



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Estudio inmunohistoquímico del flujo autofágico en
ovocitos de rata adulta.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Bióloga

P R E S E N T A:

Alejandra Ortiz Morquecho



**DIRECTORA:
Dra. María Luisa Escobar Sánchez**

Ciudad Universitaria, CDMX, 2021



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:
APELLIDO PATERNO: Ortiz
APELLIDO MATERNO: Morquecho
NOMBRE: Alejandra
NO. DE CUENTA: 312208129
TELÉFONO: 5558016785
UBICACIÓN: Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
CARRERA: Biología
2. Datos de la tutora y secretaria del jurado:
GRADO: Dra.
APELLIDO PATERNO: Escobar
APELLIDO MATERNO: Sánchez
NOMBRES: María Luisa
CORREO: escobarluisa@ciencias.unam.mx
TELÉFONO: 5556224821
UBICACIÓN: Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Celular
3. Datos del sinodal y presidente del jurado:
GRADO: Dra.
APELLIDO PATERNO: Echeverría
APELLIDO MATERNO: Martínez
NOMBRES: Olga Margarita
CORREO: omem@ciencias.unam.mx
TELÉFONO: Universidad Nacional Autónoma de México
UBICACIÓN: Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Celular
4. Datos del sinodal y vocal del jurado:
GRADO: Dr.
APELLIDO PATERNO: López
APELLIDO MATERNO: Muñoz
NOMBRES: Hugo
CORREO: hugolm@comunidad.unam.mx
UBICACIÓN: Universidad Nacional Autónoma de México
FES Zaragoza
Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental
Zaragoza, Campus II.

5. Datos del sinodal y suplente I del jurado:

GRADO: Dra.
APELLIDO PATERNO: Segura
APELLIDO MATERNO: Valdez
NOMBRES: María de Lourdes
CORREO: lourdes_segura@ciencias.unam.mx
UBICACIÓN: Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Celular

6. Datos del sinodal y suplente II del jurado:

GRADO: M. en C.
APELLIDO PATERNO: Salinas
APELLIDO MATERNO: Velázquez
NOMBRES: Laura Silvia
CORREO: lsalinas@ifc.unam.mx
UBICACIÓN: Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Fisiología Celular

DEDICATORIA

A mis abuelos quienes
con mucho amor,
dedicación, paciencia y
respeto, me educaron y
cuidaron hasta el último
día de sus vidas.

A mi hermanito,
quien se fue tan
pequeño sin poder
decirme adiós.

A mi primo Mario,
con mucho
cariño.

A los animales que
dieron sus vidas
para este proyecto,
a los cuales espero
poder honrar.

A la Facultad de
Ciencias, a la
Universidad Nacional
de México, al Anglo
Mexican Foundation y al
CONAMAT.

A todas las víctimas
durante la pandemia
de Covid-19.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de México. El trabajo experimental fue financiado por PAPIIT-IN227919 y PAPIIT-IA211020. El proyecto se llevó a cabo bajo la tutoría de la Dra. María Luisa Escobar Sánchez quien me invitó al taller cuando yo era su alumna de asignatura. Expresándole mi más sincera gratitud por su apoyo y compromiso antes y durante la pandemia de Covid-19.

Agradezco a la Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez por reforzar mis conocimientos de microscopia electrónica y óptica, entrenarme para hablar con confianza y elocuencia durante los seminarios en Laboratorio de Microscopia Electrónica, por aceptarme en su taller y apoyar este proyecto de tesis de licenciatura.

Al Dr. Gerardo Herbert Vázquez Nin por enseñarme el manejo del microscopio electrónico, y por revisar mis cortes ultrafinos y ayudarme a reconocer ciertas estructuras celulares.

A la Dra. Rosario Ortiz Hernández por todo el apoyo brindado dentro y fuera del laboratorio, por los conocimientos histológicos y la amable asistencia cuando se requería de ayuda con el equipo del laboratorio.

Al Candidato a Dr. Israel Muñoz Velasco por su soporte durante los últimos experimentos realizados, por el nuevo equipo para el microscopio electrónico de epifluorescencia, y por el de la computadora donde se realizaron las cuantificaciones correspondientes.

A la M. en C. Silvia Chavero Juárez por ayudarme con la enseñanza y elaboración de los cortes histológicos en el micrótomo del Taller de Microscopia Electrónica localizado en el sótano del edificio Tlahuizclapan de la Facultad de Ciencias. Además de instruirme técnicas histológicas y cómo procesar material biológico para microscopía electrónica y óptica.

A la Dra. Nayeli Torres Ramírez por enseñarme el manejo correcto de los animales de Laboratorio en el Bioterio de la Facultad de Ciencias.

A los miembros del jurado: Dra. Olga Margarita Echeverría Martínez (Presidente), Dra. Hugo López Muñoz (Vocal), Dra. María Luisa Escobar Sánchez, Dra. María de Lourdes Segura Valdez (Suplente 1) y M. en C. Laura Silvia Salinas Velázquez (Suplente 2), por haber aceptado ser mis sinodales y por brindarme gran apoyo durante la corrección de mi tesis.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi madre, María Teresa Morquecho Jiménez por haberme dado la vida, estar ahí para mí cuando el mundo me rompía el corazón, y por impulsarme a seguir adelante sin dejar de sonreírle a la vida.

A mis abuelos maternos, Delfina Jiménez Palomares y José Morquecho Perea, a quienes también considero como mis padres. Gracias por siempre creer en mí aunque los demás no lo hicieran, por jugar mucho conmigo cuando era pequeña, por nunca faltarme al respeto, y porque a pesar de haber sido criados con una educación machista, ustedes siempre me motivaron para estudiar y ser lo que yo deseara.

A mis primos Karla, Norma, Verónica, Juan y Mario por siempre aconsejarme, escucharme y hacerme reír. A mis queridas tías Juana Ortíz y Josefina Morquecho Perea.

A mi perrita Paris, por ser mi incondicional, mi compañera del crimen y mi mejor amiga desde mi último año de secundaria. Gracias a ti sé que sin importar lo que ocurra, todo estará bien porque estarás ahí cuando llegue a casa, moviendo tu colita al verme y recostándote sobre mis pies para que acaricie tu barriga.

A mis grandes amigos desde el bachillerato en el CCH Vallejo, Alejandro, Angélica, Elizabeth, Lillie, Víctor, Xóchitl y con especial recuerdo, a Gerardo León. Sospecho que jamás las palabras podrán expresar correctamente el impacto que dejaron en mí.

A mis amigos Leslie, Carlos, Miroslava y Esmeralda por haber sido parte de mi truculenta transición a la universidad.

A los amigos que hice durante los años más agitados de la carrera y que estuvieron ahí para mí tanto en los momentos felices como en los oscuros: Jessica, Bryan, Patricia, Santiago, Isaac Alexander, Samuel, Alain, Eva, Pablo, Lalo, Perla y Judá.

A los excelentes profesores de la facultad con quienes tuve la gran fortuna de tomar sus clases: Getsemaní Sinaí Villanueva, María Berenit Mendoza, María Ivonne Reyes, Carlos Jesús Balderas, Adriana Judith Xóchitl González, Mónica Salmereón, Rita Virginia Arenas, María del Pilar Torres, Patricia Rivas, Rosario Ortiz, Diana Torres, Claudia Ivette Rivas, Benito Estrada, Wendy Beatriz Pérez, Fabiola Ramírez, Eréndida Alvarez, Guadalupe Vidal Gaona, Sandra Castro, María Luisa Escobar, Olga Margarita Echeverría, Zenón Cannon, Lilibian Itze López y Mónica Elías.

A todas las células de mi cuerpo por haberme servido durante todos estos años. Agradezco de todo corazón que vivan, trabajen, protejan y mueran por mí. Gracias a la biología he comprendido que nunca encontraré un amor más puro que el que ustedes tienen por mí. Perdónenme si alguna vez no las cuidé como ustedes realmente merecen.

A mi país, México. Porque a pesar de todos sus problemas ambientales, económicos, políticos y sociales, hay algo en su riqueza que una vez que te conquista, te arranca el corazón y no te lo devuelve nunca más.

