en los individuos de estudio. Existen evidencias de que las células de la granulosa y los ovocitos del ovario de rata en organismos prepúberes, pueden ser eliminados por más de una vía de muerte celular, que incluye a la muerte tipo autofágica. Aunque ha sido demostrado que la autofagia se encuentra presente durante la atresia folicular de ratas prepúberes, los mecanismos que promueven a la autofagia no se han establecido.

VI. Hipótesis

Durante la atresia folicular se pierden las uniones celulares entre las células somáticas y las células germinales, lo que provoca una limitación de factores de crecimiento y metabolitos hacia el ovocito. Si la limitación de nutrientes y oxígeno están relacionadas con la activación de la autofagia, entonces se esperaría que proteínas censoras como TSC1 y TSC2 presentaran cambios en los ovocitos de folículos atrésicos con respecto a los ovocitos normales.

VII. Objetivos.

- Identificar la posible presencia/ausencia de las proteínas TSC1 y TSC2 en ovocitos de ovario de rata de 19 y 28 días de nacidas, durante la atresia folicular.

Objetivos particulares.

1. Identificar las características morfológicas de los folículos atrésicos en ovarios de rata de 19 y 28 días.
2. Analizar la presencia de la muerte tipo autofágica por medio de la detección de las proteínas LC3A y BECN1 en ovocitos de ovario de rata de 19 y 28 días.
3. Identificar la influencia de la limitación de nutrientes en ovocitos autofágicos mediante la detección de las proteínas mTOR y ULK1 (S555 y S757).
4. Describir la presencia/ausencia de las proteínas TSC1 y TSC2 en ovocitos en proceso de eliminación tipo autofágico.

VIII. Material y métodos.

i. Procesamiento del material biológico para microscopía óptica.

Se utilizaron 6 ratas *Rattus norvegicus albinus* (Wistar) de 19 y 28 días de nacidas. La manipulación de los organismos se realizó según indican 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 fueron anestesiadas en una cámara saturada con gases de isoflurano (Sofloran Vet Pisa, SAGARPA Q-7833-222) luego se realizó la extracción quirúrgica de los ovarios, finalmente fueron eutanasiadas cortando el corazón.

1. Extraer ovarios derecho e izquierdo de ratas Wistar de 19 y 28 días de edad (3 ratas distintas de cada edad).
2. Fijar las muestras en paraformaldehído al 4% preparado en PBS durante 2 horas.
3. Lavar 3 veces con PBS durante 1 hora.
4. Deshidratar las muestras con las siguientes soluciones graduales de alcohol durante 60 minutos en cada una:

30%

50%

60%

70%

80%

90%

100% (2 cambios)

5. Colocar las muestras en una mezcla de etanol-xilol (1:1) 30 minutos.
6. Extraer la solución y agregar Xilol-Aceite de cedro (1:1) durante 30 minutos.
7. Retirar la solución y añadir parafina-xilol y dejar reposar durante una hora a 58°C.
8. Depositar las muestras en parafina pura (Parafina 1), y dejar reposar 60 minutos a 58°C.
9. Depositar las muestras en parafina pura (Parafina 2), y dejar reposar 60 minutos a 58°C.
10. Antes de iniciar el proceso de inclusión, calentar las pinzas con las que se manipularán las muestras.
11. En moldes plásticos, agregar parafina pura a 58°C y acomodar las muestras en el centro del molde.
12. Por último, dejar enfriar las muestras a temperatura ambiente para que solidifique la parafina.

ii. Tinción Hematoxilina-Eosina.

1. Elaborar cortes histológicos seriados, con un espesor de 7 µm. Realizar cortes de los ovarios derecho e izquierdo. Colocar los cortes en portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina y dejar dentro de la estufa a 37°C durante 24 horas.
2. Para iniciar la desparafinación, colocar los cortes histológicos dentro de la estufa durante 10 minutos a una temperatura de 60°C.
3. Sacar los cortes histológicos de la estufa y dejarlos enfriar a temperatura ambiente.
4. Desparafinar los cortes colocándolos en Xilol durante 10 minutos y posteriormente, en cada uno de los siguientes alcoholes graduales, durante 10 minutos:

Xilol absoluto
Etanol absoluto
Etanol 90%
Etanol 70%
Etanol 50%
Etanol 30%

5. Enjuagar durante 10 minutos en agua destilada.
6. Sumergir los cortes en PBS durante 10 min.
7. Sumergir los cortes desparafinados en hematoxilina durante 10 minutos. Retirar el colorante.
8. Enjuagar durante 10 minutos en agua corriente.
9. Sumergir las muestras en agua destilada, posteriormente en etanol ácido (HCl 1% en Etanol al 70%) después en agua amoniacal (NH₄OH 1%) y finalmente en etanol al 50% durante unos segundos.
10. Depositar en eosina alcohólica durante 10 minutos.
11. Enjuagar por unos segundos los cortes histológicos en las siguientes soluciones:
 - Etanol 80%.
 - Etanol 90%.
 - Etanol absoluto.
 - Etanol-Xilol.
 - Xilol absoluto.
12. Realizar el montaje de las muestras con resina sintética y dejar secar dentro de la estufa a 40°C.
13. Observar en el microscopio Nikon Eclipse E600 y tomar fotografías de las secciones de los ovarios utilizando una cámara digital Nikon DXM1200.

iii. Inmunolocalización de las proteínas BECN1, LC3A, mTORp2448, TSC1, TSC2, ULK1-555 y ULK1-757.

1. Desparafinar e hidratar los cortes histológicos.
2. Enjuagar en PBS 1X durante 10 minutos.
3. Para la recuperación antigénica, colocar los cortes histológicos en un vaso de coplin con buffer de citratos (BioGenex). En baño María, introducir al microondas el vaso de coplin en potencia 10 con una duración de 3 minutos, posteriormente a una potencia de 3 durante 6 minutos.
4. Dejar enfriar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
5. Bloquear con Glicina 100 mM en PBS
6. Lavar con PBS (3 lavados de 3 minutos cada uno)

Tabla 4. Anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia.			
	Especies hospedadoras	Proveedor/Catálogo	Concentración α $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ de PBS 1X
Anticuerpo primario (α)			
Anti-BECN1	Conejo.	Abcam, ab62557	1/50
Anti-LC3-A	Ratón.	Abcam, ab168803	1/100
Anti-mTORp	Conejo.	Abcam, ab84400	1/50
Anti-TSC1	Conejo.	Merck, PRS3505	1/200
Anti-TSC2	Ratón.	LSBio-LSb613	1/200
Anti-ULK1-555	Conejo.	<i>Cell Signaling Technology. D7O6U</i>	1/50
Anti-ULK1-757	Conejo.	<i>Cell Signaling Technology. D7O6U</i>	1/200
Anticuerpo secundario			
AlexaFluor 488 (GAM) FITC	Cabra	<i>Life technologies. A-11034</i>	1/200
AlexaFluor 594 (GAM) RT	Raton	<i>Life technologies. A-11032</i>	1/200
AlexaFluor 594 (GAR) RT	Cabra	<i>Life technologies. A-11037</i>	1/200

7. Incubar con anticuerpo primario en cámara húmeda a 4°C durante toda la noche (Tabla 4).
8. Lavar 3 veces en PBS (cada 3 minutos).
9. Incubar con anticuerpo secundario durante 2 horas (Tabla 4).
10. Lavar 3 veces en PBS (cada 3 minutos).
11. A cada muestra agregar DAPI (SIGMA) (10 μM) durante 1 minuto.
12. Lavar 3 veces en PBS (cada 3 minutos).
13. Agregar medio de montaje *Fluoroshield Eyedropper* (abcam).
14. Digitalizar imágenes.

iv. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia.

1. Cuantificar la fluorescencia de las imágenes capturadas digitalmente, utilizando el programa Image J (Programa de Java de procesamiento y análisis de imágenes).
2. Analizar los datos de intensidad de fluorescencia (píxeles/cm²) realizando una prueba de *t* de *Student* con un valor de significancia de $P < 0.05$ con una "n" de 30 para los ovocitos caracterizados como normales, autofágicos y apoptóticos, para determinar si hay diferencias entre la expresión de las proteínas autofágicas en ovocitos atrésicos y los ovocitos sanos.

IX. Resultados.

1. *Morfología del desarrollo folicular en ovario de rata de 19 y 28 días.*

Las tinciones con hematoxilina y eosina permitieron observar la morfología de los folículos en los ovarios de ratas de 19 y 28 días de edad. Se identificaron folículos en diferentes etapas del desarrollo folicular como primarios, secundarios, preantrales y antrales de diferentes tamaños (figuras 23 y 24). Los folículos en atresia se identificaron por el cambio de la forma del folículo de redondo a ovalado, las células de la granulosa se encuentran separadas entre sí y han perdido el contacto con el ovocito (figuras 22 y 23).

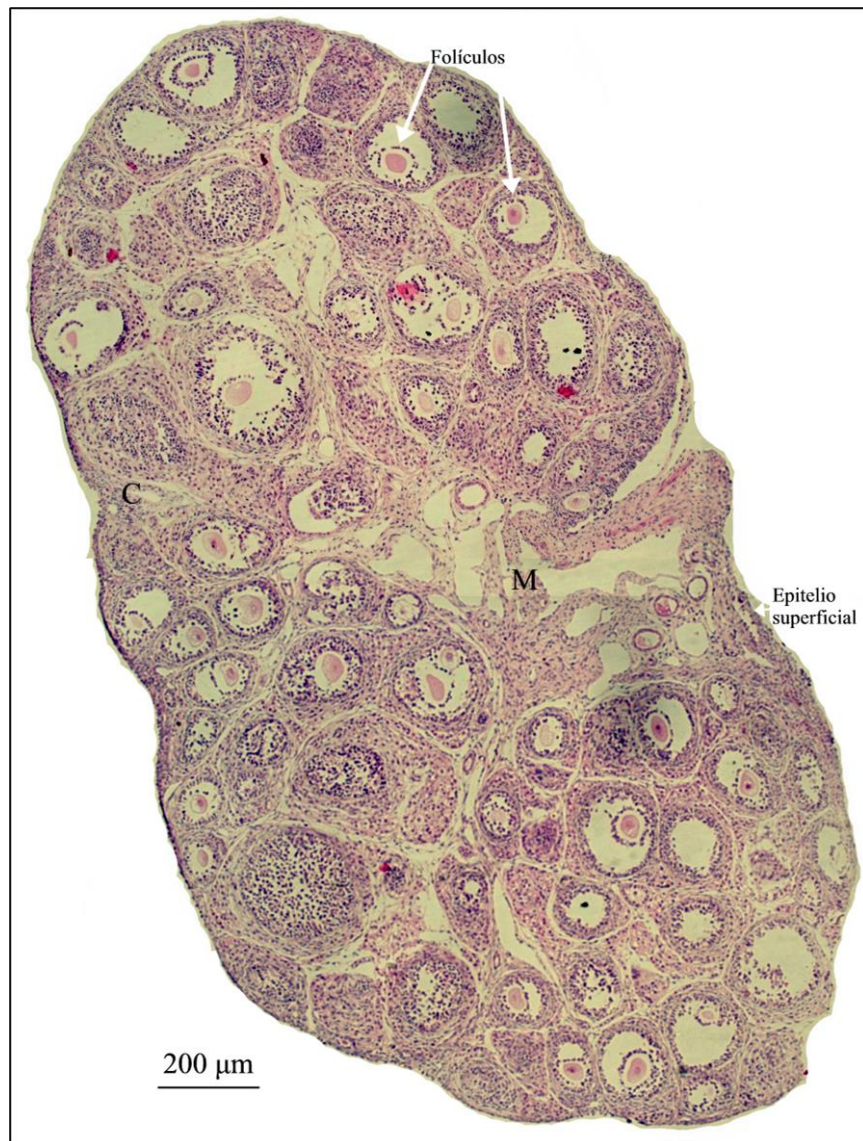


Fig. 22. Corte longitudinal de ovario de rata de 19 días teñido con hematoxilina y eosina. Se observa el epitelio superficial recubriendo el ovario, también se aprecia la corteza (C) en donde se encuentran folículos en distintas etapas del desarrollo. En el centro se encuentra la médula (M).

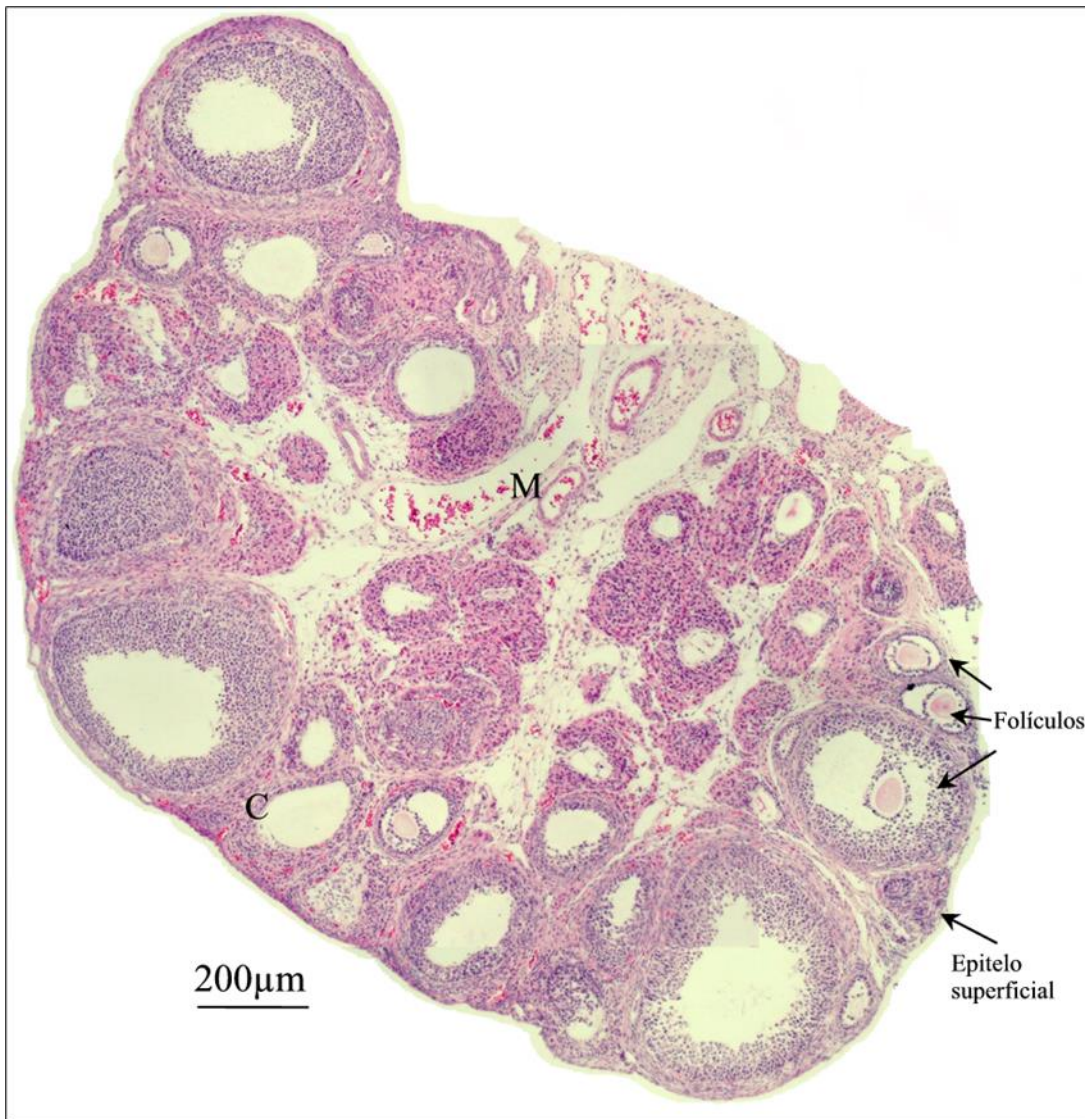


Fig. 23. Corte longitudinal de ovario de rata de 28 días teñido con hematoxilina y eosina. En este corte se aprecia el epitelio superficial recubriendo el ovario, se observa la corteza (C) en donde se encuentran folículos en distintas etapas del desarrollo. Ubicada en el centro se encuentra la medula (M).

Las observaciones al microscopio óptico, utilizando objetivos de 100X (figuras 24 y 25), evidenciaron que los ovocitos de folículos atrésicos presentan una forma irregular, las células de la granulosa se compactan, pierden las conexiones celulares con el ovocito y se separan entre ellas. Adicionalmente, se identificó que varios ovocitos presentaban regiones claras en el citoplasma, estas regiones corresponden a vesículas claras. En la figura 24A, se observa un folículo primario cuyo ovocito presenta forma irregular y regiones claras en el citoplasma. La figura 24B muestra un folículo primario, en donde aprecia la separación que

existe entre las células de la granulosa y el ovocito. En el citoplasma del ovocito se distinguen múltiples vesículas claras. En la figura 24C, se identifica un folículo preantral. Este folículo presenta un ovocito que ha perdido su forma circular, además se encuentran múltiples vesículas citoplasmáticas. Otra característica importante es que las células de la granulosa presentan una separación del ovocito. La figura. 24D, muestra un folículo antral atrésico, dentro del folículo el ovocito ha perdido su morfología regular y las células de la granulosa ya no están en contacto con el ovocito. En el citoplasma del ovocito se aprecian vesículas claras. Las imágenes E y F corresponden a folículos antrales atrésicos, en estas imágenes es posible observar que las células de la granulosa se han separado por completo del ovocito, de igual forma, en el citoplasma del ovocito se observan abundantes vesículas claras. Asimismo, se observa que ambos ovocitos han adquirido una forma irregular.