ÍNDICE

I.	RESUMEN.....	8
	ABSTRACT	9
II.	ABREVIATURAS.	10
III.	INTRODUCCIÓN.....	13
	1. Ovario.	13
	1.1. Folliculogénesis.....	14
	1.2 Función del ovario.	16
	1.3. Ovario de rata.....	17
	2. Atresia folicular.....	19
	3. Muerte celular.	21
	3.1. Apoptosis.....	22
	3.1.1. Vía extrínseca de la apoptosis.	24
	3.1.2. Vía intrínseca de la apoptosis.....	25
	3.2. Necrosis.	26
	3.3. Autofagia.	29
	4. Mecanismos moleculares de la autofagia.....	30
	4.1. Células somáticas.	30
	4.2. Patologías asociadas a la autofagia.....	32
	5. Flujo autofágico.....	34
IV.	ANTECEDENTES	38
V.	JUSTIFICACIÓN	39
VI.	HIPÓTESIS	39
VII.	OBJETIVOS.....	39
VIII.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	40
	i. Procesamiento del material biológico.....	40
	ii.Tinción Hematoxilina-Eosina.	40
	iii.Inmunolocalizaciones de LAMP-1, LC3, mTOR, mTORp y p62.....	42
	iv.Cuantificación de la intensidad de fluorescencia.....	43
IX.	RESULTADOS.....	44
	1. Morfología en el ovario de rata durante el ciclo estral.....	44
	2. Análisis inmunohistoquímico de proteínas relacionadas a la autofagia.....	49
X.	DISCUSIÓN.....	56
XI.	CONCLUSIONES.....	59
XII.	REFERENCIAS.....	60

I. RESUMEN.

Los ovarios de los mamíferos son estructuras organizadas cuyas funciones principales son la producción de hormonas y de células germinales (ovocitos). Estos órganos están constituidos por estructuras denominadas folículos ováricos que proporcionan un microambiente estable para el ovocito en desarrollo. Se sabe que los folículos atraviesan diversas etapas de maduración hasta alcanzar la etapa pre-ovulatoria. No obstante, no todos los folículos terminan el proceso de maduración, y suelen ser eliminados mediante un proceso llamado atresia folicular el cual puede llevarse a cabo mediante vías apoptóticas y no apoptóticas.

La autofagia es un proceso de supervivencia bajo condiciones estresantes como la inanición, hipoxia, disminución de factores de crecimiento, organelos dañados, patógenos, proteínas agregadas y especies reactivas de oxígeno (ROS). Sin embargo, este proceso de degradación es una vía de muerte celular que participa durante el desarrollo folicular y la atresia folicular.

En el presente trabajo, se observó que hay folículos atrésicos en ovarios de ratas en diferentes fases del ciclo estral. Los folículos atrésicos se pueden identificar morfológicamente porque presentan un estructura colapsada, el ovocito se degenera y manifiesta una forma ovoide, hay desprendimiento de la zona pelúcida, y las células de la granulosa empiezan a separarse y a sufrir apoptosis.

Adicionalmente, también se observaron regiones claras en el citoplasma de ovocitos atrésicos de diferentes organismos. Lo que sugirió que estas estructuras pudieran ser vesículas y que por lo tanto, se esté llevando a cabo actividad autofágica dentro de esos ovocitos.

Para definir si las vesículas claras observadas en los ovocitos atrésicos correspondían al proceso autofágico, se inmunodetectaron las proteínas relacionadas con la autofagia LAMP-1, LC3, mTOR, mTORp y p62. En primer lugar, se identificaron lisosomas ya que estos organelos están estrechamente relacionados con la degradación de material citosólico, lo que ocasionó un alto marcaje de la proteína LAMP-1. Además, se identificó una marca incrementada de la proteína LC3 en ovocitos atrésicos indicando presencia directa de autofagosomas.

Una vez definido que los ovocitos atrésicos con vesículas claras están en proceso autofágico, se identificó a la participación de la proteína mTOR en su forma fosforilada y una reducción en su forma no fosforilada en ovocitos atrésicos. Finalmente, se identificó el flujo autofágico por medio de la inmunodetección de p62. Las observaciones realizadas en el presente trabajo permitieron definir que hay una disminución en la marca de p62 en aquellos ovocitos atrésicos cuyo citoplasma contiene muchas vesículas claras, en comparación con los ovocitos de folículos sanos. Nuestros resultados nos permitieron definir que no sólo hay secuestro del material citoplasmático en autofagosomas, sino también se está llevando a cabo en los ovocitos una completa degradación, conduciéndolos a la eliminación celular.

ABSTRACT

The mammalian ovaries are organized structures which main functions are the production of hormones and germ cells (oocytes). These organs are constituted by structures denominated ovarian follicles that provide an stable microenvironment to the oocyte undergoing in development. It is known that follicles go through various stages of maturation until these reach the pre-ovulatory stage. However, not all the follicles finish the maturation process, and they are usually eliminated by a process called follicular atresia which can be carried out by apoptotic and non-apoptotic pathways.

The autophagy is a survival process under stress conditions like starvation, hipoxia, decrease of growth factors, damaged organelles, pathogens, aggregated proteins and also reactive oxygen species. Nevertheless, this degradation process is a cell death pathway which takes part during follicular development and follicular atresia.

In the present work, it was observed that there are atresic follicles in the ovaries from rats in different phases of the estrous cycle. The atretic follicles are morphologically identified because they have a collapsed structure, one altered oocyte with ovoid shape, detachment of the zona pellucida, and the granulosa cells separate and undergoing apoptosis.

Additionally, clear regions were also observed in the cytoplasm of altered oocytes of different organisms. Which suggested that these structures could be vesicles and therefore, an autophagic activity is taking place within these oocytes.

To define if the clear vesicles observed in atresic oocytes were corresponding to autophagic process, the LAMP-1, LC3, mTOR, mTORp and p62 proteins related to autophagy were immunodetected. Firstly, lysosomes were identified, these organelles are closely related to the degradation of cytosolic material which led to a high labeling of the LAMP-1 protein. Furthermore, an increased labeling corresponding to LC3 protein was identified in atresic oocytes indicating direct presence of autophagosomes.

Once defined that atresic oocytes with clear vesicles are in autophagic process, the participation of the protein mTOR was identified in its phosphorylated form and a decreased brand in its non-phosphorylated form in atresic oocytes. Finally, the autophagic flux was identified by the immunodetection of p62. The observations made in the present work allowed to define that there is a decreased brand of p62 in those atresic oocytes whose cytoplasm contains many clear vesicles in comparison to the healthy oocytes. Our results allow us to define that oocytes undergoing an increased process of autophagy, there is not only sequestration of cytosolic material in autophagosomes but also a complete degradation is carrying out in oocytes, conducting them to the cell elimination.

II. ABREVIATURAS.

ADP	Adenosín difosfato
ALFY	Proteína FYVE ligada a la autofagia
AMPK	Proteína cinasa activada por AMP
Ambra1	Molécula activadora y reguladora en Beclina-1 de la autofagia
Apaf-1	Factor activador de apoptosis-1
Atg	Genes relacionados con la autofagia
Atg1	Proteína cinasa serina-treonina 1
Atg3	Enzima análoga conjugadora de ubiquitina
Atg5	Proteína que contiene pliegues de ubiquitina
Atg7	Enzima homóloga activadora de ubuquitina
Atg9	Proteína transmembranal
Atg10	Enzima análoga conjugadora de ubiquitina
Atg12	Proteína tipo ubiquitina
Atg13	Componente del complejo Atg1
Atg14	Componente del complejo PtdIns 3-quinasa de clase III
Atg16	Componente del Atg12-Atg5-Atg16
Atg101	Proteína de unión a Atg13
Aven	Regulador de muerte celular Aven
BAD	Agonista asociada a la Bcl-2 de la muerte celular
BAK	Bcl2 antagonista asesino 1
BAX	Proteína X asociada a Bcl2
BH3	Dominio de homología Bcl2
Bcl-2	Proteínas del linfoma 2 de células B
Bcl-xL	Proteína relacionada con Bcl-2, isoforma larga
Bcl-w	Proteína tipo Bcl-2
CAD	DNasa activada por caspasa
CMA	Autofagia mediada por chaperonas
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenilindol
DED	Dominio de muerte
DISC	Complejo de señalización inductor de muerte
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ESCRT	Complejos de clasificación endosomal necesarios para la maquinaria de transporte
FADD	Proteína que contiene el dominio de muerte asociado a Fas

FIP200	Proteína de 200 kDa que interactúa con la cinasa de la familia FAK
FRP	Proteína reguladora folicular
FSH	Hormona folículoestimulante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofina
Hsc70	Proteína relacionada con el golpe de calor
Hsc90	Proteína de golpe de calor 90
HtrA2/Omi	Serina proteasa
IAP	Proteína inhibidora de apoptosis
IGF2R/CI-M6PR	Receptor del factor de crecimiento 2 similar a la insulina
LAMP-1	Proteína de membrana asociada a lisosomas I
LAMP-2	Proteína de membrana asociada a lisosomas II
LAMP-2A	Proteína de membrana asociada a lisosomas II-A
LC3	Cadena ligera 3 de la proteína asociada a microtúbulos
LC3-I	La forma citosólica de LC3
LC3-II	La forma conjugada de LC3-I con fosfatidiletanolamina (PE)
LH	Hormona luteinizante
LIR	Motivo de interacción con Atg8/LC3
MAPK 1/3	Proteína cinasa 1/3 activada por mitógeno
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MHC-II	Complejo principal de histocompatibilidad de clase II
MIS	Sustancia inductora de la meiosis
MLKL	Dominio de cinasa de linaje mixto
MPT	Transición de permeabilidad mitocondrial
Myc	Oncoproteína
mTOR	Serina/treonina cinasa blanco de rapamicina
mTORC1	Serina/treonina cinasa1 blanco de rapamicina
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
Noxa	Proteína 1 inducida por forbol-12-miristato-13-acetato
Nrf2	Factor 2 relacionado con NF-E2
OMI	Inhibidor de la maduración ovocítica
PARP-1	Polimerasa de poli (ribosa ADP)
PAS	Estructura pre-autofagosomal
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasa
P62/SQSTM1	Proteína secuestrosoma 1
PB1	Dominio Phox-BEMI N-terminal

PBS	Buffer fosfato salino
PE	Fosfatidiletanolamina
PI3KC3-CI	Complejo de fosfatidilinositol 3-cinasa III de clase I
PI3KC3-CII	Complejo de fosfatidilinositol 3-cinasa III de clase II
Pi	Fosfatidilinositol
PROTOR-1	Proteína observada con rictor-1
ProLC3	La forma de proteína precursora de LC3
PUMA	Modulador de apoptosis aumentada p53
RAPTOR	Proteína reguladora asociada de mTOR
Rheb	Homólogo de Ras enriquecido en cerebro
RHOA	Miembro de la familia del homólogo de Ras A
RICTOR	Rapamicina insensible compañero de mTOR
RIPK1	Receptor interactuante con la proteína serina/treonina cinasa 1
RIPK3	Receptor interactuante con la proteína serina/treonina cinasa 3
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SNARE	Receptores de proteínas de fijación soluble de NFS
Smac/DIABLO	Segundo activador mitocondrial de caspasas/proteína de unión directa a IAP con bajo PI
TLR	Receptores de tipo toll
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TNF-R	Receptor del factor de necrosis tumoral
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF
ULK1	Cinasa similar a Unc-51
UVRAG	Gen asociado a la resistencia a rayos UV
VDAC2	Proteína 2 del canal selectivo de aniones dependiente del voltaje
Vps15	Proteína de clasificación vacuolar-15
Vps34	Proteína de clasificación vacuolar-34

III. INTRODUCCIÓN.

1. Ovario.

La palabra “ovario” se deriva de la palabra latina “*ovum*”, que significa huevo (Edson *et al.*, 2009). El ovario es un compuesto altamente organizado de células germinales (ovocitos) y células somáticas (células de la granulosa, células tecales y células del estroma), cuyas interacciones dictan la formación de folículos, el desarrollo de los ovocitos, y las células somáticas como folículos, ovulación, y la formación del cuerpo lúteo (Fig. 1). Este último, constituye la estructura endocrina que se forma después de la ovulación y es necesario para establecer y mantener el embarazo (Richards & Pangas, 2010).

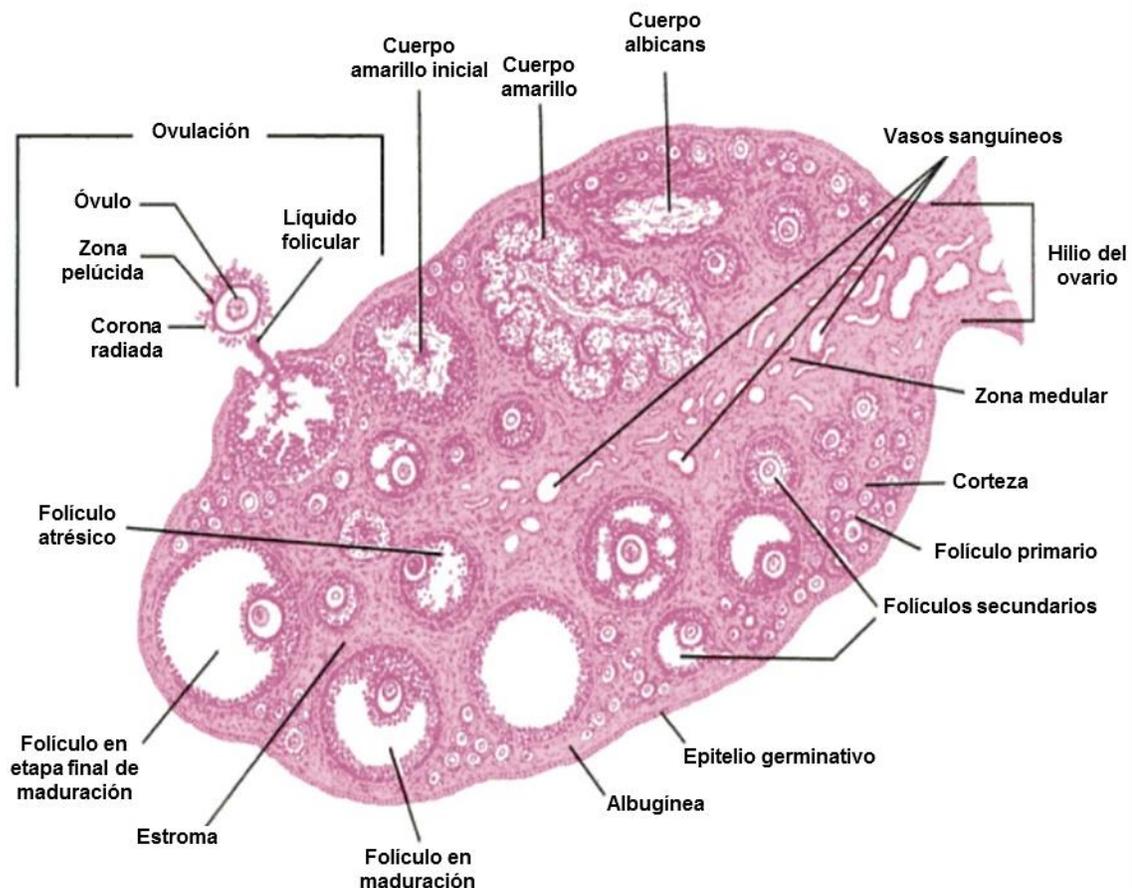


Fig. 1 Estructura ovárica. En este esquema se muestra que el ovario está compuesto por vasos sanguíneos, una zona medular, seguida de una corteza y que la superficie está cubierta por el epitelio germinativo el cual está sobre la túnica albugínea. Además, se presentan las etapas del desarrollo de los folículos desde el folículo primordial hasta el folículo de Graaf. Después de la ovulación, los folículos se convierten en cuerpos lúteos y finalmente se degenerarán conformando el cuerpo albicans (Modificado de Valentich *et al.*, 2008).

1.1 Foliculogénesis.

La foliculogénesis se refiere a un largo proceso de desarrollo por el que pasa un folículo, desde el momento en que abandona el grupo de reserva y comienza a crecer por proliferación celular y formación de antro hasta la ovulación o atresia (Fig. 2) (Saumande, 1991, Saumande, 1981; Paulini *et al.*, 2014). Peters *et al.* (1980) y Merchant-Larios y Chimal-Monroy (1989), mencionan que la foliculogénesis comienza antes del nacimiento en algunas especies de mamíferos (vaca, oveja y búfalo) o poco después del nacimiento en otras (ratón, rata y hámster) (Paulini *et al.*, 2014). Los folículos ováricos son estructuras generadas en los ovarios y tienen dos funciones principales, la producción de hormonas y de ovocitos (Zhou *et al.*, 2019).

Los folículos se desarrollan a través de las etapas primordial, primaria y secundaria antes de adquirir una cavidad antral (Fig. 2). De acuerdo con Gougeon (1996) y Hirshfield (1991), en la etapa antral, la mayoría de los folículos experimentan degeneración atrésica, mientras que algunos de ellos, bajo estimulación cíclica de la gonadotropina que ocurre después de la pubertad, alcanzan la etapa pre-ovulatoria. Estos folículos de Graaf son la principal fuente de secreción cíclica de estrógenos ováricos en mujeres en edad reproductiva. Fauser & Heusden (1997) mencionan que en respuesta a las oleadas preovulatorias de gonadotropina durante cada ciclo reproductivo, el folículo de Graaf dominante ovula para liberar el ovocito maduro para la fertilización, mientras que las células restantes de teca y granulosa se transforman para convertirse en cuerpo lúteo (McGee & Hsueh, 2000).

Previo al periodo de pubertad, la corteza de un ovario está ocupada sólo por folículos primordiales. Estos contienen un solo ovocito primario que está detenido en la primera profase meiótica y está rodeado por una sola capa de células foliculares planas (Ross & Pawlina, 2015). Los ovocitos que no se asocian con células somáticas para formar folículos primordiales, degeneran y mueren por apoptosis (muerte celular programada) (Vantman & Vega, 2010).

La comunicación entre los ovocitos y sus células somáticas asociadas se establece con la formación de folículos primordiales. Las células de la granulosa proliferan durante las etapas posteriores de la foliculogénesis y la comunicación ovocito-célula de la granulosa mediada por factores paracrinos secretados y uniones tipo gap, es esencial para la progresión del desarrollo de los folículos (Matzuk *et al.*, 2002).