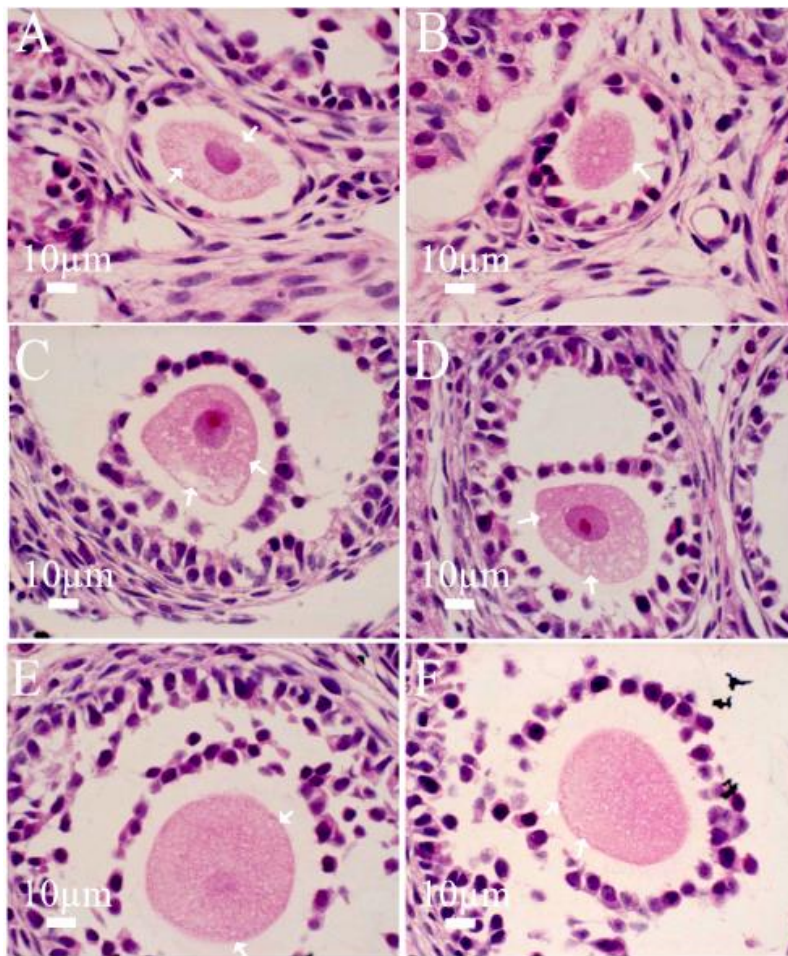


Fig. 24. Cortes de ovario de rata de 19 días de edad. A) folículo primario, una capa simple de células de la granulosa rodea al ovocito que tiene una forma ovalada. B) muestra un folículo primario cuyo ovocito posee una morfología irregular, las células de la granulosa están separadas del ovocito. Las imágenes C) y D) folículos preantrales; E) y F) folículos antrales. Los folículos de C a F poseen ovocitos en los que se aprecia el citoplasma con vesículas claras (flechas). Tinción hematoxilina y eosina.

Con respecto a los ovarios de rata de la edad de 28 días, se identificaron folículos en diferentes etapas del desarrollo. Los folículos atrésicos presentan ovocitos con formas irregulares, las células de la granulosa se encontraban separadas entre ellas y se perdían las conexiones entre los ovocitos y las células de la granulosa (figura 25). La figura 25A, muestra un ovocito primario cuyo citoplasma posee vacuolas claras. La figura 25B, ilustra un folículo secundario, existe una clara separación entre las células de la granulosa, el ovocito presenta vacuolas claras en su citoplasma y una forma irregular. En la figura 25C, se observa un folículo antral, que presenta un ovocito que conserva su forma redondeada, en el citoplasma se aprecian vesículas claras y las células de la granulosa se encuentran fuertemente compactadas y separadas del ovocito. La figura 25D ilustra un folículo antral, en él se aprecia claramente que las células de la granulosa muy compactadas y que han perdido las uniones celulares entre ellas y el ovocito. El ovocito muestra algunas vesículas claras en el citoplasma.

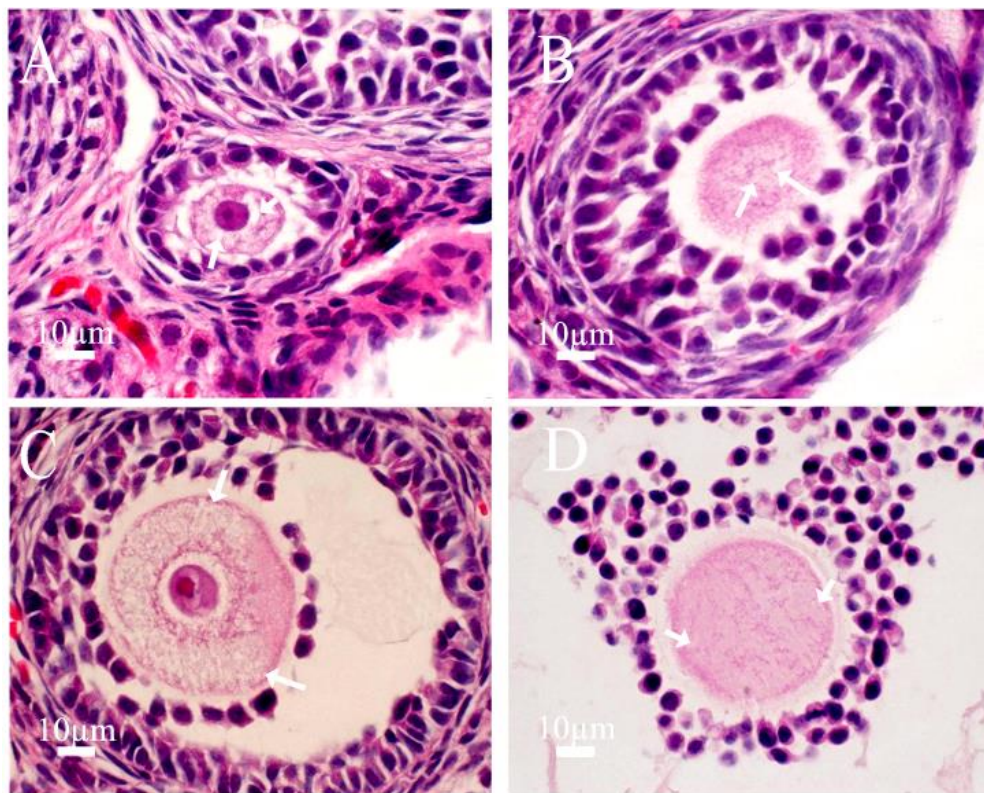


Fig.25. Folículos atrésicos de ovario de rata de 28 días teñidos con hematoxilina y eosina.

A) Folículo primario, se observan las células foliculares rodeando al ovocito, la mayoría de estas células han perdido conexión con el ovocito, también se aprecia un ovocito con una forma irregular. B) Folículo secundario, el ovocito tiene forma irregular, las células de la granulosa que están desprendidas del ovocito. En C) se identifica un folículo preantral, algunas células de la granulosa han comenzado a perder contacto con el ovocito, por otro lado, el ovocito ha perdido su forma regular. D) folículo antral en atresia, las células de la granulosa están fuertemente compactadas, ya no se encuentran unidas entre sí, ni con el ovocito. En todos estos ovocitos se aprecia el citoplasma con vesículas claras (flechas).

2. Identificación de las proteínas pro-autofágicas

Para identificar al proceso autofágico en ovocitos atrésicos, se realizó la inmunodetección de las proteínas Beclina 1, LC3A y mTORp en cortes de ovario de rata de 19 y 28 días de edad.

Las observaciones del material utilizado para las inmunolocalizaciones permitió identificar folículos con ovocitos sanos, otros con abundantes vesículas claras en el citoplasma (autofágicos) y otros fuertemente compactados (apoptóticos). Se pudo identificar que, en ambas edades estudiadas, los ovocitos de folículos atrésicos con vesículas claras en el citoplasma contienen una cantidad mayor de marcaje positivo por el anticuerpo dirigido contra las proteínas Beclina 1 y LC3-A en comparación con los ovocitos de folículos normales o no atrésicos (figuras 26 y 27). Lo que permite determinar que las células con vesículas claras se encuentran bajo una importante actividad autofágica.

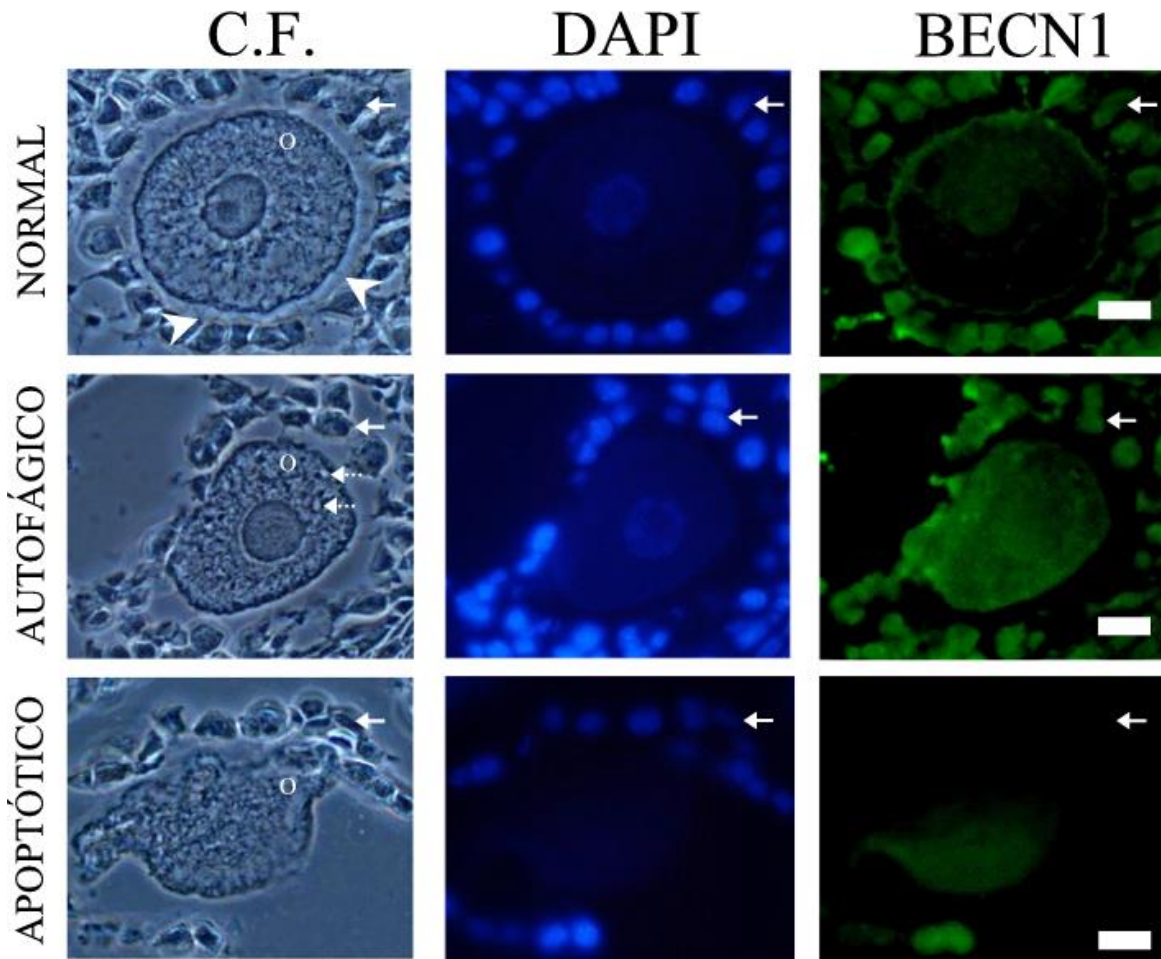


Fig.26. Inmunolocalización de Beclina 1 en ovario de rata de 19 días. De izquierda a derecha se observa la imagen de contraste de fases (C.F.), la tinción hecha con 4',6-diamidino-2-fenilindo (DAPI) y la inmunolocalización de la proteína. Se determinó la morfología de cada ovocito con la imagen obtenida con la iluminación de contraste de fases (C.F.). El ovocito (O) normal presenta una morfología circular, las células de la granulosa (flecha) poseen contacto entre ellas, además se observa que mantienen conexiones con el ovocito (puntas de flecha). El ovocito autofágico presenta morfología irregular asimétrica, posee múltiples vesículas (flechas punteadas) en el citoplasma, las células de la granulosa ya no mantienen conexiones entre sí y se observa pérdida de contacto entre las mismas y el ovocito. El ovocito apoptótico presenta el citoplasma con fuerte condensación. Los ovocitos autofágicos presentaron una marca positiva por el anticuerpo dirigido para Beclina 1 mayor que los ovocitos normales y los apoptóticos. Barra de calibración de 10 μ m.

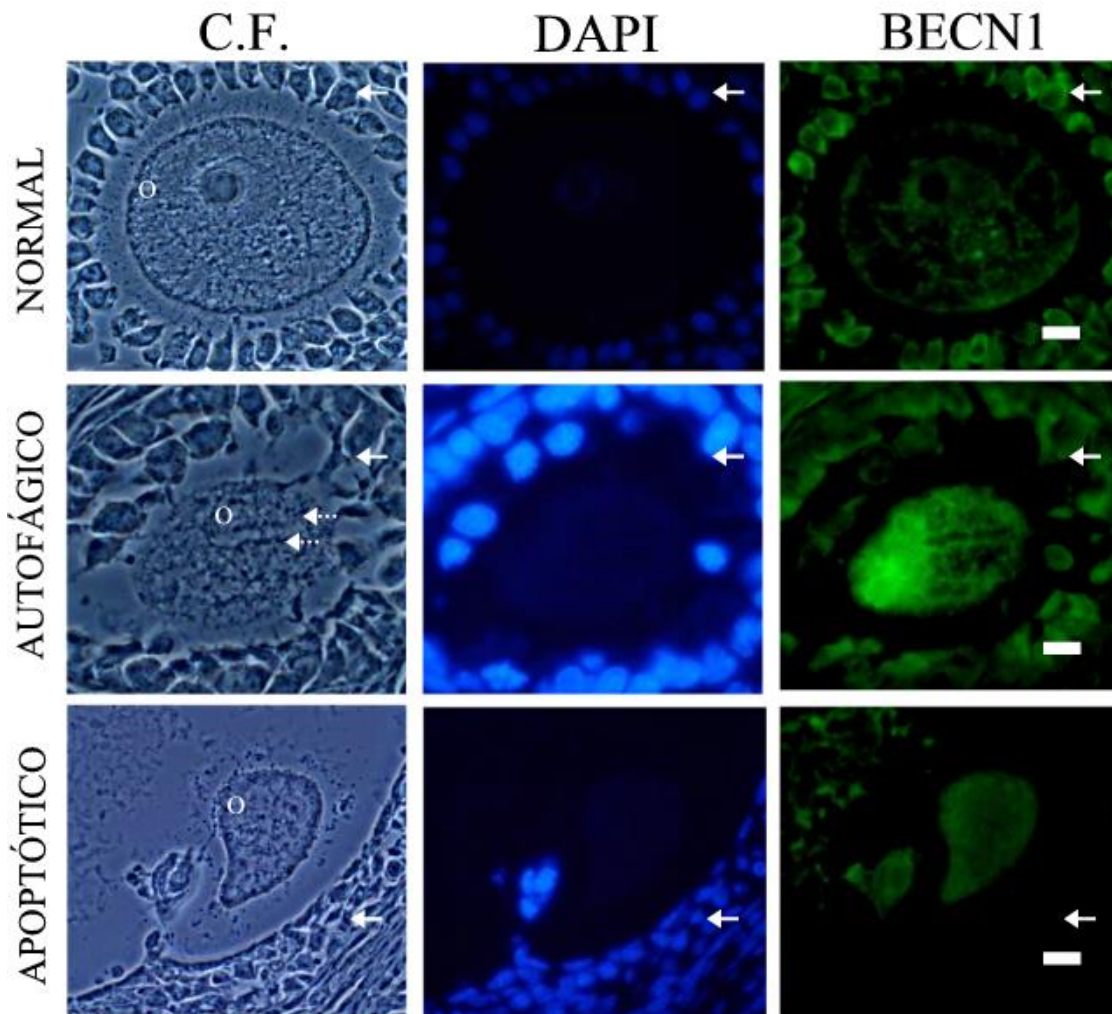


Fig.27. Inmunolocalización de BECN1 en ovario de rata de 28 días. De izquierda a derecha se observa la imagen de contraste de fases (C.F.), la tinción hecha con 4',6-diamidino-2-fenilindo (DAPI) y la inmunolocalización de la proteína. El ovocito identificado como normal presenta morfología regular, las células de la granulosa (flecha) poseen contacto entre ellas y se observa claramente que mantienen conexiones con el ovocito (puntas de flecha). El ovocito autofágico presenta morfología irregular asimétrica, posee múltiples vesículas (flechas punteadas) en el citoplasma, las células de la granulosa mantienen poca o nula conexión entre ellas y se observa pérdida de contacto entre las mismas y el ovocito. El ovocito apoptótico presenta una forma irregular del citoplasma, condensación y fragmentación celular. Los ovocitos distinguidos como: Normal, autofágico y apoptótico presentaron marca positiva hacia el anticuerpo dirigido para la proteína Beclina 1. Los ovocitos autofágicos presentaron una marca positiva mayor hacia el anticuerpo dirigido contra Beclina 1 en comparación con los ovocitos normales y apoptóticos. Barra de calibración de 10 μ m.