La transición de un folículo primordial a uno primario se caracteriza por un cambio morfológico en las células de la granulosa que pasan de aplanadas a cuboidales (Rimon-Dahari, 2016). En los folículos secundarios las células epiteliales foliculares proliferan (Welsch & Sobotta, 2008). La continuación de la

proliferación de las células granulosas del folículo secundario depende la FSH (hormona folículoestimulante) liberada por células basófilas de la hipófisis anterior. Bajo la influencia de la FSH el número de capas de las células granulosas aumenta, igual que la cantidad de líquido folicular (Gartner & Hiatt, 2002).

Los ovocitos en los folículos secundarios están en la etapa de crecimiento medio y son incapaces de reanudar la meiosis o someterse a la fertilización y la embriogénesis. Por otro lado, los ovocitos de los folículos antrales grandes son competentes para reanudar la meiosis, avanzar a la metafase II y luego someterse a fertilización y desarrollo embrionario (Eppig *et al.*, 2002).

Posteriormente, hacia el final de esta etapa las células del estroma se alargan y la teca interna es invadida por capilares que las nutren lo mismo que a las células granulosas vasculares (Gartner & Hiatt, 2002). En la etapa antral, los folículos ya han adquirido una cavidad antral pero la mayoría de estos sufren atresia.

El folículo maduro (folículo de Graaf) (Ross & Pawlina, 2015), al principio se caracteriza porque el antro folicular contiene, entre otras cosas, hialuronato, esteroides, factores de crecimiento y gonadotropinas (Welsch & Sobotta, 2008). Más aun contiene las hormonas progesterona, estradiol, inhibina, folistatina y activina, las cuales regulan la liberación de LH (hormona luteinizante) y FSH (Gartner & Hiatt, 2002).

El ovocito primario se ubica en la periferia en un engrosamiento del epitelio, el disco prolífero o cúmulo oóforo. Las células foliculares del entorno inmediato del ovocito forman la llamada *corona radiata* (Welsch & Sobotta, 2008).

Durante la ovulación, un ovocito secundario es liberado por la ruptura del folículo de Graaf. El ovocito liberado queda detenido en la metafase de la segunda división meiótica. En la ovulación, la pared folicular, compuesta por las células de la granulosa y de la teca remanentes, es transformada en el cuerpo lúteo. Por la acción de la LH en el proceso de luteinización, se forman las células luteínicas de la granulosa (producen estrógeno) y las células luteínicas de la teca (producen progesterona) (Ross & Pawlina, 2015). La progesterona sustenta el estado secretor del endometrio e inhibe la contracción del músculo liso del miometrio y las trompas uterinas (Hill *et al.*, 2006).

Historia de vida de los Folículos Ováricos

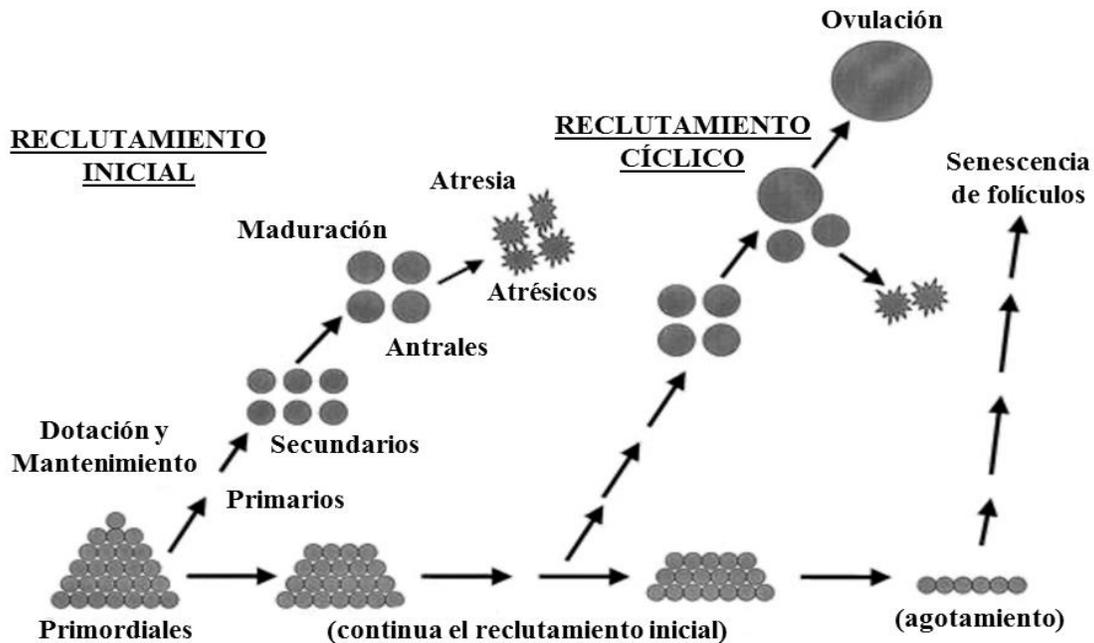


Fig. 2 Desarrollo Folicular. Al inicio hay un gran número de folículos en etapa primordial, los cuales en su mayoría, permanecen en estado de reposo. El reclutamiento inicial ocurre antes y durante la vida reproductiva y consiste en el crecimiento de algunos de estos folículos inactivos, que atraviesan las siguientes etapas del desarrollo folicular: primaria, secundaria y antral. La mayoría de los folículos que alcanzan la etapa antral sufren atresia. Sin embargo, puede ocurrir un reclutamiento cíclico, es decir, algunos folículos antrales pueden ser rescatados bajo la estimulación de la gonadotropina (que ocurre después de la pubertad) y así alcanzar la etapa preovulatoria. Finalmente, ocurre un agotamiento del grupo de folículos que no lograron esta etapa provocando senescencia del folículo ovárico (Modificado de McGee & Hsueh, 2000).

1.2 Función del ovario.

Las dos principales funciones del ovario de los mamíferos son la producción de las células germinales (ovocitos) que permiten la continuación de la especie, y la generación de moléculas bioactivas como esteroideos (principalmente estrógenos y progestinas) y factores de crecimiento de péptidos que son críticos para la función ovárica, la regulación del eje hipotalámico-pituitario-ovárico y del desarrollo de las características sexuales secundarias (Edson *et al.*, 2009).

Las hormonas secretadas por el hipotálamo y la hipófisis anterior son necesarias para el desarrollo del folículo. Además, las hormonas secretadas por el folículo ejercen un efecto de retroalimentación sobre el hipotálamo y la hipófisis anterior y también controlan las modificaciones del útero. Las secreciones de la LH y la FSH por parte de la hipófisis anterior alcanzan un nivel máximo en el momento de la ovulación y persisten en niveles reducidos durante el resto del ciclo de la ovulación. Estas hormonas se secretan en

respuesta a la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) secretada por células neuroendocrinas del hipotálamo (Hill *et al.*, 2006).

El ovario produce otras hormonas, entre ellas relaxina, oxitocina, vasopresina, proteína reguladora folicular (FRP), inhibidor de la maduración ovocítica (OMI), sustancia inductora de la meiosis (MIS) y factor de crecimiento similar a la insulina una parte de las supuestas funciones de estas hormonas se deduce de los nombres y otra parte se conoce muy poco (Welsch & Sobotta, 2008).

1.3 Ovario de rata.

Una corta duración del ciclo convierte a los roedores en un modelo animal ideal para investigar los cambios que ocurren durante el ciclo reproductivo e históricamente las ratas han sido el modelo elegido. Las ratas muestran, la mayoría de las veces, ciclos regulares; son organismos fáciles de manipular, y el ciclo no se interrumpe fácilmente incluso con el estrés rutinario en la instalación animal (Caligioni, 2009).

En ratas, durante la etapa neonatal (día postnatal [DPN] 0-7), el desarrollo del folículo ovárico es independiente de las gonadotropinas hipofisarias (LH o FSH), y los folículos permanecen preantrales. El desarrollo antral de los folículos “atípicos” ocurre en el período infantil temprano (DPN 8-14) cuando el ovario se vuelve sensible a las gonadotropinas hipofisarias. En el período tardío (DPN 15-20), aparece la zona pelúcida, se forma el hilio y los folículos antrales maduran al perder su apariencia “atípica”. La etapa juvenil (DPN 21-32) es la etapa en la que ocurre la atresia de los folículos medulares que corresponde a niveles bajos de FSH. En el periodo peripubertal (DPN 33-37), la atresia disminuye a medida que los niveles de FSH incrementan y la LH comienza su patrón de aumento lo que conduce a la ovulación (Picut *et al.*, 2014).

El periodo peripubertal se define como los 3 a 5 días previos a la primera ovulación cuando la LH presenta diferencias en los aumentos repentinos de la mañana y la tarde y cuando aparece el líquido intrauterino por primera vez. Si bien la DPN 33 es típica para el inicio del periodo peripuberal, puede haber una considerable variación individual en el inicio y la duración de los animales. La pubertad se define como el período en que se produce la apertura vaginal y la primera ovulación (Picut *et al.*, 2014).

Everett & Sawyer (1950), Turek et al. (1984), Barbacka-Surowiak *et al.* (2003), discuten que el ciclo reproductivo femenino está controlado por un circuito de retroalimentación de múltiples órganos finamente sintonizado, que implica el control hipotalámico de la secreción de la hormona pituitaria y la correspondiente liberación de esteroides desde los ovarios. En roedores

hembras, la ovulación ocurre espontáneamente en ciclos regulares de 4 a 5 días y es controlada por el sistema circadiano (Loh *et al.*, 2014).

Legan & Karsch (1975); Christian & Moenter (2010); Williams & Krigsfeld (2012), aseguran que la ovulación implica la coincidencia entre altos niveles de estrógenos que sensibilizan los gonadótropos con una señal de activación del SCN que controla la hora del día de la ovulación (Loh *et al.*, 2014).

En estudios que involucran el sistema reproductivo y la influencia del ciclo estral sobre las funciones no reproductivas, según Long & Evans (1922), se utiliza la citología de frotis vaginal para determinar las fases del ciclo estral. Este método predice el ciclo estral de acuerdo con la proporción de tres tipos de células observadas en el frotis vaginal: células epiteliales, células cornificadas y leucocitos (Caligioni, 2009). La identificación precisa de una fase es dependiente en que el frotis sea recolectado a una hora fija durante el día, ya que la población celular varía en todo un periodo de 24 horas. El ciclo estral de la rata es típicamente de 4 a 5 días de duración y se define por 4 etapas separadas: proestro, estro, metaestro y diestro (Frasier *et al.*, 2013).

- Proestro: Las células epiteliales nucleadas son características de proestro, según Sharp & LaRegina (1998), el cual dura aproximadamente 12 horas. También debe tenerse en cuenta que durante el proestro, particularmente en la rata prepubertal, el útero puede parecer estar lleno de fluido (Suckow *et al.*, 2005). Walmer *et al.* (1992); Parkening *et al.* (1982) argumentan que en esta etapa corresponde al día preovulatorio cuando aumenta estrógeno, y en consecuencia, durante la noche, se produce un aumento y ovulación de LH y FSH (Caligioni, 2009).
- Estro: Por definición, el término “estro” se refiere al período de calor o receptividad sexual (Goldman *et al.*, 2007). Durante la fase de estro, Fox & Laird (1970), Maeda *et al.* (2000), mencionan que inicialmente consiste citológicamente de aproximadamente 75% de células nucleadas y un 25% de células cornificadas, que luego progresan a una mayoría de células cornificadas hinchadas sin núcleo. En las horas posteriores de estro, las células cornificadas parecen degenerarse y puede aparentar que forman un revestimiento epitelial (Suckow *et al.*, 2005). Según Walmer *et al.* (1992) el estrógeno permanece elevado durante toda la mañana y vuelve a caer a niveles basales por la tarde (Caligioni, 2009).
- Metaestro: En esta etapa, según Fox & Laird (1970), Maeda *et al.* (2000), hay una mezcla de tipos de células con predominio de leucocitos y algunas células epiteliales escamosas epiteliales y/o cornificadas nucleadas (Suckow *et al.*, 2005). Walmer *et al.* (1992), dicen que la concentración de plasma estrógeno es baja (Caligioni, 2009).

- Diestro: Es la fase más larga, durando aproximadamente 57 horas, y el frotis vaginal consiste principalmente de leucocitos (Suckow *et al.*, 2005). Durante esta etapa, Walmer *et al.* (1992), indican que los niveles de estrógeno comienzan a aumentar (Caligioni, 2009).

2. Atresia folicular.

De acuerdo con Tilly (2001), sólo una pequeña fracción del conjunto de ovocitos postnatales sobrevive para ser ovulada en algún momento de la vida reproductiva, ya que el destino de la gran mayoría de ellos ovocitos es la degeneración por atresia. Por ejemplo, en humanos, se ha estimado que menos de 300,000 del grupo original de aproximadamente 1,000,000 de ovocitos presentes al nacer sobreviven en la pubertad. Este número, según Richardson *et al.* (1988), continúa disminuyendo durante la edad adulta hasta el punto de agotamiento alrededor de los 50 años, lo que impulsa la menopausia (Johnson *et al.*, 2005).

Durante la foliculogénesis, una gran cantidad de folículos sufren degradación masiva en diferentes etapas de desarrollo en un proceso denominado atresia folicular (Gao *et al.*, 2019). La atresia folicular es uno de los principales eventos que eliminan las células germinales del ovario mediante la participación de vías apoptóticas y no apoptóticas de muerte celular no programada (Fig. 3) (Yadav *et al.*, 2018).

Como tal, la apoptosis de las células de la granulosa ahora se considera como un mecanismo subyacente de atresia folicular. La atresia folicular también es estrictamente inhibida por la FSH la cual estimula el desarrollo de los folículos (Zhou *et al.*, 2019). Según Manabe *et al.* (2004), una vez que el folículo se ha desarrollado, secreta estrógeno, que en niveles altos disminuyen las secreciones de FSH. Por lo tanto, la regulación hormonal del desarrollo folicular y la atresia es un mecanismo que depende del umbral hormonal. Jerrell (2005), Matsuda *et al.* (2008) y Manabe *et al.* (2004) han asociado a la atresia folicular con varios sistemas de receptor de ligando involucrados en la muerte celular, incluyendo TNF- α , ligando Fas, TRAIL, ligando APO-3, ligando PFG-5 y sus respectivos receptores (Zhou *et al.*, 2019).

Diversos estudios han demostrado que durante la apoptosis de las células de la granulosa en ovarios de ratas y los humanos, puede estar involucrada la autofagia. Los ovocitos detenidos en la primera fase meiótica dentro del ovario inmaduro de rata, presentan de manera simultánea la proteína de la señalización apoptótica caspasa-3 y la proteína de señalización autofágica LAMP-1 (Gao *et al.*, 2019). Además, se ha observado que en ovarios de ratas aumenta la señal de la proteína LC3B (cadena ligera 3 de la proteína asociada

a microtúbulos B), y el nivel de caspasa-3 en células lúteas degeneradas. Y en tratamiento con 3-metiladenina (3-MA) hay aumento en la regresión lútea y en la apoptosis de las células lúteas (Gao *et al.*, 2019).

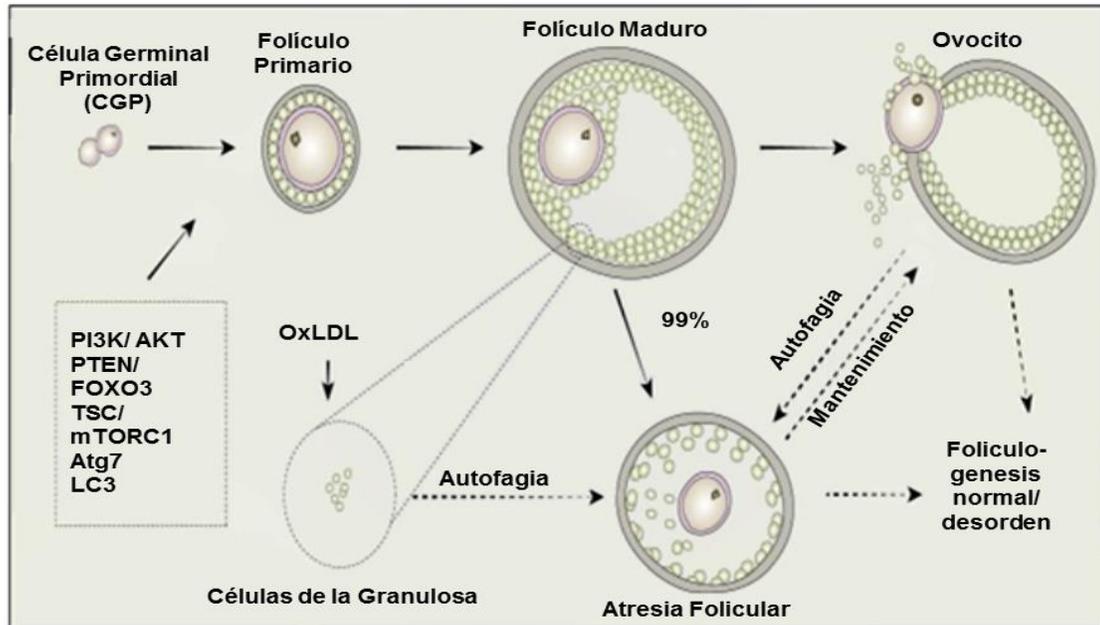


Fig. 3 La autofagia está presente durante el desarrollo folicular y la atresia. El desarrollo de los folículos de los mamíferos implican las etapas: primordial, primaria, secundaria y antral. Los genes y las proteínas relacionadas a la autofagia desempeñan un papel significativo durante el desarrollo folicular. Cuando las células de la granulosa sufren autofagia se induce a la atresia folicular. Por lo que hay un equilibrio entre el ovocito y la atresia folicular manteniéndose mediante la autofagia (Modificado de Zhou *et al.*, 2019).