Considerando la importancia de asegurar que el proceso de autofagia se presenta en las células de folículos atrésicos, se identificó la presencia de la proteína LC3A en cortes de ovarios de rata de 19 y 28 días de edad. Los resultados mostraron que, en efecto, las células que poseen una gran cantidad de vesículas claras corresponden a una mayor marca positiva a la inmunodetección de la proteína LC3A (figuras 28 y 29).

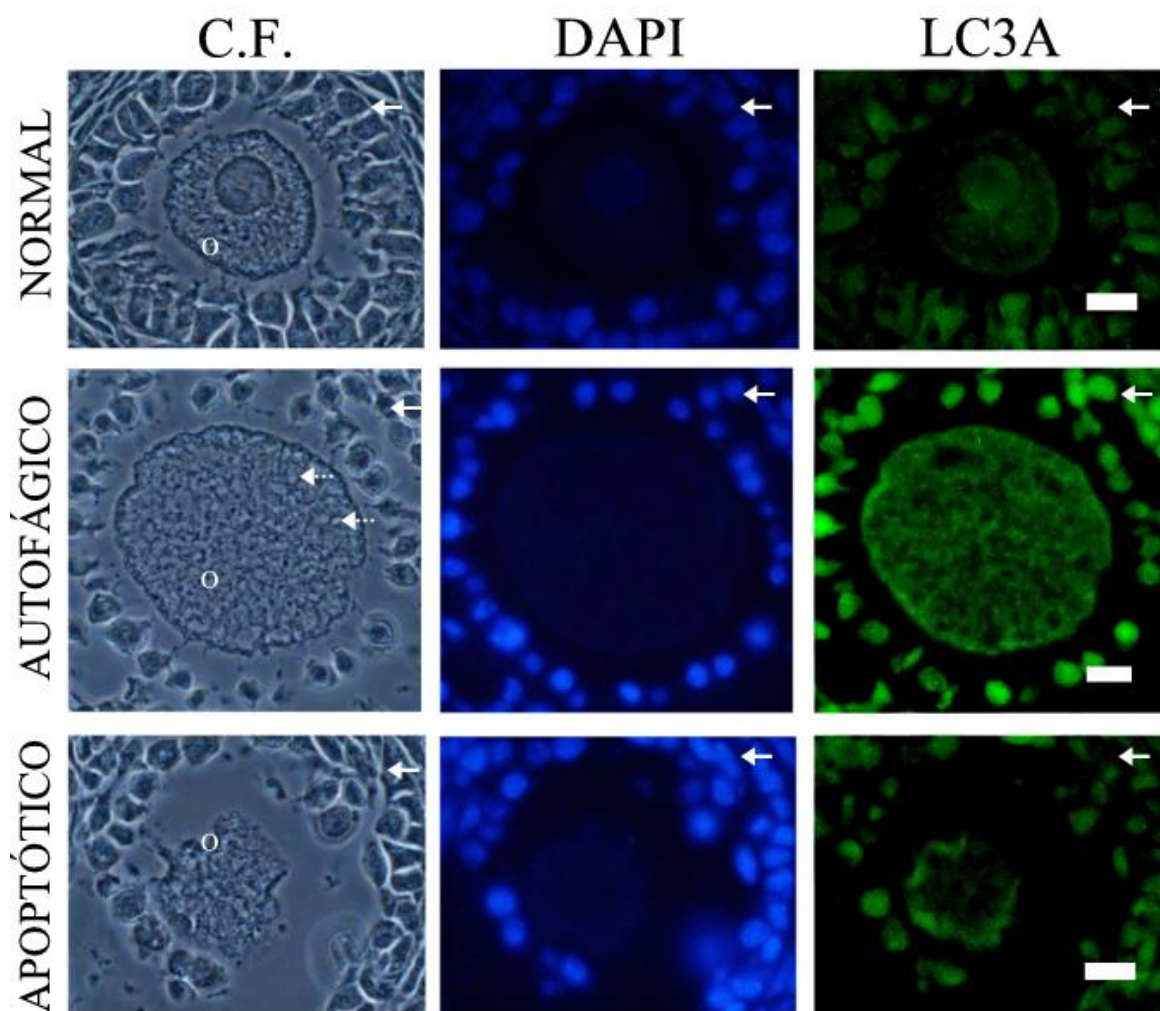


Fig. 28. Inmunolocalización de LC3A en ovario de rata de 19 días. De izquierda a derecha se observa la imagen de contraste de fases (C.F.), la tinción hecha con 4',6-diamidino-2-fenilindo (DAPI) y la inmunolocalización de la proteína. Los ovocitos se clasificaron de acuerdo con la morfología como: normal, autofágico y apoptótico. El ovocito normal (O) presenta forma regular, las células de la granulosa (flecha) poseen contacto entre ellas, además se observa que mantienen conexiones con el ovocito (puntas de flecha). El ovocito autofágico presenta morfología asimétrica, posee múltiples vesículas (flechas punteadas) en el citoplasma, las células de la granulosa ya no mantienen conexiones entre sí y se observa pérdida de contacto entre las granulosa y el ovocito. El ovocito apoptótico

presenta citoplasma compacto. La señal positiva de LC3A es mayor en los ovocitos autofágicos. Barra de calibración de 10µm.

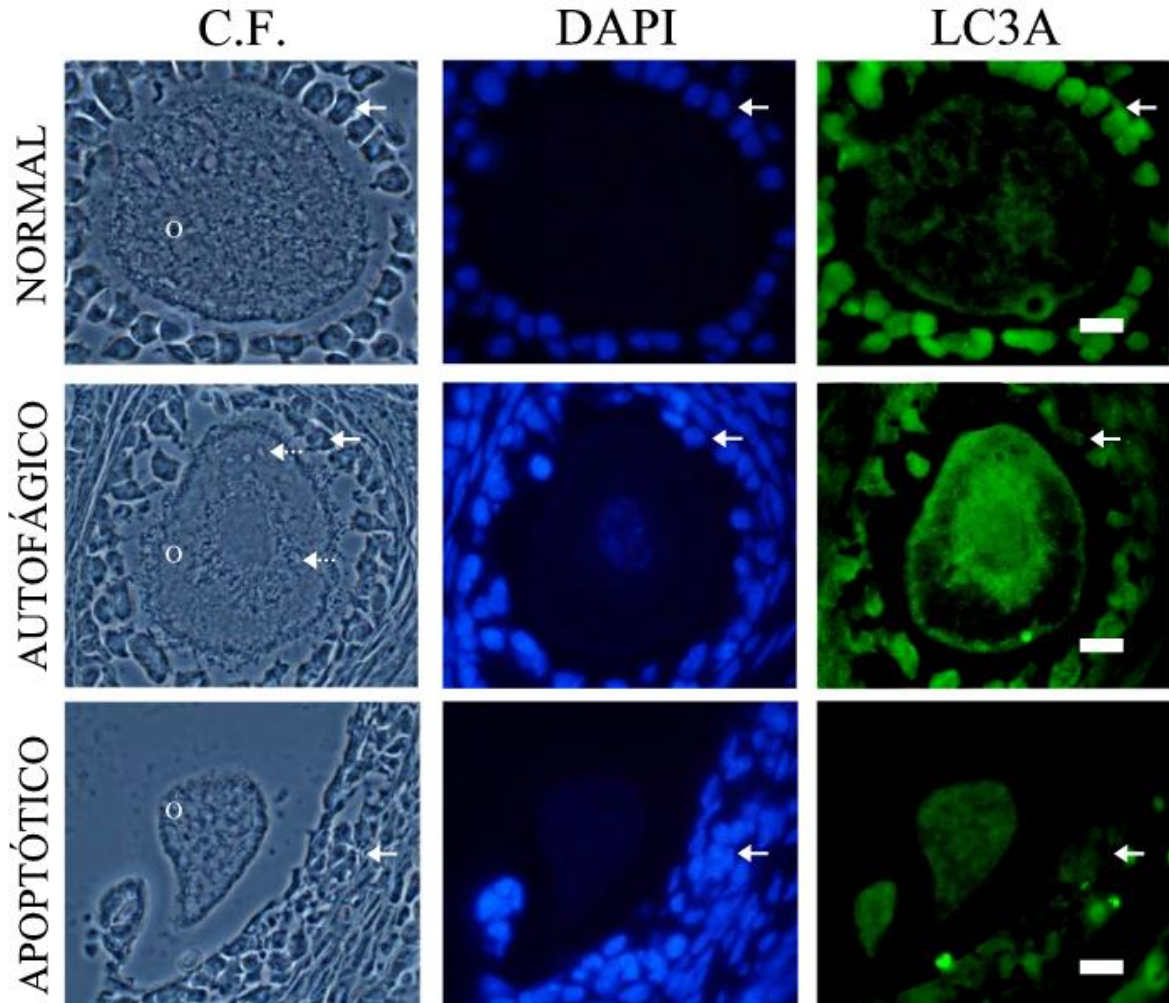


Fig.29. Inmunolocalización de LC3A en ovario de rata de 28 días. De izquierda a derecha se observa la imagen de contraste de fases (C.F.), la tinción hecha con 4',6-diamidino-2-fenilindo (DAPI) y la inmunolocalización de la proteína. Se identificó la morfología de cada ovocito utilizando la imagen correspondiente al contraste de fases, estos fueron caracterizado como: normal, autofágico y apoptótico. El ovocito (O) definido como normal presenta morfología regular, las células de la granulosa (flecha) poseen contacto entre ellas y se observa claramente que mantienen conexiones con el ovocito (puntas de flecha). El ovocito autofágico presenta morfología irregular asimétrica, posee múltiples vesículas (flechas punteadas) en el citoplasma, las células de la granulosa mantienen poca o nula conexión entre ellas y se observa pérdida de contacto entre las células de la grana y el ovocito. El ovocito apoptótico presenta una forma irregular del citoplasma, condensación y fragmentación celular. Los ovocitos distinguidos como: normal, autofágico y apoptótico presentaron marca positiva de la proteína LC3A. Los ovocitos autofágicos presentaron una

marca positiva mayor de LC3A en comparación con los ovocitos normales y apoptóticos. Barra de calibración de 10 μ m.

Considerando que todas las células de manera constitutiva llevan a cabo el proceso de autofagia para eliminar organelos en desuso o diferentes elementos citoplasmáticos que deben ser degradados, es necesario distinguir entre el evento autofágico que de manera fisiológicamente normal se lleva a cabo en las células, de aquél que puede estar contribuyendo a la muerte celular. Para ello se realizó la cuantificación de intensidad de fluorescencia correspondiente a la marca positiva para cada una de las proteínas identificadas.

Los datos mostraron que las células caracterizadas como autofágicas, presentan una cantidad significativamente mayor que las normales o las apoptóticas (figuras 30 y 31)

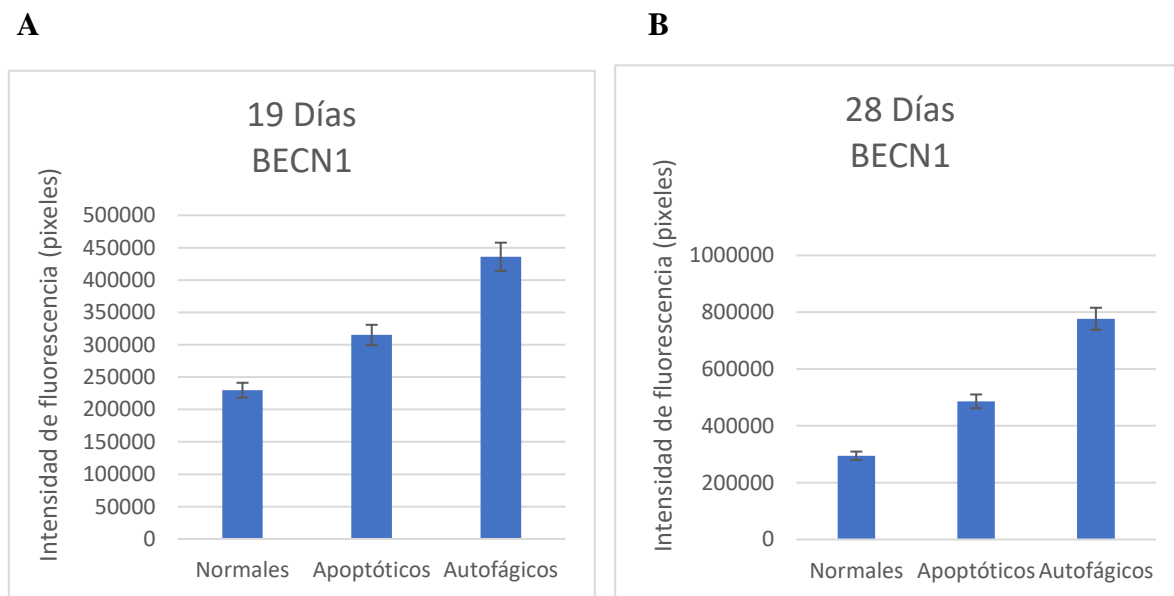


Fig.30. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de la marca positiva para la detección de Beclina 1. La imagen **A** representa los datos cuantitativos de la fluorescencia emitida por el anticuerpo secundario en los ovocitos normales, apoptóticos y autofágicos de ratas de 19 días de edad. Se observa una intensidad de fluorescencia significativamente mayor del anticuerpo dirigido contra Beclina 1 en ovocitos autofágicos. En la imagen **B** se representa la marca positiva de fluorescencia para Beclina 1 emitida por el anticuerpo en ovocitos normales, apoptóticos y autofágicos de ovarios de rata de 28 días. Se observa una diferencia significativa de Beclina 1 en ovocitos autofágicos.

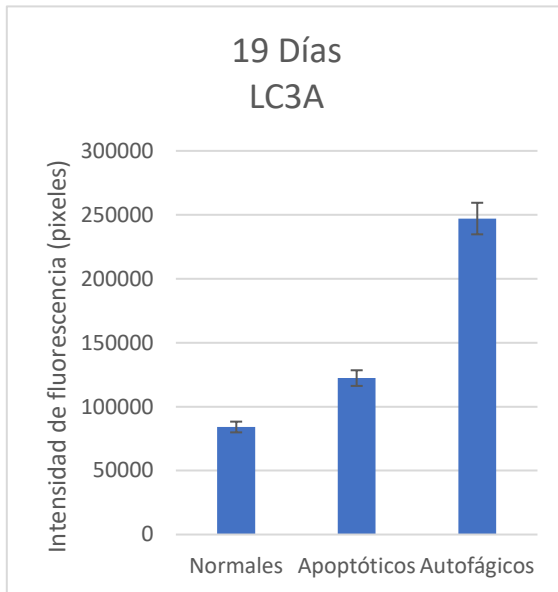
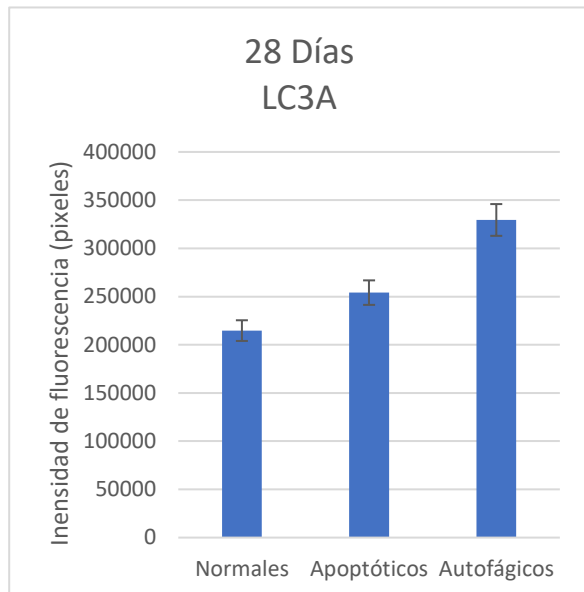
A**B**

Fig.31. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia emitida por LC3A. **A)** fluorescencia emitida por el anticuerpo en los ovocitos normales, apoptóticos y autofágicos de ratas de 19 días de edad. En la imagen A se logra observar una intensidad de fluorescencia significativamente mayor del anticuerpo dirigido contra LC3A en ovocitos autofágicos. En la imagen **B** se observan los datos cuantitativos para los ovocitos de ovarios de rata de 28 días, los ovocitos autofágicos muestran mayor cantidad de fluorescencia.

Detección de mTORpS2448

Para identificar el tipo de señales involucradas en el inicio del proceso de autofagia en los ovocitos atrésicos, se inmunodetectó a la proteína mTORpS2448, la que bajo condiciones altas en nutrientes tiene una mayor presencia que cuando hay una ausencia de éstos. Los resultados permitieron identificar folículos con ovocitos sanos, otros con múltiples vesículas claras en el citoplasma (autofágicos) y otros claramente compactados (apoptóticos). Se pudo identificar que en ambas edades estudiadas, los ovocitos de folículos atrésicos con vesículas claras en el citoplasma contienen una cantidad menor de marca positiva a la proteína mTORpS2448 que los ovocitos de folículos normales o no atrésicos (figuras 32 y 33). Lo que permite determinar que las células con vesículas claras se encuentran bajo una disminución de nutrientes importante que afecta el desarrollo de los ovocitos.

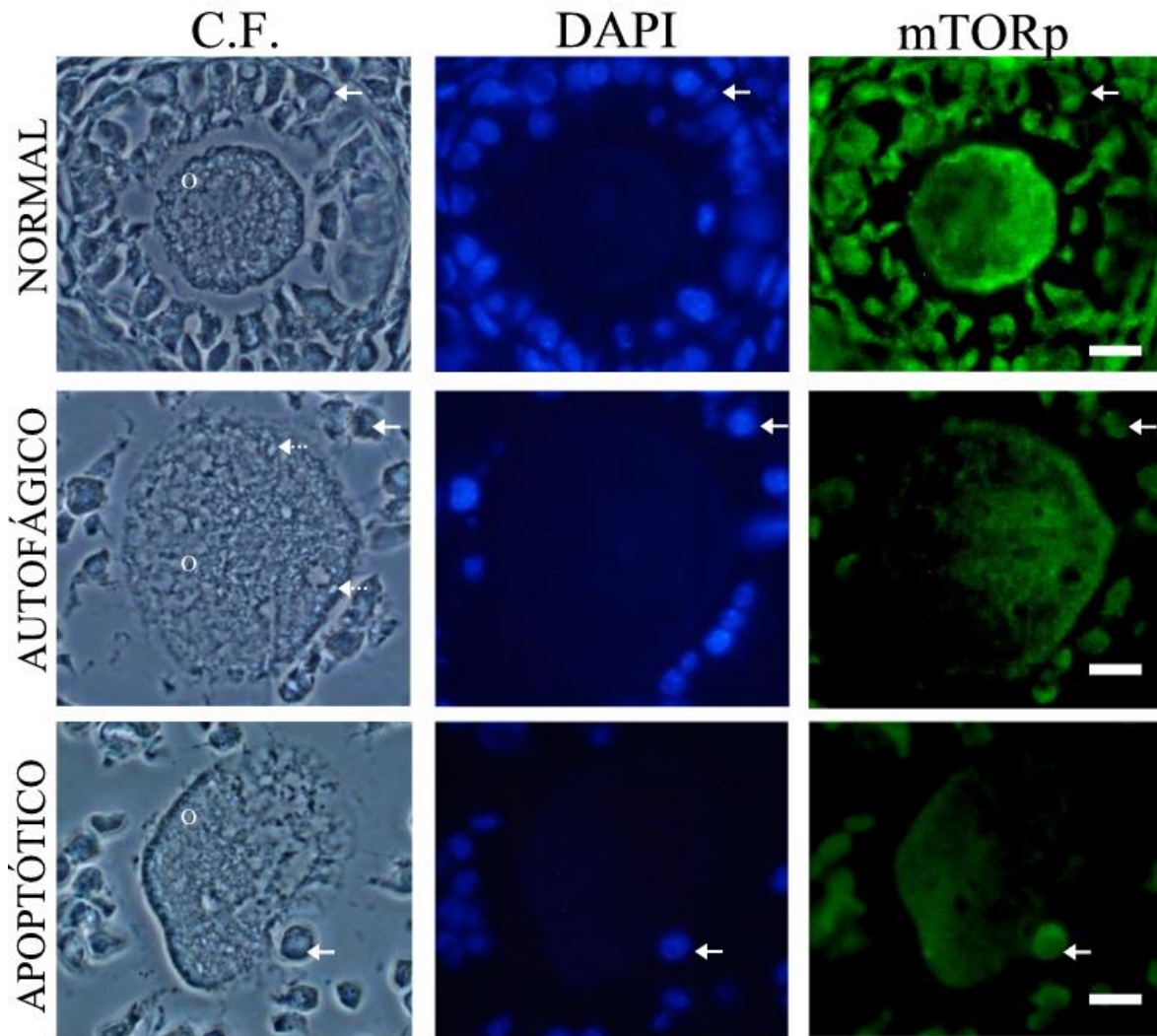


Fig.32. Inmunolocalización de mTORpS2448 en ovario de rata de 19 días. De izquierda a derecha se observa la imagen de contraste de fases (C.F.), la tinción hecha con 4',6-diamidino-2-fenilindo (DAPI) y la inmunolocalización de la proteína. La imagen correspondiente al contraste de fases nos permite identificar la morfología de cada uno de los ovocitos como: normal, autofágico y apoptótico. El ovocito (O) normal posee morfología regular, las células de la granulosa (flecha) mantienen contacto entre ellas y se identifica que mantienen conexiones con el ovocito (puntas de flecha). El ovocito autofágico posee morfología irregular asimétrica, presenta múltiples vesículas (flechas punteadas) en su citoplasma, la mayoría de las células de la granulosa han perdido conexión entre ellas y se observa la pérdida de contacto entre las células de la granulosa y el ovocito. El ovocito apoptótico posee citoplasma condensado y fragmentación celular. Los ovocitos autofágicos presentaron una marca positiva significativamente menor del anticuerpo dirigido contra la proteína mTORpS2448 en comparación con los ovocitos normales y apoptóticos. Barra de calibración de 10 μ m.

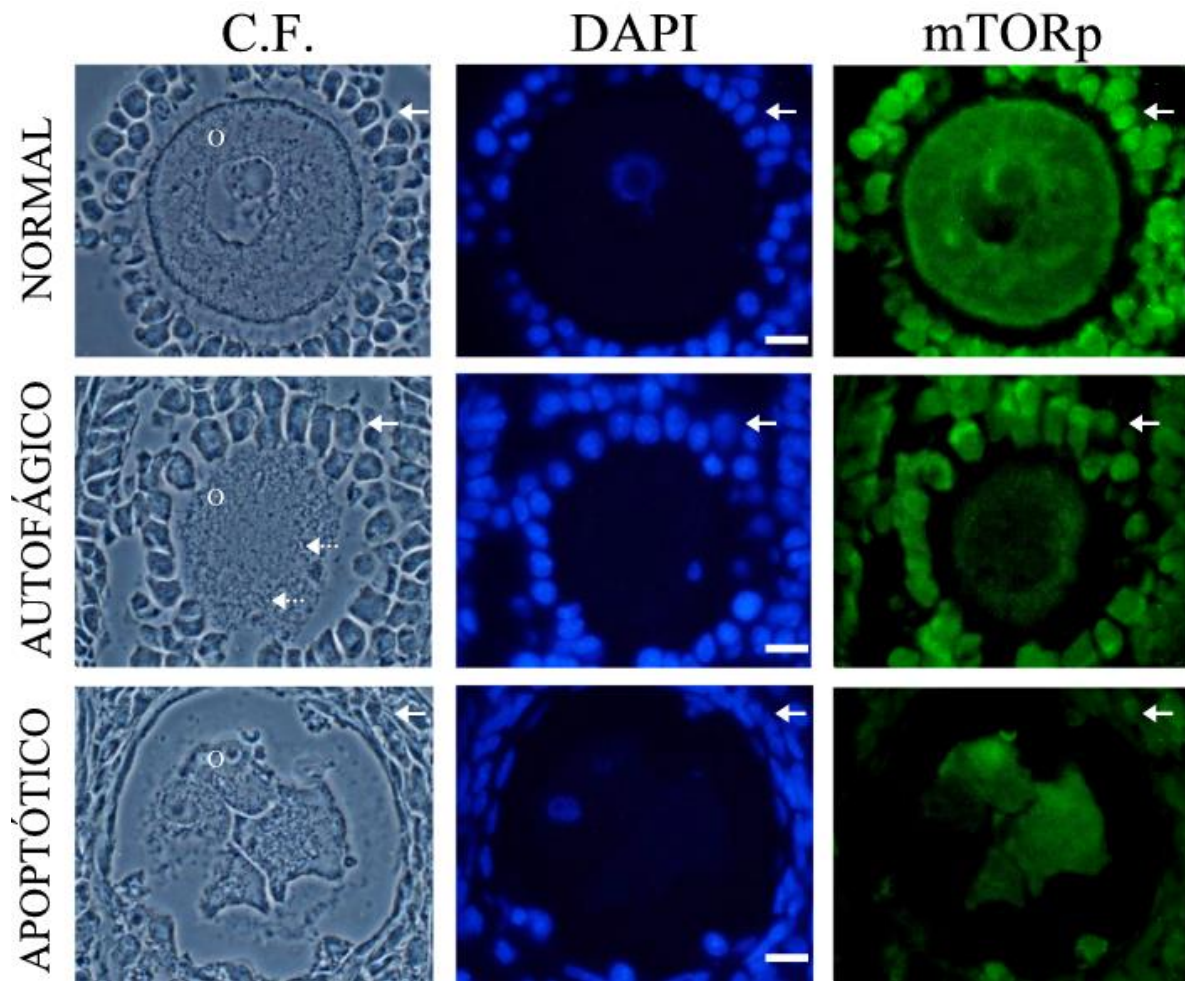


Fig.33. Inmunolocalización de mTORpS2448 en ovario de rata de 28 días. De izquierda a derecha se observa la imagen de contraste de fases (C.F.), la tinción hecha con 4',6-diamidino-2-fenilindo (DAPI) y la inmunolocalización de la proteína. En la imagen de contraste de fases se aprecia la morfología de cada uno de los ovocitos distinguiendo así: normal, autofágico y apoptótico. El ovocito (O) normal posee morfología regular, las células de la granulosa (flecha) mantienen contacto entre ellas y se identifica que mantienen conexiones con el ovocito (puntas de flecha). El ovocito autofágico presenta múltiples vesículas (flechas punteadas) en su citoplasma, la mayoría de las células de la granulosa han perdido conexión entre ellas y se observa la pérdida de contacto entre las células de la granulosa y el ovocito. El ovocito apoptótico presenta condensación y fragmentación celular. En los ovocitos normales se observa mayor marca en comparación con los ovocitos autofágicos. Barra de calibración de 10 μ m.

Las imágenes de las inmunolocalizaciones permitieron definir que existe una marca mayor de mTORpS2448 en los ovocitos normales que en los autofágicos. Para determinar si la diferencia es estadísticamente significativa, se realizó una cuantificación de intensidad de fluorescencia en lo ovocitos de cada una de las edades estudiadas (figura 34). Los análisis

estadísticos mostraron que en la cantidad de proteína mTORpS2448 expresada en los ovocitos no autofágicos es significativamente mayor que en los autofágicos, corroborando así que existe una importante actividad autofágica en los ovocitos con vesículas claras en el citoplasma.

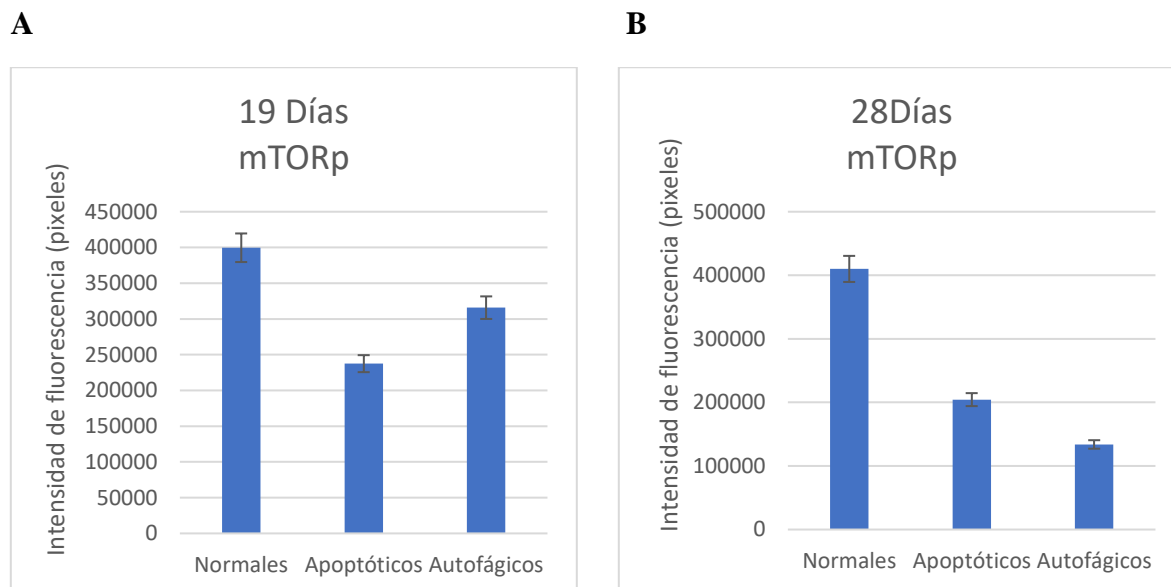


Fig.34. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia emitida por el anticuerpo dirigido hacia mTORp. La imagen **A** corresponde al grafico realizado para representar la fluorescencia emitida por el anticuerpo en los ovocitos normales, apoptóticos y autofágicos de ratas de 19 días de edad. Se observa una intensidad de fluorescencia significativamente mayor de mTORpS2448 en ovocitos normales. En la imagen **B** se aprecia un comportamiento semejante en los ovocitos de ratas de 28 días.

Detección de la proteína ULK1pS757

Una vez definido el proceso de autofagia en los ovocitos atrésicos, se buscó identificar si la actividad autofágica tenía una relación directa con la limitación de nutrientes, por lo que se inmunodetectó la proteína ULK1pS757, la que bajo condiciones altas en nutrientes posee mayor presencia que cuando hay una ausencia de ellos. Los resultados permitieron identificar que, en ambas edades estudiadas, los ovocitos de folículos atrésicos con vesículas claras en el citoplasma contienen una cantidad menor de marca positiva a la proteína ULK1pS757, en comparación con los ovocitos de folículos normales o no atrésicos (figuras 35 y 36). Esto evidencia que las células con vesículas claras se encuentran bajo una disminución de nutrientes lo que afecta el desarrollo de los ovocitos y promueve el inicio de la autofagia.

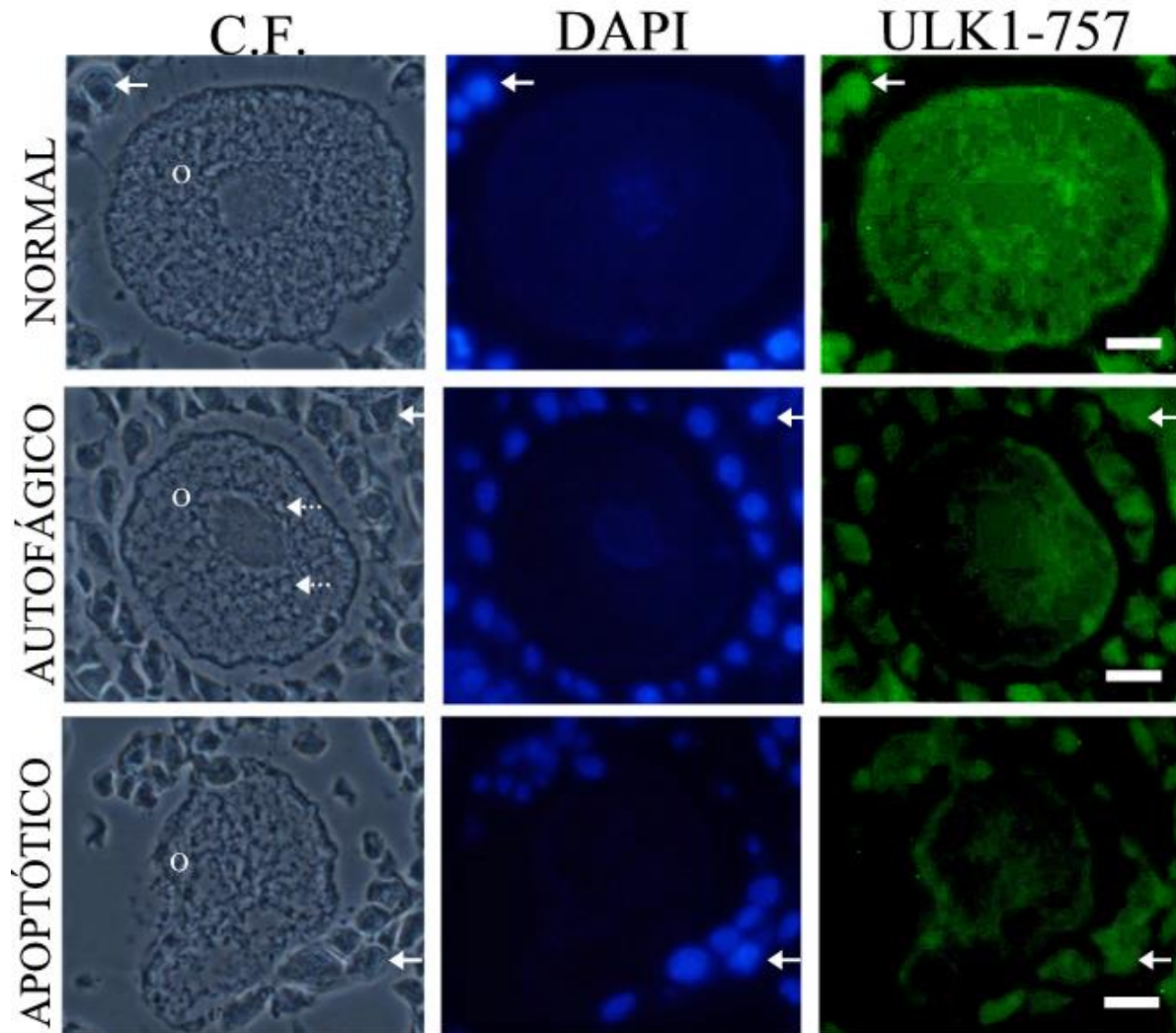


Fig.35. Inmunolocalización de **ULK1pS757** en ovario de rata de 19 días. De izquierda a derecha se observa la imagen de contraste de fases (C.F.), la tinción hecha con 4',6-diamidino-2-fenilindo (DAPI) y la inmunolocalización de la proteína. La imagen referente al contraste de fases muestra la morfología de los ovocitos que permite identificar tres tipos: normal, autofágico y apoptótico. El ovocito normal (O) presenta morfología regular, las células de la granulosa (flecha) mantienen contacto entre ellas y se observa que disponen de conexiones con el ovocito (puntas de flecha). Los ovocitos señalados como autofágicos, se caracterizan por presentar múltiples vesículas (flechas punteadas) en el citoplasma, además la mayoría de las células de la granulosa han perdido conexión entre ellas y se ha perdido el contacto entre las células de la granulosa y el ovocito. El ovocito apoptótico presenta condensación y fragmentación celular. Los ovocitos normales presentaron una marca mayor a ULK1pS757 en comparación con los ovocitos autofágicos y apoptóticos. Barra de calibración de 10µm.