Según Ross y Pawlina (2015), los cambios foliculares comprenden los siguientes procesos celulares secuenciales:

- Iniciación de la apoptosis dentro de las células de la granulosa, lo cual está indicado por el cese de las mitosis y la expresión de las endonucleasas y otras enzimas hidrolíticas dentro de estas células.
- Invasión de la capa granulosa por neutrófilos y macrófagos.
- Invasión de la capa granulosa por franjas de tejido conjuntivo vascularizado.
- Exfoliación de las células de granulosa dentro del antro folicular.
- Hipertrofia de las células de la teca interna.
- Colapso del folículo conforme la degeneración continua.
- Invasión de la cavidad del folículo por tejido conjuntivo.

En los mamíferos, los folículos que completan la foliculogénesis y permiten la liberación de ovocitos competentes son pocos. La mayoría de los folículos sufren atresia durante la foliculogénesis. La muerte celular programada que afecta a las células de la granulosa, así como a los ovocitos, puede provocar el colapso de todo el folículo (Yadav *et al.*, 2018).

3. Muerte celular.

Durante el desarrollo de los organismos, se van eliminando diversos tipos celulares, debido a que se producen en exceso o porque forman parte de estructuras transitorias durante la formación del organismo adulto. Dicha eliminación ocurre por un proceso que involucra muerte celular, donde la eliminación de los restos celulares se realiza por fagocitosis (Castro & Cobarrubias, 2003).

La muerte celular también actúa como un sistema de control de calidad en el desarrollo, eliminando las células anormales, inapropiadas, no funcionales, o peligrosas en potencia para el organismo (Alberts *et al.*, 2008). Lodish *et al.* (2005), mencionan que los genes involucrados en el control de la muerte celular codifican tres tipos de proteínas: proteínas “asesinas” necesarias para que una célula comience el proceso apoptótico; proteínas “destructivas” o de “destrucción” que digieren componentes citoplásmicos y proteínas “devoradoras” las cuales son necesarias para que una célula sea fagocitada por otra.

La muerte celular puede clasificarse según su aspecto morfológico (que puede ser apoptótico, necrótico, autofágico o asociado con mitosis), criterios enzimáticos (con y sin la participación de nucleasas o de distintas clases de proteasas, como caspasas, calpaínas, catepsinas y transglutaminasas), aspectos funcionales (programados o accidentales, fisiológicos o patológicos) o características inmunológicas (inmunogénicas o no inmunogénicas) (Kroemer *et al.*, 2009).

Los hallazgos de Kroemer *et al.* (2009) mencionan que hay tres formas clásicas de muerte celular: apoptosis, autofagia y necrosis, las que muestran características morfológicas distintas al activar rutas de señalización específicas. En resumen, la apoptosis es una muerte celular programada mediada por las caspasas y que se caracteriza por la condensación cromosómica, la fragmentación nuclear, así como por la formación de ampollas en la membrana (Ellis & Horvitz, 1986; Kerr *et al.*, 1972). A diferencia de la apoptosis, Trump *et al.*, (1965), Kono y Rock (2008) aseguran que la necrosis se considera una muerte celular accidental no regulada causada por inductores de estrés inespecíficos o no fisiológicos y se caracteriza por la hinchazón de los organelos celulares, la ruptura de la membrana plasmática y las posteriores respuestas inflamatorias causadas por la liberación del contenido intracelular. La tercera forma de muerte celular, la autofagia, de acuerdo con He & Klionsky (2009), se acompaña de la formación del autofagosoma, que es una vesícula de dos capas que contiene organelos dañados, proteínas y otros componentes citoplásmicos. Los autofagosomas se fusionan con los lisosomas, degradando

las macromoléculas y los organelos celulares y produciendo metabolitos para las células (Chen *et al.*, 2018).

Los trabajos de He & Klionsky (2009), Alers *et al.* (2012), Luo & Rubinsztein (2009), Declercq *et al.* (2009), Wang *et al.* (2008) acerca de los tipos de muerte celular, se sabe que la autofagia tiene la superioridad de supervivencia más alta, seguida de la apoptosis cuando las células son estimuladas por el estrés del ambiente celular y se induce la apoptosis en lugar de la necrosis si la autofagia se inhibe o es ineficaz (Fig. 4). Por lo tanto, dos o tres tipos de muerte celular pueden ser inducidos simultáneamente o sucesivamente cuando las células están expuestas a ciertos estímulos. Si los tres tipos de muerte celular se colocan en un eje de acuerdo con su superioridad de supervivencia, la autofagia y la necrosis se colocarían en extremos opuestos, mientras que la apoptosis se colocaría en el medio; además la necrosis programada se colocaría entre necrosis y apoptosis (Chen *et al.*, 2018).

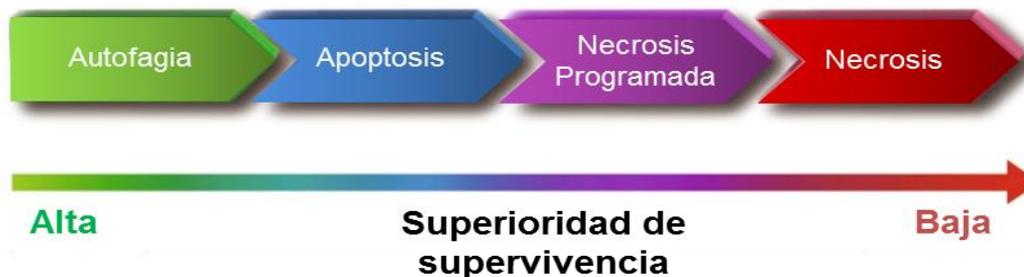


Fig. 4 Superioridad de supervivencia. La autofagia suele describirse como un mecanismo instantáneo de alta de supervivencia durante situaciones de estrés como la disminución de factores de crecimiento, nutrientes y oxígeno, etc. Sin embargo, cuando la autofagia se inhibe o es ineficaz durante el estrés, se inducen los siguientes tipos de muerte celular de forma simultánea o sucesiva: apoptosis, necrosis programada y la necrosis; esta última presenta la superioridad de supervivencia celular más baja (Modificado de Chen *et al.*, 2018).

3.1 Apoptosis.

El término apoptosis es de origen griego que significa “caída” y se refiere a la caída de las hojas de los árboles en otoño (Wong, 2011). La apoptosis fue descrita por primera vez por Kerr, Wyllie y Currie a principios de la década de 1970 y se define por la apariencia morfológica de la célula moribunda, que incluye ampollas, condensación de cromatina, fragmentación nuclear, pérdida de adhesión y redondeo (en células adherentes) y contracción celular (Zimmerman *et al.*, 2001).

La apoptosis es una vía de muerte celular evolutivamente conservada que es responsable del sacrificio programado de las células eucariotas dañadas, disfuncionales o potencialmente peligrosas, durante el desarrollo normal y durante el mantenimiento de la homeostasis. Esta vía está controlada por la

familia de proteínas Bcl-2, que contiene miembros pro-apoptóticos y pro-supervivencia que equilibran la decisión entre la vida y la muerte celular (Singh *et al.*, 2019).

Según con Johnsen & Horvitz (2016), enviar señales de “encuéntrame” y “cómeme” a los macrófagos indica que la apoptosis es un evento suicida. Además, estos rasgos también significan que la apoptosis ha evolucionado completamente sólo en aquellos animales equipados con sistemas de circulación sanguínea y linfática, que permiten que los macrófagos migren de sitios distantes a las células suicidas (Liu *et al.*, 2018).

Pallepati & Averill-Bates (2012) y Fulda *et al.* (2010), mencionan que la apoptosis puede ser provocada por una variedad de señales extrínsecas e intrínsecas. Estas incluyen diferentes estresores como ROS (especies reactivas de oxígeno), RNS (especies reactivas de nitrógeno), agentes que dañan el DNA (p. ej., radiación), choque térmico, privación de suero, infección viral e hipoxia. Orrenius *et al.* (2011) muestran que la exposición a agentes xenobióticos como pesticidas, contaminantes ambientales y medicamentos quimioterapéuticos puede también desencadenar la apoptosis, la cual a menudo está mediada por ROS (Redza-Dutordoir & Averill-Bates, 2016).

Existen dos vías principales que conducen a la apoptosis en el sistema de los mamíferos: una vía extrínseca iniciada por receptores de muerte y una vía intrínseca que ocurre a través de las mitocondrias. La vía extrínseca depende de la unión de mediadores exógenos apropiados a los receptores de muerte en la superficie celular (Xu & Shi, 2007). La vía intrínseca mitocondrial se activa mediante una variedad de estímulos exógenos y endógenos que incluyen daño en el DNA, isquemia y estrés oxidativo. Además, desempeña una función importante en el desarrollo y en la eliminación de las células dañadas (Loreto *et al.*, 2014).