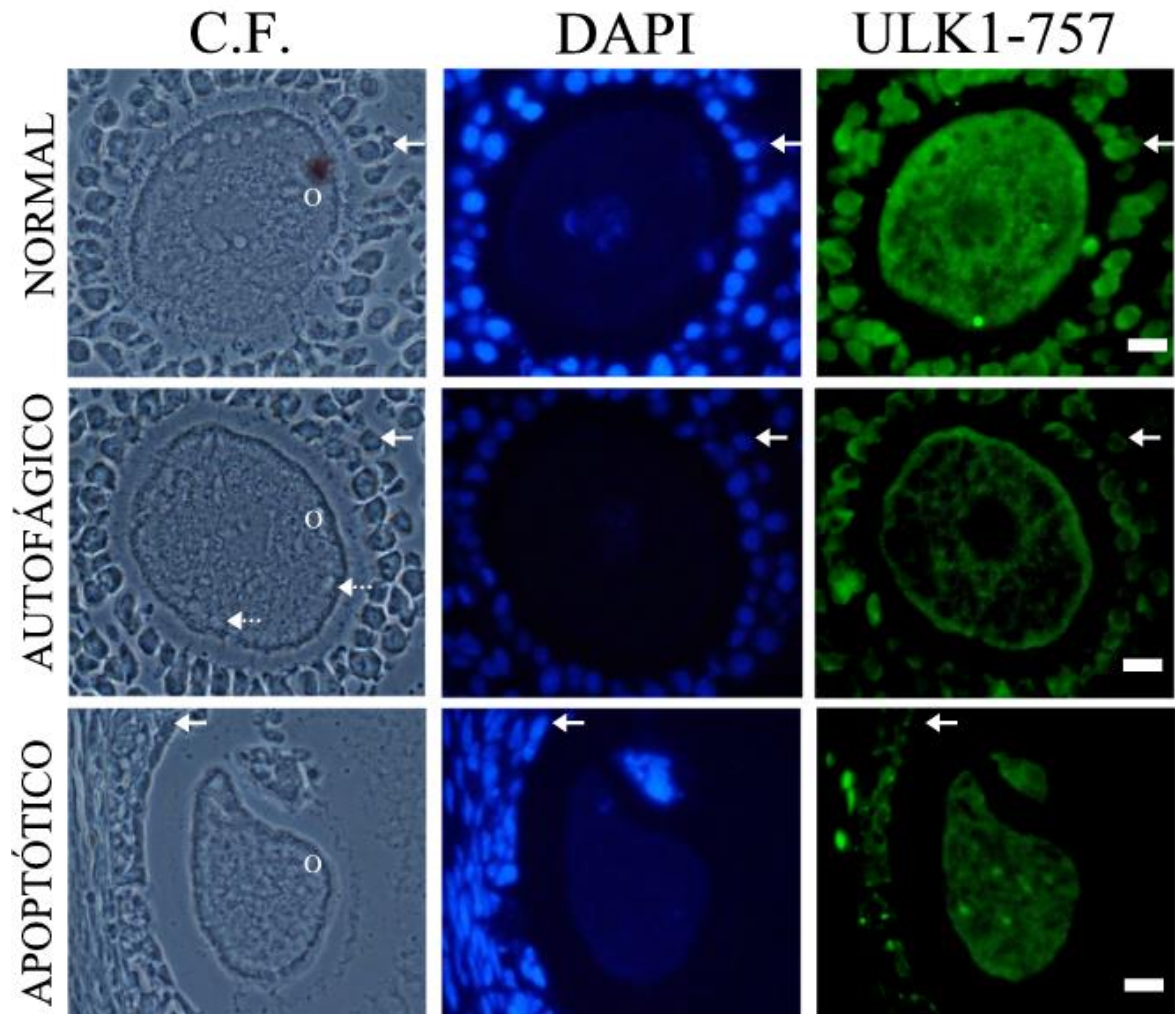


Fig.36. Inmunolocalización de ULK1-757 en ovario de rata de 28 días. De izquierda a derecha se observa la imagen de contraste de fases (C.F.), la tinción hecha con 4',6-diamidino-2-fenilindo (DAPI) y la inmunolocalización de la proteína. El contraste de fases permite identificar la morfología de los ovocitos en tres tipos: normal, autofágico y apoptótico. El ovocito (O) normal se caracterizó así ya que presenta morfología regular, las células de la granulosa (flecha) mantienen contacto entre ellas y se observa que disponen de conexiones con el ovocito (puntas de flecha). Los ovocitos señalados como autofágicos la mayoría de las células de la granulosa han perdido conexión entre ellas y otra característica importante es la pérdida de contacto entre las células de la granulosa y el ovocito. El ovocito presenta una forma irregular en su citoplasma y condensación y fragmentación celular. Los ovocitos normales presentaron una marca mayor de fluorescencia emitida por el anticuerpo dirigido contra la proteína ULK1-757 en comparación con los ovocitos autofágicos y apoptóticos. Barra de calibración de 10µm.

Detección de la proteína ULK1pS555

Para definir la ruta de señalización de la autofagia se realizó la inmunodetección de la proteína ULK1pS555 la cual es activada para que se inicie el proceso de autofagia. Los resultados permitieron identificar folículos con ovocitos sanos, otros con múltiples vesículas claras en el citoplasma (autofágicos), así como algunos ovocitos compactados (apoptóticos). Se logró identificar que, en ambas edades estudiadas, los ovocitos de folículos atrésicos con vesículas claras en su citoplasma presentan una cantidad mayor de marca positiva de la proteína ULK1pS555 en contraste con los ovocitos de folículos normales o no atrésicos (figuras 37 y 38). Esto nos permite determinar que las células con vesículas claras se encuentran bajo una importante actividad autofágica inducida por estímulos no relacionados directamente con la limitación de nutrientes.

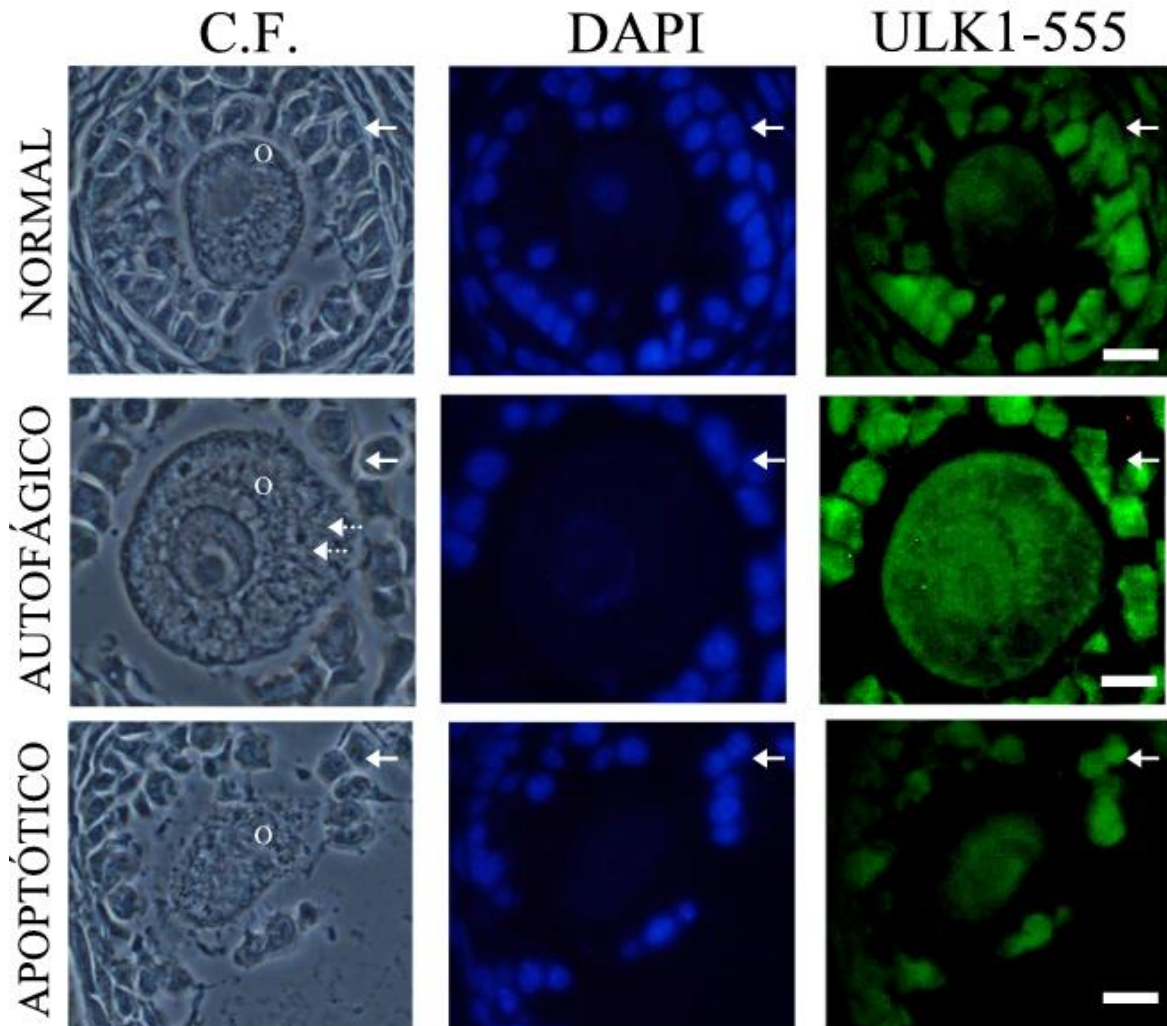


Fig.37. Inmunolocalización de **ULK1pS555** en ovario de rata de 19 días. De izquierda a derecha se observa la imagen de contraste de fases (C.F.), la tinción hecha con 4',6-diamidino-2-fenilindo (DAPI) y la inmunolocalización de la proteína. El ovocito (O) normal presenta morfología regular, las células de la granulosa (flecha) mantienen contacto entre ellas y se observa que disponen de conexiones con el ovocito (puntas de flecha). Los ovocitos señalados como autofágicos, poseen múltiples vesículas (flechas punteadas) en el citoplasma, además la mayoría de las células de la granulosa han perdido conexión entre ellas y otra característica importante es la pérdida de contacto entre las células de la grana y el ovocito. Los ovocitos autofagicos presentaron una marca mayor de fluorescencia emitida por el anticuerpo contra ULK1-555 en comparación con los ovocitos normales y apoptóticos. Barra de calibración de 10 μ m.

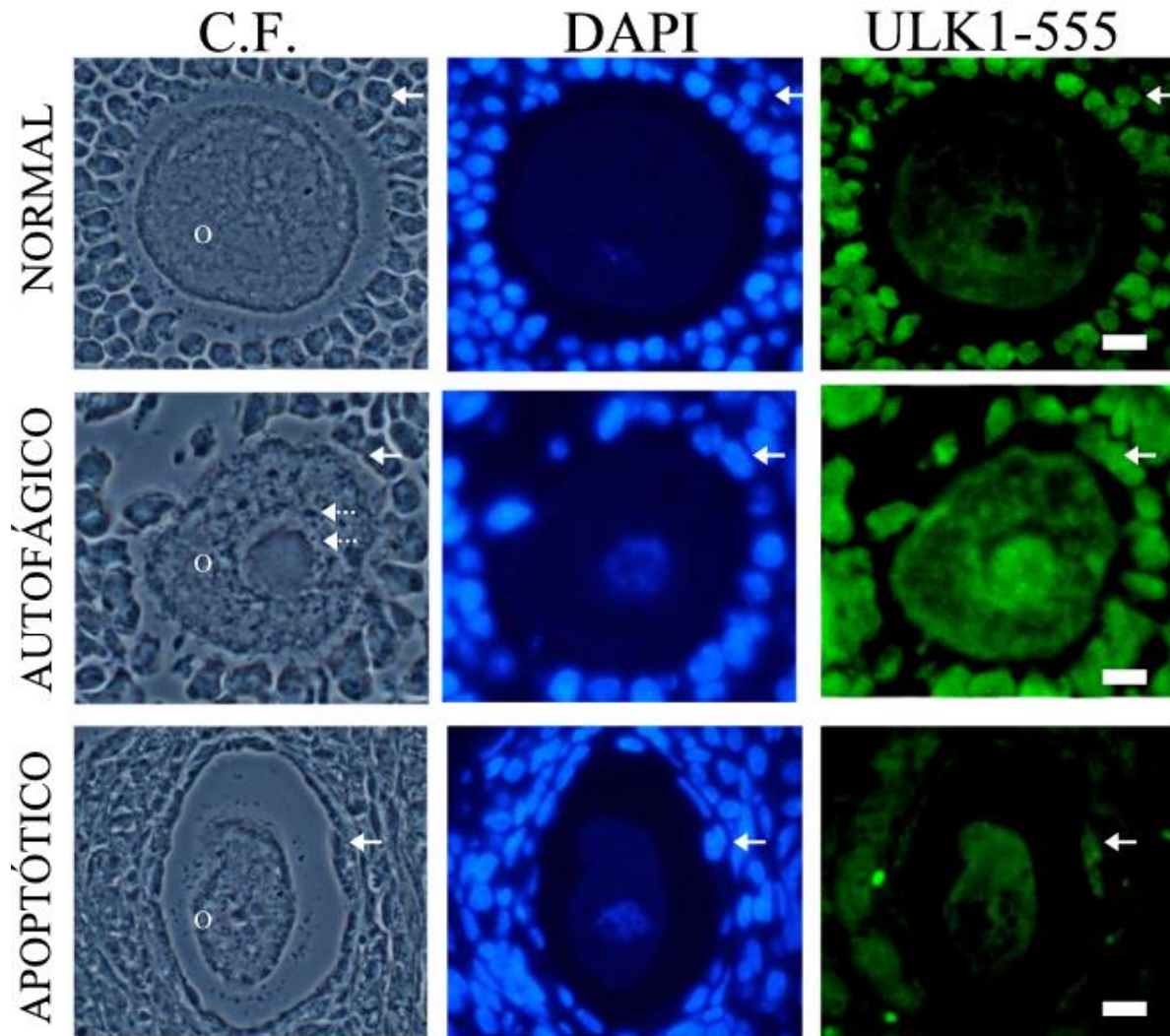


Fig.38. Inmunolocalización de **ULK1pS555** en ovario de rata de 28 días. De izquierda a derecha se observa la imagen de contraste de fases (C.F.), la tinción hecha con 4',6-diamidino-2-fenilindo (DAPI) y la inmunolocalización de la proteína. Las células de la granulosa (flecha) en los ovocitos normales mantienen contacto entre ellas y se observa que disponen de conexiones con el ovocito (puntas de flecha). Los ovocitos autofágicos poseen múltiples vesículas (flechas punteadas) en el citoplasma, además la mayoría de las células de la granulosa han perdido conexión entre ellas y con el ovocito. Los ovocitos autofágicos presentaron una marca mayor de fluorescencia emitida por el anticuerpo dirigido contra la proteína ULK1pS555 en comparación con los ovocitos normales y apoptóticos. Barra de calibración de 10 μ m.

TSC2 en ovocitos autofágicos

Los resultados obtenidos con respecto al incremento de las proteínas autofágicas en los ovocitos con vesículas claras en el citoplasma, han mostrado que en los ovarios de rata de 19 y 28 días se lleva a cabo el proceso autofágico. Así mismo, los niveles incrementados de la marca correspondientes a la proteína ULK1pS555, sugieren que la autofagia puede estar influenciada por la limitación de energía. Para definir la influencia de este factor se identificó la presencia y ausencia de las proteínas TSC1 y TSC2 en los ovocitos autofágicos. Los resultados mostraron, en los ovocitos identificados como sanos la cantidad de fluorescencia emitida por el anticuerpo contra TSC1 es mayor que TSC2. Por otro lado, los ovocitos que presentan vesículas claras en su citoplasma identificados como autofágicos, se observa que tienen una fluorescencia mayor de las proteínas BECN1, LC3A y TSC2 mientras que TSC1 mantiene una menor fluorescencia. Este mismo fenómeno se observa en los ovocitos de ovarios de rata de 28 días de edad, ya que en los ovocitos autofágicos la marca de TSC2 es mayor en comparación con los normales y también TSC1 es muy baja en los ovocitos autofágicos.

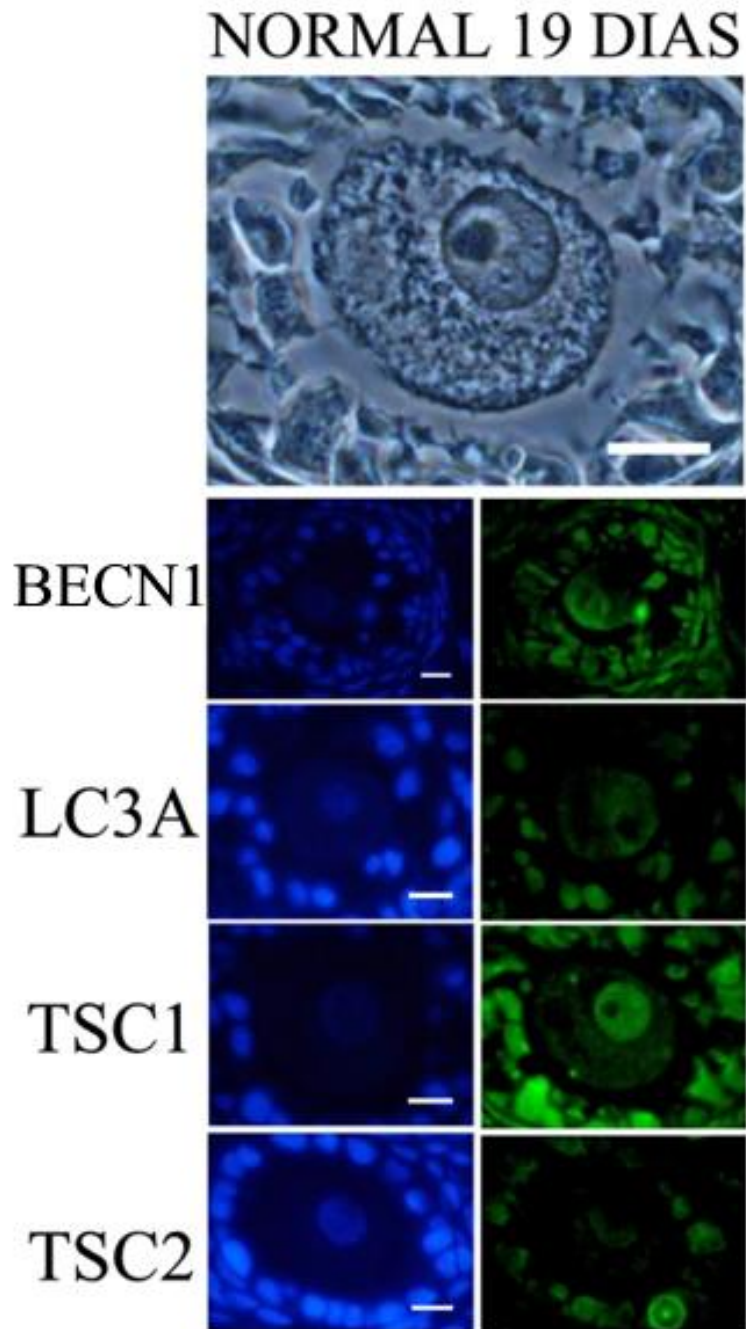


Fig.39. Inmunolocalización de BECN1, LC3A, TSC1 y TSC2 en cortes seriados de ovocito normal de rata de 19 días. En la parte superior de la imagen se muestra el contraste de fases la tinción hecha con 4',6-diamidino-2-fenilindo (DAPI) del lado izquierdo y la inmunolocalización de la proteína del lado derecho. El ovocito tiene una morfología regular de las células somáticas, las células de la granulosa poseen contacto entre ellas, además las células de la granulosa mantienen conexiones con el ovocito. Se aprecia una marca positiva a las proteínas BECN1, LC3A y TSC2. El anticuerpo dirigido contra TSC1 muestra una mayor intensidad de marcado que TSC2. Barra de calibración de 10 μ m.

AUTOFÁGICO 19 DÍAS

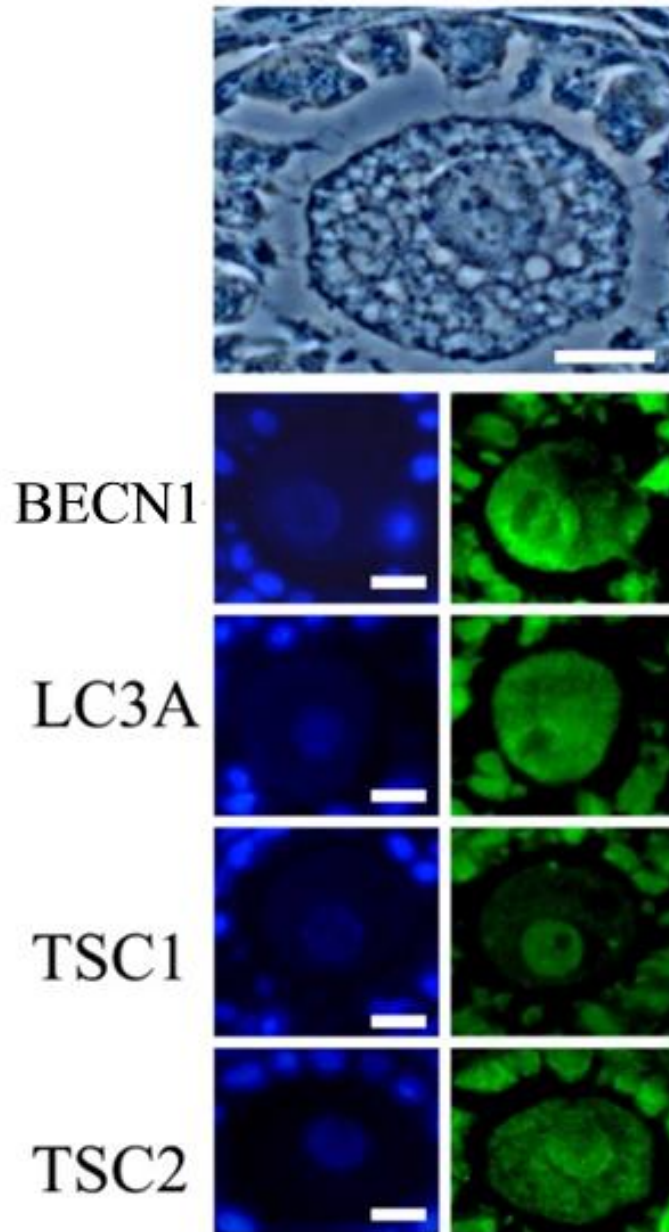


Fig.40. Inmunolocalización de BECN1, LC3A, TSC1 y TSC2 en cortes seriados de ovocitos autofágicos de rata de 19 días. En la parte superior de la imagen se muestra el contraste de fases la tinción hecha con 4',6-diamidino-2-fenilindo (DAPI) del lado izquierdo y la inmunolocalización de la proteína del lado derecho. El ovocito presenta múltiples vesículas en el citoplasma, las células de la granulosa ya no mantienen conexiones entre sí y se observa pérdida de contacto entre las células de la granula y el ovocito. La presencia de BECN1, LC3A y TSC2 se muestra elevada con respecto a las marcas observadas en el ovocito normal. El anticuerpo dirigido contra TSC2 se observa en mayor cantidad con respecto a la marca positiva para TSC1. Barra de calibración de 10µm.

NORMAL 28 DIAS

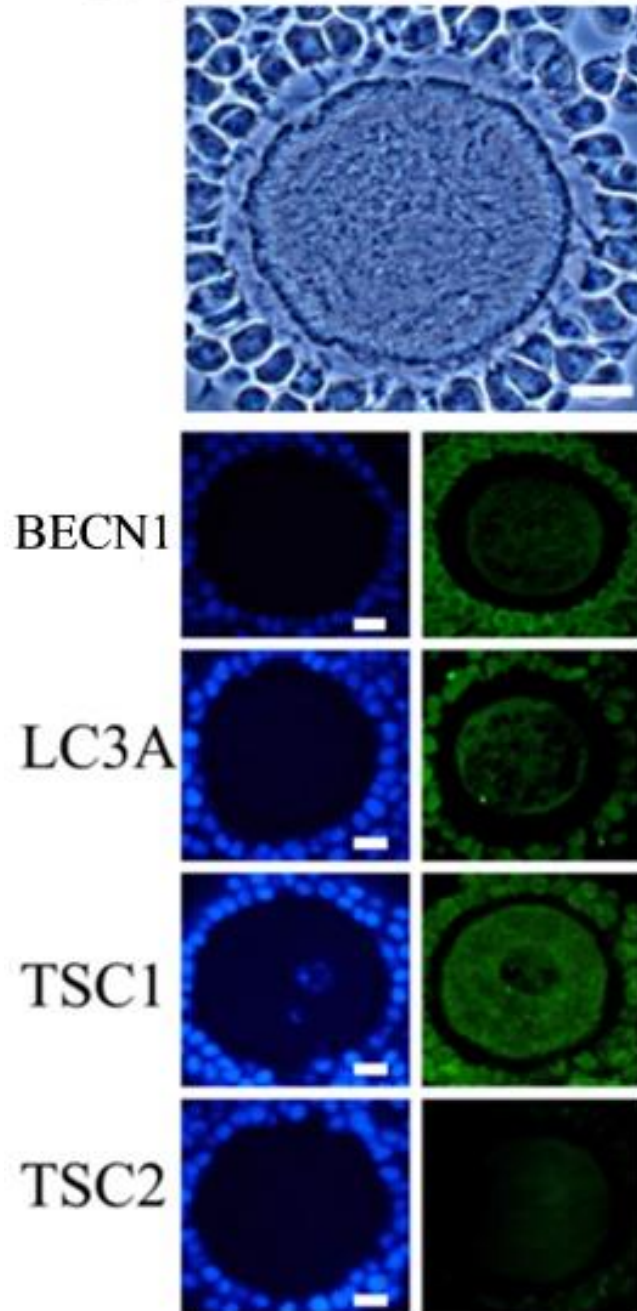


Fig.41. Inmunolocalización de BECN1, LC3A, TSC1 y TSC2. Cortes seriados de ovocito normal de ovario de rata de 19 días. En la parte superior de la imagen se muestra el contraste de fases la tinción hecha con 4',6-diamidino-2-fenilindo (DAPI) del lado izquierdo y la inmunolocalización de la proteína del lado derecho. Se observa una baja marca positiva para BECN1, LC3A y TSC2. El anticuerpo contra TSC1 presenta una señal positiva intensa. una marca positiva mayor de TSC1 en comparación con la marca positiva de BECN1, LC3A y TSC2. Barra de calibración de 10µm.

AUTOFÁGICO 28 DÍAS

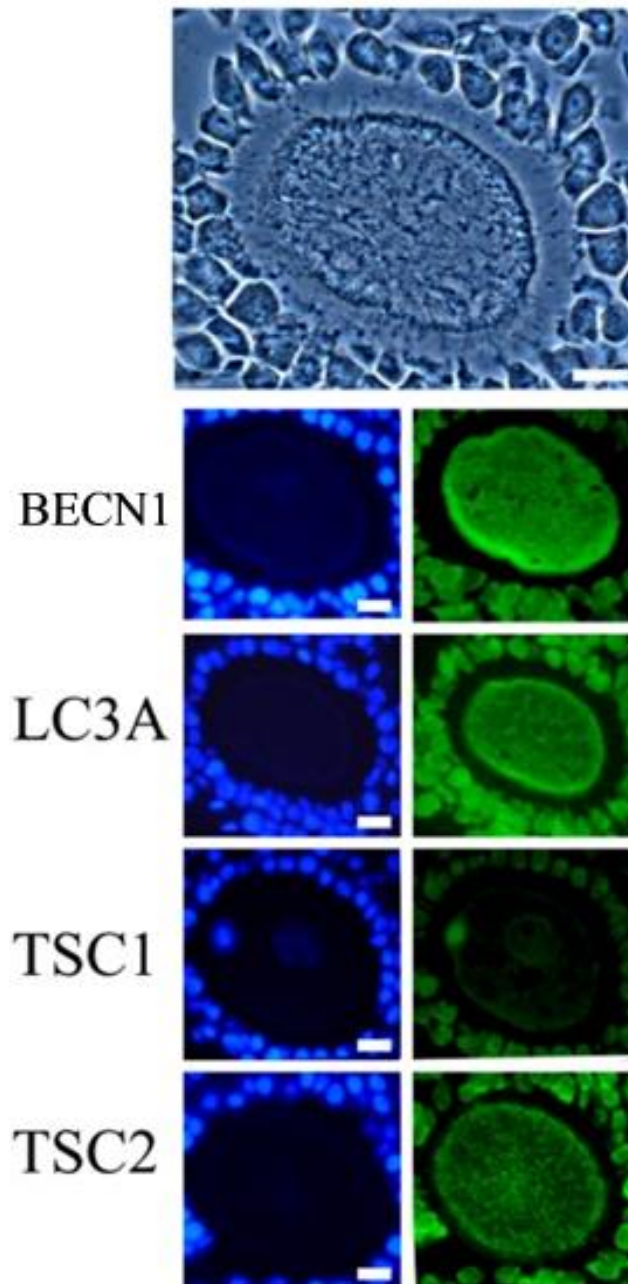


Fig.42. Cortes seriados de ovocito atrésico de ovario de rata de 28 días. Inmunolocalización de BECN1, LC3A, TSC1 y TSC2. En la parte superior de la imagen se muestra el contraste de fases la tinción hecha con 4',6-diamidino-2-fenilindo (DAPI) del lado izquierdo y la inmunolocalización de la proteína del lado derecho. El ovocito presenta una intensa marca positiva a las proteínas autofágicas BECN1 y LC3A. TSC2 tiene una mayor presencia que TSC1. Barra de calibración de 10μm.

X. Análisis de resultados.

La autofagia es un mecanismo evolutivamente conservado, durante el cual el contenido citoplasmático es secuestrado dentro de vesículas autofágicas y posteriormente es dirigido al lisosoma para su degradación **(Debnath et al., 2005)**. Este evento es reconocido como un mecanismo de supervivencia celular bajo condiciones de limitación de nutrientes **(Baehrecke et al., 2005)**. Las proteínas de señalización y maquinaria que median la formación de autofagosomas están muy conservadas desde levaduras hasta los humanos **(Wirth et al., 2019)**. Varias moléculas y cascadas de señalización modulan la autofagia en respuesta a numerosas señales celulares y ambientales. El regulador mejor caracterizado de la autofagia es el complejo mTORC1, esta quinasa regula negativamente a la autofagia por medio de la inhibición del complejo ULK1, a través de la fosforilación directa **(Boya et al., 2013)**. La quinasa mTOR en su forma fosforilada en la serina 2448 (mTORpS2448), hace referencia al estado activo de la proteína, regulando negativamente a ULK1 y por lo tanto, inhibiendo a la autofagia **(Trelford y Di 2021)**. Los resultados de la presente investigación mostraron que los niveles de marca positiva para la proteína mTORpS2448 poseen una mayor intensidad de fluorescencia en los ovocitos dentro de folículos no atrésicos (normales) en comparación con los ovocitos con abundantes vesículas claras, lo que permitió definirlos como autofágicos. Lo anterior aunado a los resultados obtenidos para la detección de las proteínas autofágicas BECL1 y LC3A, en donde este mismo tipo de ovocitos con muchas vesículas claras presentaron elevado marcaje para BECL1 y LC3, permitieron definir que mTOR puede estar regulando a ULK1 para inducir autofagia, ya que se ha demostrado que mTOR se inhibe cuando los aminoácidos son escasos, provocando que las concentraciones de ATP disminuyan, dando como resultado una activación de la autofagia **(Boya et al., 2013)**.

Adicionalmente, el análisis del marcado positivo para las formas fosforiladas de la proteína ULK1 en la serina 757 y en la 555, evidenciaron que ULK1pS757 tiene una mayor presencia en ovocitos normales que en los autofágicos. Contrariamente, la proteína ULK1pS555 se encuentra disminuida en los ovocitos sanos e incrementada en los ovocitos autofágicos. Esto sugiere que en condiciones ricas en nutrientes y cuando existen factores de crecimiento disponibles en la célula mTORC1 permanece activo y fosforila el complejo ULK1 en la serina 757 para mantener inhibida su actividad e inhibir a la autofagia **(Trelford y Di 2021)**. La marca incrementada de ULK1pS555 en los ovocitos autofágicos, no sólo sugiere que existe una activación del proceso autofágico, si no que este evento puede estar influido por la limitación de energía, ya que existe una relación entre este tipo de fosforilación y la AMPK **(Cao et al., 2020)**.

El supresor de tumores TSC es un heterodímero compuesto por tuberina (TSC2), una proteína activadora de GTPasa (GAP) y su compañero de activación hamartina (TSC1), que localiza el supresor de tumores TSC en las endomembranas y protege a TSC2 de la degradación proteasomal **(Zhang et al., 2013)**. TSC2 es un destacado regulador intrínseco de mTORC1 que actúa a través de la modulación de RHEB **(Ranek et al., 2019)**. En condiciones de nutrientes Rheb-GTP se une a mTOR, mientras que en condiciones bajas en nutrientes AMPK fosforila a TSC2 en los sitios T1227 y S1345, lo que promueve la actividad del complejo TSC1/2 **(Huang y Manning, 2008)**. Bajo estas circunstancias en donde existe una escasez de nutrientes TSC1/2 actúa como GAP hacia Rheb, originando la desfosforilación de Rheb-GTP y produciendo Rheb-GDP inactivo, esta reacción causa que se desactive la 69 señalización de mTORC1 mediada por Rheb **(Brugarolas et al., 2004; Budanov y Karin, 2008; Huang et al., 2008)**. La inhibición de la autofagia mediada por TORC1 se libera en ausencia de aminoácidos y se logra mediante la acción del complejo inhibidor de TORC1 TSC1-TSC2, lo que provoca el desplazamiento de TORC1 de los lisosomas. La activación del complejo TSC se

regula a través de la activación de AMPK mediada por LKB1, que fosforila TSC2 (**Bakula et al., 2017**). Los resultados obtenidos de la inmunolocalización de la proteína TSC1 mostraron que la fluorescencia asociada a la detección de esta presenta una mayor intensidad en los ovocitos identificados como normales; por otro lado, la fluorescencia asociada a la presencia de la proteína TSC2 mostró una mayor intensidad en los ovocitos identificados como autofágicos. Las inmunolocalizaciones en cortes seriados de ovocitos de las proteínas TSC1 y TSC2 muestran que, durante condiciones de inanición y escases de nutrientes, TSC1 parece mantenerse inactiva mientras que TSC2 se activa, lo que originaría la iniciación de la autofagia.