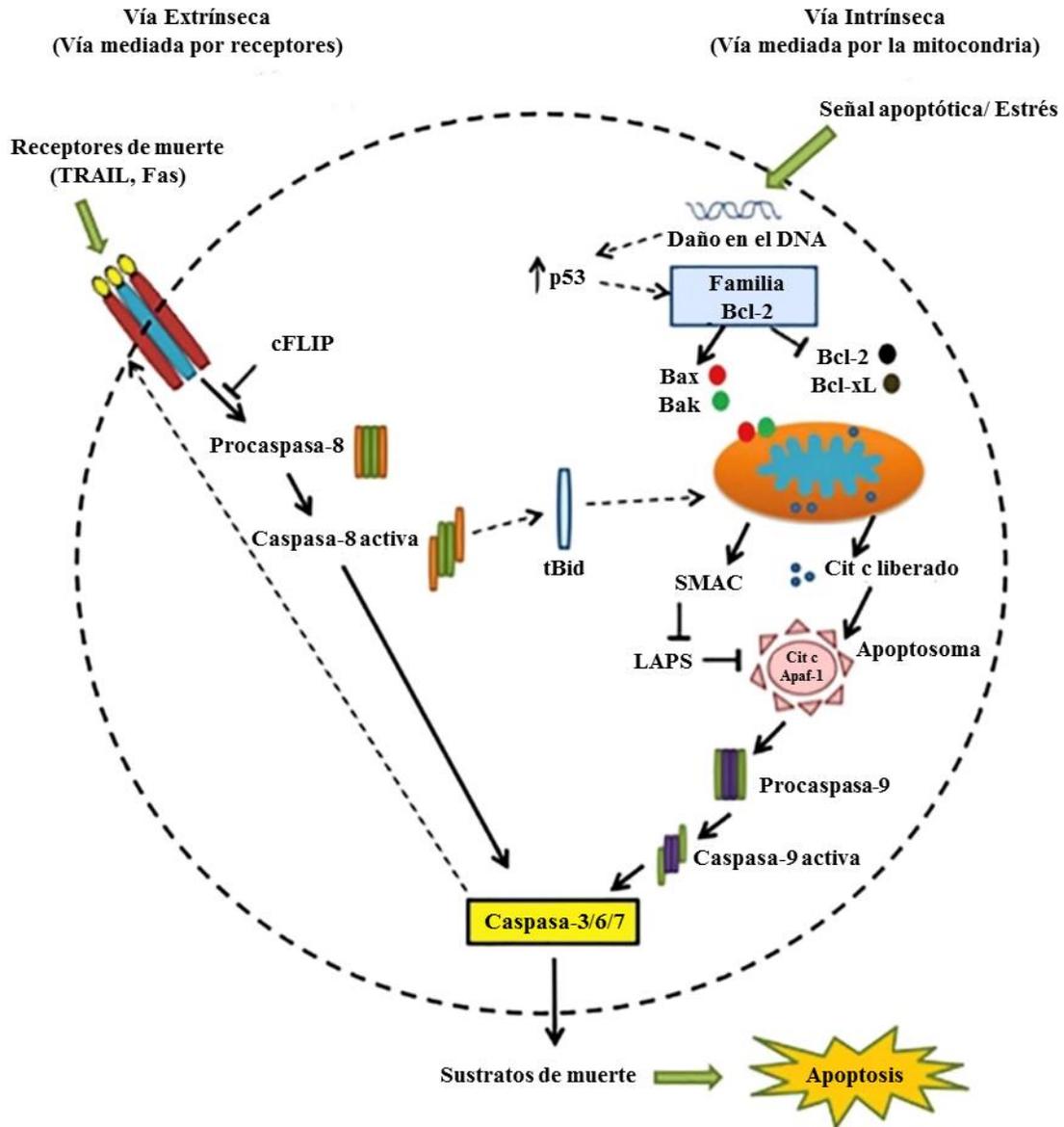


Fig. 5 Vías apoptóticas. La apoptosis consiste en dos vías principales de ejecución. La vía extrínseca se desencadena por estímulos externos o por la molécula de ligando, y se caracteriza por la participación de los receptores de muerte (DR). Por otra parte, la vía intrínseca está mediada por la inserción Bax/Bak en la membrana mitocondrial externa (Jan & Chaudhry, 2019). Al liberarse el citocromo c, se combina con Apaf-1 y la pro-caspasa-9 para construir el apoptosoma. Posteriormente, se activa la cascada de señalización de la caspasa-3. Por último, ambas vías convergen en la fase de ejecución. Esta vía comienza cuando las caspasas ejecutoras (la caspasa-3, -6 y -7) se activan y provocan la ruptura definitiva de los componentes celulares (Modificado de Jan & Chaudhry, 2019).

3.1.1. Vía extrínseca de la apoptosis.

La unión de proteínas de señalización extracelulares a receptores de muerte de la superficie celular activa la vía extrínseca de la apoptosis. Los receptores de muerte son proteínas transmembrana que tienen un dominio de unión al

ligando, un único dominio transmembrana y un dominio de muerte intracelular, necesario para que los receptores activen el programa apoptótico (Alberts *et al.*, 2008).

La vía de apoptosis mediada por el receptor de muerte, de acuerdo con Lavrik *et al.* (2005), Duprez *et al.* (2009), se activa al unirse el ligando Fas, TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa) o TRAIL a los receptores de muerte correspondientes (Chen *et al.*, 2018). Cuando Fas se activa por la unión del ligando Fas, los dominios de muerte de las colas citosólicas de los receptores de muerte de Fas reclutan proteínas adaptadoras intracelulares, las cuales a su vez, reclutan pro-caspasas iniciadoras (pro-caspasa-8, pro-caspasa-10 o ambas), formando el complejo de señalización inductor de muerte (DISC, *Death-inducing signaling complex*). Las caspasas iniciadoras, una vez activadas en el DISC, activan las siguientes procaspasas ejecutoras de la cascada induciendo la apoptosis (Alberts *et al.*, 2008).

En el trabajo de Thornberry & Laxebnik (1998), los autores consideran que las caspasas son fundamentales para el mecanismo de apoptosis, ya que son los iniciadoras (caspasa-2, -8, -9 y -10, los principales responsables del comienzo de la vía apoptótica) y los ejecutoras (caspasa-3, -6 y -7, responsable de la división definitiva de los componentes celulares) de la muerte celular (Pistritto *et al.*, 2016). Su función está muy relacionada con su estructura, la cual muestra diferentes preferencias de sustrato. Algunas caspasas tienen predominios largos que involucran motivos particulares como el dominio efector de la muerte (DED) y los dominios de reclutamiento de caspasas (CARD), que permiten interactuar con otras proteínas y conectarse con vías de señalización (Jan & Chaudhry, 2019).

Las caspasas se expresan ampliamente en forma de pro-enzima inactiva o pro-caspasas en la mayoría de las células, una vez activadas, pueden activar otras pro-caspasas, lo que permite el inicio de una cascada de proteasas. Algunas pro-caspasas también pueden agregarse y auto-activarse. Esta cascada proteolítica, en la que una caspasa puede activar otras caspasas, amplifica la vía de señalización apoptótica y conduce a la muerte celular rápida (Elmore, 2007).

3.1.2. Vía intrínseca de la apoptosis.

La vía mitocondrial de la apoptosis, se desencadena cuando se pierde la integridad de la membrana externa mitocondrial, lo que permite la liberación de factores pro-apoptóticos (p. ej., citocromo c) desde la mitocondria al citosol. Este proceso está controlado por la familia de proteínas Bcl-2. Una vez en el citosol, el citocromo induce el ensamblaje de un complejo de activación de las

proteasas de caspasa y la escisión de las proteínas intracelulares, lo que finalmente conduce al desmantelamiento de la célula (Green & Llambi, 2015).

Las proteínas que generalmente están involucradas en la vía intrínseca, según Elmore (2007), incluyen Smac/DIABLO (segundo activador mitocondrial de caspasas/proteína de unión directa a IAP con bajo IP), Caspasa-9, Bcl-2 (proteína de linfoma de células B), Bcl-w (proteína similar a Bcl-2), Noxa (proteína 1 inducida por forbol-12-miristato-13-acetato), Aven (regulador de muerte celular Aven) y Myc (oncogen Myc) (Jan & Chaudhry, 2019).

Las proteínas pro-apoptóticas BH3-*only* (Bad, Bid, Noxa, PUMA) compiten por la interacción con Bcl2 o Bcl-xL, lo que resulta en la liberación de Bax o Bak. Estos miembros de la familia Bcl2 pro-apoptóticos “liberados” se oligomerizan en la membrana mitocondrial externa y provocan la liberación de citocromo c. Alternativamente, los miembros pro-apoptóticos solo BH3-*only* interactúan y activan Bax y Bak con la posterior permeabilización de la membrana mitocondrial y la liberación de citocromo c (Jain *et al.*, 2013).