En conclusión, todos estos resultados nos permiten proponer que bajo condiciones de escasez de nutrientes y factores de crecimiento se propicie que mTOR deje de fosforilar al complejo ULK1 lo que desencadena la vía de eliminación autofágica. Además, sugieren que las condiciones prolongadas de estrés causen un estado de inanición en las células lo que originaría niveles bajos de energía por lo que podrían estar involucradas las rutas de señalización de la AMPK/ULK1 y TSC2/mTORC1.

XI. Conclusiones.

- En los ovarios de rata de 19 y 28 días de edad se encuentran presentes folículos atrésicos con ovocitos en muerte autofágica.
- La autofagia en ovocitos de folículos atrésicos es mediada por la fosforilación de ULK1 en la serina 555.
- TSC2 podría estar influyendo sobre la activación de la autofagia como una consecuencia de en la disminución de nutrientes.
- La muerte autofágica de los ovocitos de rata de 19 y 28 días podrían involucrar a las rutas de señalización AMPK/ULK1 y TSC2/mTOR.

XII. Bibliografía.

1. Abounit, K., Scarabelli, T. M., & McCauley, R. B. (2012). Autophagy in mammalian cells. *World journal of biological chemistry*, 3(1), 1.
2. 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.
3. Arakelian, T., Mgrditchian, T., Viry, E., Van Moer, K., Berchem, G., Chouaib, S., & Janji, B. (2015). Autophagy Regulation of the Tumor Immunity—An Old Machinery for a New Function. In *Cell Death-Autophagy, Apoptosis and Necrosis*. IntechOpen.
4. Axe, E. L., Walker, S. A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H. L., Habermann, A., Griffiths G., & Ktistakis, N., T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Biology*, 182(4), 685-701.
5. Baehrecke, E. H. Autophagy: dual roles in life and death? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 505–510 (2005).
6. Bailly, Y. (2013). Autophagy - A Double-Edged Sword: Cell Survival or Death?. Esteves, A. R., Oliveira, C. R., & Cardoso, S. M. (2013). Autophagy, the “Master” Regulator of Cellular Quality Control: *What Happens when Autophagy Fails?*
7. Bakula, D., Müller, A. J., Zuleger, T., Takacs, Z., Franz-Wachtel, M., Thost, A. K., ... & Proikas-Cezanne, T. (2017). WIPI3 and WIPI4 β -propellers are scaffolds for LKB1-AMPK-TSC signalling circuits in the control of autophagy. *Nature communications*, 8(1), 15637.
8. Bejarano, E., & Cuervo, A. M. (2010). Chaperone-mediated autophagy. *Proceedings of the American thoracic society*, 7(1), 29-39.
9. Bialik, S., Dasari, S. K. & Kimchi, A. (2018). Autophagy-dependent cell death—where, how and why a cell eats itself to death. *Journal of cell science*, 131(18), jcs215152.
10. Birgisdottir, Á. B., Moulleron, S., Bhujabal, Z., Wirth, M., Sjøttem, E., Evjen, G., Zhanjg, W., Lee, R., O'Reilly, N., Tooze, S. A., Lamark, T. & Johansen, T. (2019). Members of the autophagy class III phosphatidylinositol 3-kinase complex I interact with GABARAP and GABARAP1 via LIR motifs. *Autophagy*, 15(8), 1333-1355.
11. Boya, P., Reggiori, F., & Codogno, P. (2013). Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature cell biology*, 15(7), 713-720.
12. Brüel, A., Christensen, E. I., Trantum-Jensen, J., Qvortrup, K., & Geneser, F. (2015). *Geneser histología* (No. H200 GEN 4a. ed.).
13. 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
14. Budanov, A. V., & Karin, M. (2008). p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell*, 134(3), 451-460.
15. Cao, Q., Du, H., Fu, X., Duan, N., Liu, C., & Li, X. (2020). Artemisinin attenuated atherosclerosis in high-fat diet—Fed ApoE^{-/-} mice by promoting macrophage autophagy through the AMPK/mTOR/ULK1 pathway. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 75(4), 321-332.
16. Cheng, J. P., & Lane, J. D. (2010). Organelle dynamics and membrane trafficking in apoptosis and autophagy. *Histology and histopathology*.

17. Choi, J. Y., Jo, M. W., Lee, E. Y., Yoon, B. K. & Choi, D. S. (2010). The role of autophagy in follicular development and atresia in rat granulosa cells. *Fertility and sterility*, 93(8), 2532-2537.
18. Choi, J., Jo, M., Lee, E., & Choi, D. (2014). AKT is involved in granulosa cell autophagy regulation via mTOR signaling during rat follicular development and atresia. *Reproduction*, 147(1), 73-80.
19. Clarke, H. J. (2018). Regulation of germ cell development by intercellular signaling in the mammalian ovarian follicle. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 7(1), e294.
20. Cloonan, S. M., & Williams, D. C. (2011). The antidepressants maprotiline and fluoxetine induce Type II autophagic cell death in drug-resistant Burkitt's lymphoma. *International journal of cancer*, 128(7), 1712-1723.
21. Codogno, P., & Meijer, A. J. (2006). Atg5: more than an autophagy factor. *Nature cell biology*, 8(10), 1045-1047.
22. Codogno, P., & Meijer, A. J. (2013). Autophagy in the liver. *Journal of hepatology*, 59(2), 389-391.
23. Copp, J., Manning, G., & Hunter, T. (2009). TORC-specific phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR): phospho-Ser2481 is a marker for intact mTOR signaling complex 2. *Cancer research*, 69(5), 1821-1827.
24. Costas, M. A., & Rubio, M. F. (2017). *Autofagia, una estrategia de supervivencia celular*. Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.
25. Datan, E., Shirazian, A., Benjamin, S., Matassov, D., Tinari, A., Malorni, W., Lockshin R. A., Garcia-Sastre, A. & Zakeri, Z. (2014). mTOR/p70S6K signaling distinguishes routine, maintenance-level autophagy from autophagic cell death during influenza A infection. *Virology*, 452, 175-190.
26. Debnath, J., Baehrecke, E. H. & Kroemer, G. Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy* 1, 66–74 (2005).
27. Degterev, A., & Yuan, J. (2008). Expansion and evolution of cell death programmes. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(5), 378-390.
28. Deleyto-Seldas, N., & Efeyan, A. (2021). The mTOR–autophagy axis and the control of metabolism. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 1519.
29. Denton, D., & Kumar, S. (2019). Autophagy-dependent cell death. *Cell Death & Differentiation*, 26(4), 605-616.
30. DeYoung, M. P., Horak, P., Sofer, A., Sgroi, D., & Ellisen, L. W. (2008). Hypoxia regulates TSC1/2–mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14–3–3 shuttling. *Genes & development*, 22(2), 239-251.
31. Di Nardo, A., Wertz, M. H., Kwiatkowski, E., Tsai, P. T., Leech, J. D., Greene-Colozzi, E., Goto, J., Dilsiz, P., Talos, D. M., Clish, B. C., Kwiatkowski, D. J. & Sahin, M. (2014). Neuronal Tsc1/2 complex controls autophagy through AMPK-dependent regulation of ULK1. *Human molecular genetics*, 23(14), 3865-3874.
32. Dossou, A. S., & Basu, A. (2019). The emerging roles of mTORC1 in macromanaging autophagy. *Cancers*, 11(10), 1422.
33. Egan, D. F., Shackelford, D. B., Mihaylova, M. M., Gelino, S., Kohnz, R. A., Mair, W., Vázquez D. S., Joshi, A., Gwinn D. M., Taylor. R., Asara J. M., Fitzpatrick. J., Dillin. A., Viollet. B., Kundu. M., Hansen. M. & Shaw, R. J. (2011). Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science*, 331(6016), 456-461.
34. Ersahin, T., Tuncbag, N., & Cetin-Atalay, R. (2015). The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. *Molecular BioSystems*, 11(7), 1946-1954.

35. Escobar, M. L., Echeverría, O. M. and Vázquez-Nin, G. H. (2013). *Autophagy- A Double-Edged Sword - Cell Survival or Death?* edited by Yannick Bailly. In Tech.
36. Escobar, M. L., Echeverría, O. M., & Vázquez-Nin, G. H. (2013). Role of autophagy in the ovary cell death in mammals. *Autophagy-A Double-Edged Sword-Cell Survival or Death*, 423-441.
37. 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), 1253-1266.
38. 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.
39. Escobar, M. L., Echeverría, O. M., Casasa, A. S., García, G, Aguilar, S. J. & Vázquez-Nin, G. H. Involvement of Pro-Apoptotic and Pro-Autophagic Proteins in Granulosa Cell Death *Cell Biology* Vol. 1, No. 1, 2013, pp. 9-17. doi: 10.11648/j.cb.20130101.12
40. Feng, Y., He, D., Yao, Z., & Klionsky, D. J. (2014). The machinery of macroautophagy. *Cell research*, 24(1), 24-41.
41. Filali-Mounecef, Y., Hunter, C., Roccio, F., Zagkou, S., Dupont, N., Primard, C., Proikas-Cezanne, T. & Reggiori, F. (2021). The ménage à trois of autophagy, lipid droplets and liver disease. *Autophagy*, 1-24.
42. Findlay, J. K., Dunning, K. R., 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.
43. Fimia, G. M., Stoykova, A., Romagnoli, A., Giunta, L., Di Bartolomeo, S., Nardacci, R., Corazzari M., Fuoco C., Ucar A., Schwartz P., Gruss P., Piacentini M., Chowdhury K. & Cecconi, F. (2007). Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature*, 447(7148), 1121-1125.
44. Flores-Pérez, F. I., Rosas-Velasco, C., Pardo, M. C. R., & Pérez-Martínez, M. (2005). Apoptosis y atresia folicular: Un binomio esencial en el desarrollo ovárico. *Veterinaria México*, 36(1), 87-103.
45. 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.
46. Galluzzi, L., Vitale, I., *et al.* (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25(3), 486-541.
47. Gartner, L. P., & Hiatt, J. L. (2006). *Atlas en color y texto de histología*. Médica Panamericana.
48. 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.
49. Ghosh, A. K., Mau, T., O'Brien, M., & Yung, R. (2018). Novel role of autophagy-associated Pik3c3 gene in gonadal white adipose tissue browning in aged C57/Bl6 male mice. *Aging (Albany NY)*, 10(4), 764.
50. Grasso, D., Ropolo, A., & Vaccaro, M. I. (2015). Autophagy in Cell Fate and Diseases. *Cell Death-Autophagy, Apoptosis and Necrosis*, 1, 3-26.
51. Hara, T., Takamura, A., Kishi, C., Iemura, S. I., Natsume, T., Guan, J. L., & Mizushima, N. (2008). FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *Journal of Cell Biology*, 181(3), 497-510.
52. Harrington, L. S., Findlay, G. M., Gray, A., Tolkacheva, T., Wigfield, S., Rebholz, H., Barnett, J., Leslie, N. R., Cheng, S., Shepherd, P. R., Gout, I., Downes P. & Lamb, R. F. (2004). The

TSC1-2 tumor suppressor controls insulin–PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *The Journal of cell biology*, 166(2), 213-223.

53. Hashiguchi, Y., Tsuda, H., Inoue, T., Berkowitz, R. S., & Mok, S. C. (2006). PTEN expression in clear cell adenocarcinoma of the ovary. *Gynecologic oncology*, 101(1), 71-75.
54. He, C., & Klionsky, D. J. (2007). Atg9 trafficking in autophagy-related pathways. *Autophagy*, 3(3), 271-274.
55. Heras-Sandoval, D., Pérez-Rojas, J. M., Hernández-Damián, J., & Pedraza-Chaverri, J. (2014). The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration. *Cellular signalling*, 26(12), 2694-2701.
56. Hirshfield, A. N. (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. *International review of cytology*, 124, 43-101.
57. Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura S., Natsume T., Takehana K., Yamada N., Guan J.L., Oshiro N. & Mizushima, N. (2009). Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1–Atg13–FIP200 complex required for autophagy. *Molecular biology of the cell*, 20(7), 1981-1991.
58. Hosokawa, N., Sasaki, T., Iemura, S. I., Natsume, T., Hara, T., & Mizushima, N. (2009). Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy*, 5(7), 973-979.
59. Hu, Z., Yang, B., Mo, X., & Xiao, H. (2015). Mechanism and regulation of autophagy and its role in neuronal diseases. *Molecular neurobiology*, 52(3), 1190-1209.
60. Huang L., Wang, Z. B., Jiang, Z. Z., Hu, M. W., Lin, F., Zhang, Q. H., Lou, Yi-Bo, Hou Y., Zhao, Y., Fan, Heng-Yu., Schatten, H. & Sun, Q. Y. (2013). Specific disruption of Tsc1 in ovarian granulosa cells promotes ovulation and causes progressive accumulation of corpora lutea. *PLoS One*, 8(1), e54052.
61. 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
62. Hurley, J. H., & Young, L. N. (2017). Mechanisms of autophagy initiation. *Annual review of biochemistry*, 86, 225-244.
63. Hwang, J. Y., Gertner, M., Pontarelli, F., Court-Vazquez, B., Bennett, M. V. L., Ofengeim, D., & Zukin, R. S. (2017). Global ischemia induces lysosomal-mediated degradation of mTOR and activation of autophagy in hippocampal neurons destined to die. *Cell Death & Differentiation*, 24(2), 317-329.
64. Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima N., Tanida I., Kominami E., Ohsumi M., Noda T. & Ohsumi, Y. (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, 408(6811), 488-492.
65. Ikenoue, T., Hong, S., & Inoki, K. (2009). Monitoring mammalian target of rapamycin (mTOR) activity. *Methods in enzymology*, 452, 165-180.
66. 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.
67. Jing, X., Han, J., Zhang, J., Chen, Y., Yuan, J., Wang, J., Neo, S., Li, S., Yu, Z & Wu, J. (2021). Long non-coding RNA MEG3 promotes cisplatin-induced nephrotoxicity through regulating AKT/TSC/mTOR-mediated autophagy. *International Journal of Biological Sciences*, 17(14), 3968.
68. Jung, C. H., Ro, S. H., Cao, J., Otto, N. M., & Kim, D. H. (2010). mTOR regulation of autophagy. *FEBS letters*, 584(7), 1287-1295.
69. Jung, M., Choi, H., & Mun, J. Y. (2019). The autophagy research in electron microscopy. *Applied Microscopy*, 49(1), 1-7.
70. Junqueira, L. C. U., & Mescher, A. L. (2018). *Junqueira's basic histology*. McGraw-Hill Medical.

71. Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami E., Ohsumi Y. & Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *The EMBO journal*, 19(21), 5720-5728.
72. Kametaka, S., Okano, T., Ohsumi, M., & Ohsumi, Y. (1998). Apg14p and Apg6/Vps30p form a protein complex essential for autophagy in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(35), 22284-22291.
73. Kierszenbaum, A. L., & Tres, L. (2015). *Histology and cell biology: an introduction to pathology E-book*. Elsevier Health Sciences.
74. Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N., & Ohsumi, Y. (2001). Two Distinct Vps34 Phosphatidylinositol 3-Kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y Sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology*, 152(3), 519-530.
75. Kim, J. H., Choi, T. G., Park, S., Yun, H. R., Nguyen, N. N. Y., Jo, Y. H., Jang, M., Kim, J., Kim, J., Kang, i., Ha, J., Murphy, M. P., Tang, D. G. & Kim, S. S. (2018). Mitochondrial ROS-derived PTEN oxidation activates PI3K pathway for mTOR-induced myogenic autophagy. *Cell Death & Differentiation*, 25(11), 1921-1937.
76. 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.
77. Klionsky, D. J., & Codogno, P. (2013). The mechanism and physiological function of macroautophagy. *Journal of innate immunity*, 5(5), 427-433.
78. Krieg, S., Lüscher, B., Vervoorts, J., & Dohmen, M. (2018). Studying the role of AMPK in autophagy. In *AMPK* (pp. 373-391). Humana Press, New York, NY.
79. Kumariya, S., Ubba, V., Jha, R. K., & Gayen, J. R. (2021). Autophagy in ovary and polycystic ovary syndrome: role, dispute and future perspective. *Autophagy*, 17(10), 2706-2733.
80. Ladányi, A., & Tímár, J. (2020, February). Immunologic and immunogenomic aspects of tumor progression. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 60, pp. 249-261). Academic Press.
81. Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2013). Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *Journal of cell science*, 126(8), 1713-1719.
82. Leung, P. & Adashi E. (2019) *The Ovary*. 3rd Edición. Academic Press. Rodriguez, A., Rydze, R. T., Briley, S. M., & Pangas, S. A. (2019). Transgenic Mouse Models in the Study of Ovarian Function. In *The Ovary* (pp. 295-310). Academic Press. Ross, M. H., & Pawlina, W. (2015). *Histología*. Lippincott Williams & Wilkins.
83. Li, J., & Wang, W. (2021). Mechanisms and Functions of Pexophagy in Mammalian Cells. *Cells*, 10(5), 1094.
84. Li, R., & Albertini, D. F. (2013). The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14(3), 141-152.
85. Li, X., He, S., & Ma, B. (2020). Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Molecular cancer*, 19(1), 12.
86. Liang, C., Feng, P., Ku, B., Dotan, I., Canaani, D., Oh, B. H., & Jung, J. U. (2006). Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nature cell biology*, 8(7), 688-698.
87. Liang, X. H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., & Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, 402(6762), 672-676.
88. Lin, F. H., Zhang, W. L., Li, H., Tian, X. D., Zhang, J., Li, X., Li, C. Y. y Tan, J. H. (2018). Role of autophagy in modulating post-maturation aging of mouse oocytes. *Cell Death & Disease*, 9(3), 308.
89. Liu, L. Q., Wang, S. B., Shao, Y. F., Shi, J. N., Wang, W., Chen, W. Y., Ye, Z., Jia, Y., J., Fang, Q., Zhang, G., B. & Xuan, Z. X. (2019). Hydroxychloroquine potentiates the anti-cancer effect of bevacizumab on glioblastoma via the inhibition of autophagy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 118, 109339.

90. Liu, L., Liao, J. Z., He, X. X., & Li, P. Y. (2017). The role of autophagy in hepatocellular carcinoma: friend or foe. *Oncotarget*, 8(34), 57707.
91. Liu, M., Zhu, H., Zhu, Y., & Hu, X. (2021). Guizhi Fuling Wan reduces autophagy of granulosa cell in rats with polycystic ovary syndrome via restoring the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Journal of Ethnopharmacology*, 270, 113821.
92. Ma, X., Zhang, S., He, L., Rong, Y., Brier, L. W., Sun, Q., Liu, R., Fan, W., Chen, S. Yue, Z., Kim, J., Guan, K. L., Li, D. & Zhong, Q. (2017). mTORC1-mediated NRBF2 phosphorylation functions as a switch for the class III PtdIns3K and autophagy. *Autophagy*, 13(3), 592-607.
93. Mallela, K., & Kumar, A. (2021). Role of TSC1 in physiology and diseases. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1-14.
94. Mammucari, C., Schiaffino, S., & Sandri, M. (2008). Downstream of Akt: FoxO3 and mTOR in the regulation of autophagy in skeletal muscle. *Autophagy*, 4(4), 524-526.
95. Matsunaga, K., Saitoh, T., Tabata, K., Omori, H., Satoh, T., Kurotori, N., Maejima I., Shirahama-Noda K., Ichimura T., Isobe T., Akira S., Noda T. & Yoshimori, T. (2009). Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nature cell biology*, 11(4), 385-396.
96. Matsuzawa-Ishimoto, Y., Hwang, S., & Cadwell, K. (2018). Autophagy and inflammation. *Annual Review of Immunology*, 36, 73-101.
97. Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes & development*, 21(22), 2861-2873.
98. Mizushima, N. (2010). The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Current opinion in cell biology*, 22(2), 132-139.
99. Mizushima, N. (2020). The ATG conjugation systems in autophagy. *Current opinion in cell biology*, 63, 1-10.
100. Mizushima, N., Kuma, A., Kobayashi, Y., Yamamoto, A., Matsubae, M., Takao, T., Natsume T., Ohsumi Y. & Yoshimori, T. (2003). Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *Journal of cell science*, 116(9), 1679-1688.
101. Mizushima, N., Noda, T., & Ohsumi, Y. (1999). Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. *The EMBO journal*, 18(14), 3888-3896.
102. Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M. D., Klionsky D.J., Ohsumi M. & Ohsumi, Y. (1998). A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*, 395(6700), 395-398.
103. Mizushima, N., Sugita, H., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (1998). A new protein conjugation system in human: the counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 273(51), 33889-33892.
104. Nemoto, T., Tanida, I., Tanida-Miyake, E., Minematsu-Ikeguchi, N., Yokota, M., Ohsumi, M., Ueno T. & Kominami, E. (2003). The mouse APG10 homologue, an E2-like enzyme for Apg12p conjugation, facilitates MAP-LC3 modification. *Journal of Biological Chemistry*, 278(41), 39517-39526.
105. Nippita, T. A., & Baber, R. J. (2007). Premature ovarian failure: a review. *Climacteric*, 10(1), 11-22.
106. Noda, T., Kim, J., Huang, W. P., Baba, M., Tokunaga, C., Ohsumi, Y., & Klionsky, D. J. (2000). Apg9p/Cvt7p is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the Cvt and autophagy pathways. *The Journal of cell biology*, 148(3), 465-480.
107. Noguchi, M., Hirata, N., & Suizu, F. (2014). The links between AKT and two intracellular proteolytic cascades: ubiquitination and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1846(2), 342-352.
108. Oakhill, J. S., Scott, J. W., & Dite, T. A. (2018). Transient expression of AMPK heterotrimer complexes in mammalian cells. In *AMPK* (pp. 159-169). Humana Press, New York, NY.

109. Obara, K., Sekito, T., & Ohsumi, Y. (2006). Assortment of phosphatidylinositol 3-kinase complexes—Atg14p directs association of complex I to the pre-autophagosomal structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, *17*(4), 1527-1539.
110. Odle, R. I., Florey, O., Ktistakis, N. T., & Cook, S. J. (2021). CDK1, the Other 'Master Regulator' of Autophagy. *Trends in Cell Biology*, *31*(2), 95-107.
111. Palacios, D. D. E., Miró, D. D. M. & Boticario, C. (2011). Muerte celular y cáncer: Las vías de la apoptosis y de la autofagia como dianas en la terapia del cáncer. *Anales de la Real Academia de Doctores de España*, *15*(2), 191-215.
112. Pankiv, S., Alemu, E. A., Brech, A., Bruun, J. A., Lamark, T., Øvervatn, A., Bjorkoy G. & Johansen, T. (2010). FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport. *Journal of Cell Biology*, *188*(2), 253-269.
113. Parmar, N., & Tamanoi, F. (2010). Rheb G-Proteins and the Activation of mTORC1. In *The Enzymes* (Vol. 27, pp. 39-56). Academic Press.
114. Parzych, K. R., & Klionsky, D. J. (2014). An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants & redox signaling*, *20*(3), 460-473.
115. Petherick, K. J., Conway, O. J., Mpamhanga, C., Osborne, S. A., Kamal, A., Saxty, B., & Ganley, I. G. (2015). Pharmacological inhibition of ULK1 kinase blocks mammalian target of rapamycin (mTOR)-dependent autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(18), 11376-11383.
116. Petiot, A., Ogier-Denis, E., Blommaert, E. F., Meijer, A. J., & Codogno, P. (2000). Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(2), 992-998.
117. Pinton, P., Giorgi, C., Siviero, R., Zecchini, E., & Rizzuto, R. (2008). Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. *Oncogene*, *27*(50), 6407-6418.
118. Pinzón, C. E., Serrano, M. L., & Sanabria, M. C. (2009). Role of phosphatidylinositol 3-kinase pathway (PI3K/Akt) in humans. *Revista Ciencias de la Salud*, *7*(2), 47-66.
119. Polson, H. E., de Lartigue, J., Rigden, D. J., Reedijk, M., Urbé, S., Clague, M. J., & Tooze, S. A. (2010). Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy*, *6*(4), 506-522.
120. Proikas-Cezanne, T., Takacs, Z., Dönnies, P., & Kohlbacher, O. (2015). WIPI proteins: essential PtdIns3P effectors at the nascent autophagosome. *Journal of cell science*, *128*(2), 207-217.
121. Qin, L., Wang, Z., Tao, L., & Wang, Y. (2010). ER stress negatively regulates AKT/TSC/mTOR pathway to enhance autophagy. *Autophagy*, *6*(2), 239-247.
122. Ranek, M. J., Kokkonen-Simon, K. M., Chen, A., Dunkerly-Eyring, B. L., Vera, M. P., Oeing, C. U., ... & Kass, D. A. (2019). PKG1-modified TSC2 regulates mTORC1 activity to counter adverse cardiac stress. *Nature*, *566*(7743), 264-269.
123. Reddy, P., Zheng, W., & Liu, K. (2010). Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *21*(2), 96-103.
124. Ren, J., Liang, R., Wang, W., Zhang, D., Yu, L., & Feng, W. (2020). Multi-site-mediated entwining of the linear WIR-motif around WIPI β-propellers for autophagy. *Nature communications*, *11*(1), 1-9.
125. Rizzuto, R., Giorgi, C., Romagnoli, A., & Pinton, P. (2008). Ca²⁺ signaling, mitochondria and cell death. *Current molecular medicine*, *8*(2), 119-130.
126. Roach, P. J. (2011). AMPK→ uLK1→ autophagy. *Molecular and cellular biology*, *31*(15), 3082-3084.

127. Rogov, V., Dötsch, V., Johansen, T., & Kirkin, V. (2014). Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *Molecular cell*, 53(2), 167-178.
128. Sagiv, Y., Legesse-Miller, A., Porat, A., & Elazar, Z. (2000). GATE-16, a membrane transport modulator, interacts with NSF and the Golgi v-SNARE GOS-28. *The EMBO journal*, 19(7), 1494-1504.
129. 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.
130. Shang, L., Chen, S., Du, F., Li, S., Zhao, L., & Wang, X. (2011). Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(12), 4788-4793.
131. Shimizu, S. (2018). Biological roles of alternative autophagy. *Molecules and cells*, 41(1), 50.
132. Shintani, T., Mizushima, N., Ogawa, Y., Matsuura, A., Noda, T., & Ohsumi, Y. (1999). Apg10p, a novel protein-conjugating enzyme essential for autophagy in yeast. *The EMBO journal*, 18(19), 5234-5241.
133. Shintani, T., Suzuki, K., Kamada, Y., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2001). Apg2p functions in autophagosome formation on the perivacuolar structure. *Journal of Biological Chemistry*, 276(32), 30452-30460.
134. Simonsen, A., Birkeland, H. C., Gillooly, D. J., Mizushima, N., Kuma, A., Yoshimori, T., Slagsvold T., Brech A. & Stenmark, H. (2004). Alf1, a novel FYVE-domain-containing protein associated with protein granules and autophagic membranes. *Journal of cell science*, 117(18), 4239-4251.
135. Sun, F., Xu, X., Wang, X., & Zhang, B. (2016). Regulation of autophagy by Ca²⁺. *Tumor Biology*, 37(12), 15467-15476.
136. Taguchi-Atarashi, N., Hamasaki, M., Matsunaga, K., Omori, H., Ktistakis, N. T., Yoshimori, T., & Noda, T. (2010). Modulation of local PtdIns3P levels by the PI phosphatase MTMR3 regulates constitutive autophagy. *Traffic*, 11(4), 468-478.
137. Tamargo-Gómez, I., & Mariño, G. (2018). AMPK: regulation of metabolic dynamics in the context of autophagy. *International journal of molecular sciences*, 19(12), 3812.
138. Tanida, I. (2011). Autophagy basics. *Microbiology and immunology*, 55(1), 1-11.
139. Tanida, I., Mizushima, N., Kiyooka, M., Ohsumi, M., Ueno, T., Ohsumi, Y., & Kominami, E. (1999). Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy. *Molecular biology of the cell*, 10(5), 1367-1379.
140. Tanida, I., Sou, Y. S., Minematsu-Ikeguchi, N., Ueno, T., & Kominami, E. (2006). Atg8L/Apg8L is the fourth mammalian modifier of mammalian Atg8 conjugation mediated by human Atg4B, Atg7 and Atg3. *The FEBS journal*, 273(11), 2553-2562.
141. Tanida, I., Tanida-Miyake, E., Komatsu, M., Ueno, T., & Kominami, E. (2002). Human Apg3p/Aut1p homologue is an authentic E2 enzyme for multiple substrates, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3, and facilitates the conjugation of hApg12p to hApg5p. *Journal of Biological Chemistry*, 277(16), 13739-13744.
142. Tanida, I., Tanida-Miyake, E., Ueno, T., & Kominami, E. (2001). The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Apg7p is a Protein-activating enzyme for multiple substrates including human Apg12p, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3. *Journal of Biological Chemistry*, 276(3), 1701-1706.
143. Tornero-Écija, A., Tábara, L. C., Bueno-Arribas, M., Antón-Esteban, L., Navarro-Gómez, C., Sánchez, I., Vincent, O. & Escalante, R. (2021). A Dictyostelium model for BPAN disease reveals a functional relationship between the WDR45/WIPI4 homolog Wdr45l and Vmp1 in the regulation of autophagy-associated PtdIns3P and ER stress. *Autophagy*, 1-17.

144. Trelford, C. B., & Di Guglielmo, G. M. (2021). Canonical and non-canonical TGF β signaling activate autophagy in an ULK1-dependent manner. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 712124.
145. Valentich M.A., Eynard, A. R. & Rovasio A. (2008) Sistema reproductor femenino. En: Eynard, A. R., Valentich M.A. & Rovasio, R. A. (Eds.). *Histología y embriología del ser humano: bases celulares y moleculares*. 4ta edición. Argentina: Eeditorial Médica Panamericana.
146. van Veelen, W., Korsse, S. E., van de Laar, L., & Peppelenbosch, M. P. (2011). The long and winding road to rational treatment of cancer associated with LKB1/AMPK/TSC/mTORC1 signaling. *Oncogene*, 30(20), 2289-2303.
147. Vázquez-Nin, G. H., Escobar, M. L., De Felici, M., Echeverría, O. M., & Klinger, F. G. (2011). *Cell Death in Mammalian Ovary*. Springer Science & Business Media.
148. Vergne, I., Roberts, E., Elmaoued, R. A., Tosch, V., Delgado, M. A., Proikas-Cezanne, T., Laporte J. & Deretic, V. (2009). Control of autophagy initiation by phosphoinositide 3-phosphatase Jumpy. *The EMBO journal*, 28(15), 2244-2258.
149. Wang, H., Bedford, F. K., Brandon, N. J., Moss, S. J., & Olsen, R. W. (1999). GABA A-receptor-associated protein links GABA A receptors and the cytoskeleton. *Nature*, 397(6714), 69-72.
150. Wei, Y., Liu, M., Li, X., Liu, J., & Li, H. (2018). Origin of the autophagosome membrane in mammals. *BioMed research international*, 2018.
151. Wesselborg, S., & Stork, B. (2015). Autophagy signal transduction by ATG proteins: from hierarchies to networks. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(24), 4721-4757.
152. William, K. O. (2013). *Netter's Essential Histology 2e*. ELSEVIER.
153. Wirth, M., Zhang, W., Razi, M., Nyoni, L., Joshi, D., O'Reilly, N., Johansen, T., Tooze, S. A., & Moulleron, S. (2019). Molecular determinants regulating selective binding of autophagy adapters and receptors to ATG8 proteins. *Nature communications*, 10(1), 2055.
154. Yadav, A. K., Yadav, P. K., Chaudhary, G. R., Tiwari, M., Gupta, A., Sharma, Pandey, A. N., Pandey, A. K. & Chaube, S. K. (2019). Autophagy in hypoxic ovary. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1-12.
155. Yadav, P. K., Tiwari, M., Gupta, A., Sharma, A., Prasad, S., Pandey, A. N., & Chaube, S. K. (2018). Germ cell depletion from mammalian ovary: possible involvement of apoptosis and autophagy. *Journal of biomedical science*, 25(1), 1-7.
156. You, F., Cao, J., Cheng, L., Liu, X., & Zeng, L. (2021). Hyperin Alleviates Triptolide-Induced Ovarian Granulosa Cell Injury by Regulating AKT/TSC1/mTORC1 Signaling. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021.
157. Youle, R. J., & Narendra, D. P. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nature reviews Molecular cell biology*, 12(1), 9-14.
158. Young, A. R., Chan, E. Y., Hu, X. W., Köchl, R., Crawshaw, S. G., High, S., Hailey D.W., Lippincott-Schwartz J. & Tooze, S. A. (2006). Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *Journal of cell science*, 119(18), 3888-3900.
159. Yu, X., Long, Y. C., & Shen, H. M. (2015). Differential regulatory functions of three classes of phosphatidylinositol and phosphoinositide 3-kinases in autophagy. *Autophagy*, 11(10), 1711-1728.
160. Yuan, X., Deng, X., Zhou, X., Zhang, A., Xing, Y., Zhang, Z., Zhang, H. & Li, J. (2018). MiR-126-3p promotes the cell proliferation and inhibits the cell apoptosis by targeting TSC1 in the porcine granulosa cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 54(10), 715-724.
161. Zeng, X., Overmeyer, J. H. & Maltese, W. A. (2006). Functional specificity of the mammalian Beclin-Vps34 PI 3-kinase complex in macroautophagy versus endocytosis and lysosomal enzyme trafficking. *Journal of cell science*, 119(2), 259-270.

162. Zhang, H., Cicchetti, G., Onda, H., Koon, H. B., Asrican, K., Bajraszewski, N., Vazquez, F., Carpenter, C. L. & Kwiatkowski, D. J. (2003). Loss of Tsc1/Tsc2 activates mTOR and disrupts PI3K-Akt signaling through downregulation of PDGFR. *The Journal of clinical investigation*, 112(8), 1223-1233.
163. Zhang, J., Kim, J., Alexander, A., Cai, S., Tripathi, D. N., Dere, R., Tee, A. R., Tait-Mulder, J., Nardo, D. A., Han, M. J., Kwiatkowski, E., Dunlop, A. E., Dood, M. K., Folkerth, D, R., Faust, L. P., Kastan, B. Sahin, M. & Walker, C. L. (2013). A tuberous sclerosis complex signalling node at the peroxisome regulates mTORC1 and autophagy in response to ROS. *Nature cell biology*, 15(10), 1186-1196.
164. Zheng, Y., Ma, L., Liu, N., Tang, X., Guo, S., Zhang, B. & Jiang, Z. (2019). Autophagy and apoptosis of porcine ovarian granulosa cells during follicular development. *Animals*, 9(12), 1111.
165. Zhong, Y., Wang, Q. J., Li, X., Yan, Y., Backer, J. M., Chait, B. T., Heintz N. & 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.
166. Zhou, B., Liu, J. Kang, R., Klionsky, D. J., Kroemer, G., & Tang, D. (2020). Ferroptosis is a type of autophagy-dependent cell death. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 66, pp. 89-100). Academic Press.
167. Zhou, J., Peng, X. & Mei, S. (2019). Autophagy in ovarian follicular development and atresia. *International journal of biological sciences*, 15(4), 726.