La liberación citoplasmática del citocromo c, de acuerdo a Kroemer *et al.* (2007), activa la caspasa-3 mediante la formación de un complejo conocido como apoptosoma, que está compuesto por el citocromo c, Apaf-1 y la caspasa 9 (Wong, 2011). Zou *et al.* (1997, 1999), mencionan que Apaf-1 es una proteína contenida en el citosol y el citocromo c se une y lo induce a oligomerizarse. Esto recluta a la caspasa iniciadora, pro-caspasa-9. Estas proteínas interactúan mediante interacciones CARD-CARD. El apoptosoma ahora recluta procaspasa-3, que es escindida y activada por la caspasa-9 activa y liberada para mediar la apoptosis (Zimmerman & Green, 2001).

Finalmente, según Kroemer *et al.* (2007) y LaCasse *et al.* (2008), Smac/DIABLO u Omi/HtrA2 promueven la activación de la caspasa al unirse al inhibidor de las proteínas de apoptosis (IAP), lo que posteriormente conduce a la interrupción de la interacción de IAP con la caspasa-3 o -9 (Wong, 2011).

3.2 Necrosis.

En 1988 el grupo de Walker, menciona que el término necrosis deriva del griego “*necros*”, que significa “muerto” y se refiere a la muerte accidental de células expuestas a daños por ambientes extremos o genéticamente codificados (Syntichaki & Tavernarakis, 2003). Morfológicamente “muerte celular necrótica” o “necrosis” se refiere a una ganancia en el volumen celular, hinchazón de los organelos, ruptura de la membrana y la consiguiente pérdida de contenido intracelular (Chaabane *et al.*, 2012). La necrosis es un proceso no controlado y pasivo, mientras que la apoptosis es controlada y depende de la energía. La lesión necrótica está mediada por dos mecanismos principales; interferencia

con el suministro de energía de la célula y daño directo a la membranas celulares (Elmore, 2007).

Walker *et al.* (1988) y Nicotera *et al.* (1999), argumentan que en humanos, la necrosis ocurre generalmente en respuesta a cambios severos en condiciones fisiológicas, incluyendo hipoxia, isquemia, hipoglucemia, exposición a toxinas, exposición a metabolitos de oxígeno, cambios extremos de temperatura y privación de nutrientes. Según Price *et al.* (1998) varios síndromes y enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica y la epilepsia, también implican necrosis (Syntichaki & Tavernarakis, 2002).

La muerte celular necrótica programada, según Holler *et al.* (2000), es el resultado de la interacción entre varias cascadas de señalización. Los términos “necrosis programada” o “necroptosis” se refieren colectivamente a la necrosis y enfatizan un grado de regulación y mecanismo molecular de este proceso de muerte. Los principales actores en la propagación de la necrosis son las proteínas de interacción con el receptor de serina/treonina quinasa 3 (RIPK) (Chaabane *et al.*, 2012).

De acuerdo con Degterev *et al.* (2005) y Sun *et al.* (2012), la necrosis regulada depende de la formación del necrosoma, denominado “necroptosis”, que requiere de la proteína serina/treonina cinasa (RIPK)-1/3 que interactúa con el receptor y un dominio de tipo cinasa de linaje mixto (MLKL). Fuchs & Steller (2015) y Holler *et al.* (2000) indican que la necroptosis puede desencadenarse mediante la ligadura de varios receptores de muerte, como el receptor TNF, el receptor de ligando inductor de apoptosis (TRAIL) relacionado con TNF, FAS (CD95) y receptores de tipo Toll. En la señalización de la necroptosis, Berghe *et al.* (2014) y Li *et al.* (2012), afirman que RIP1 forma el complejo de señalización inductor de muerte citosólica (DISC), que contiene el dominio asociado a Fas (FADD), RIP3 y caspasa-8. Cuando la caspasa-8 se activa en DISC, según Li *et al.* (2012) y Wang *et al.* (2008), puede desencadenar la apoptosis; cuando se inhibe la actividad de la caspasa-8, RIP1 interactúa con RIP3, se fosforila y ensambla el necrosoma. Wang *et al.* (2017) aseguran que RIP3 fosforilado induce la fosforilación de MLKL y la formación de oligómeros. MLKL oligomerizado se transloca a la membrana plasmática y forma poros en la membrana (Fig. 6). Al igual que con la necrosis, Kaczmarek *et al.* (2013) y Wang *et al.* (2017), afirman que las células necroptóticas liberan contenidos intracelulares que afectan a las células circundantes y el medio ambiente (Ando *et al.*, 2020).

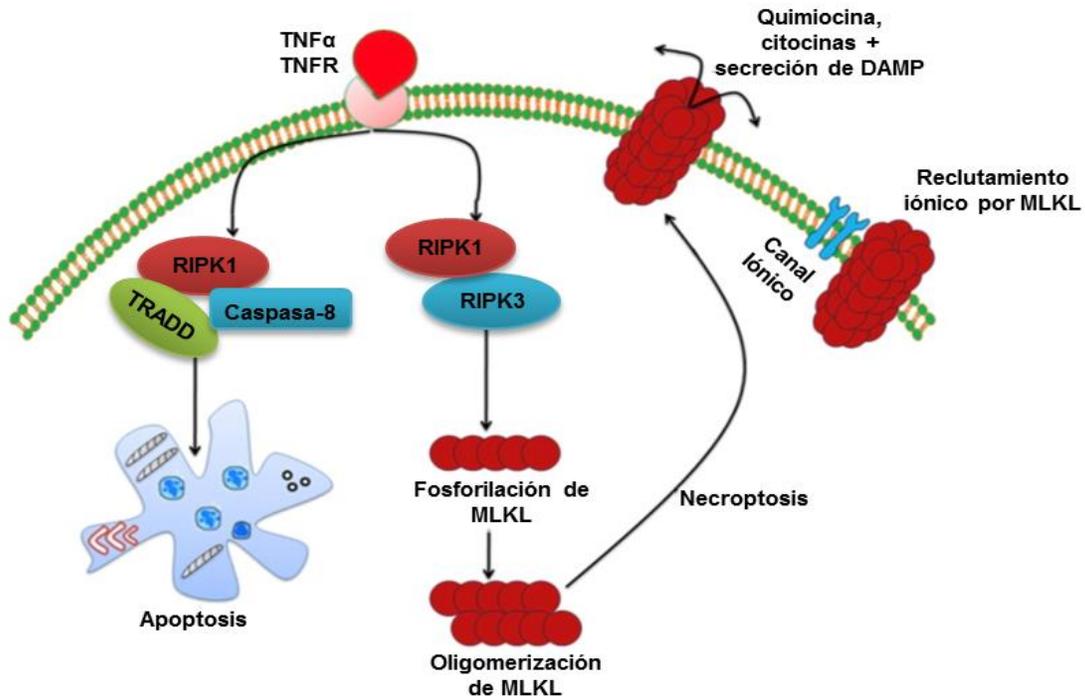


Fig. 6 La necroptosis se activa al inhibirse la apoptosis. RIPK1 se caracteriza por ser un receptor de muerte. Su actividad cinasa regula el ensamblaje de dos complejos que controlan la apoptosis y la necroptosis. Al activarse la caspasa-8 se induce la apoptosis pero al inhibirse conduce a la necroptosis. En el proceso de la necroptosis, la interacción entre RIPK1 y RIPK3 da como resultado la formación de un complejo heterodimérico capaz de promover la oligomerización de MLKL mediante su fosforilación. Una vez oligomerizado MLK, se trasloca en la membrana plasmática participando en el reclutamiento de canales de iones y en la formación poros. (Tomado de Dhuriya & Sharma, 2018).

Otro mediador de la necrosis regulada mencionada por Schreiber *et al.* (2006) es la poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1), que se activa en respuesta al daño moderado del DNA y facilita su reparación. PARP-1 cataliza la conversión de NAD⁺ en nicotinamida y polímeros de poli (ADP-RIBOSA) (PAR). La poli (ADP-ribosila-) ación de proteínas nucleares permite la reparación del DNA y el resultado es la supervivencia celular. Sin embargo, el daño extenso en el DNA conduce a la sobre activación de PARP-1. La activación excesiva de PARP-1 provoca el agotamiento de NAD⁺. El posterior agotamiento de ATP produce un fallo bioenergético irreversible y necrosis (Jog & Caricchio, 2014).

Varios mediadores han sido implicados en la fase de ejecución de la necrosis. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas, según Tsujimoto & Shimizu (2007), durante la inflamación causan daño a las macromoléculas celulares, incluido el DNA. El estrés oxidativo, por lo tanto, conducirá a la necrosis a través de una vía dependiente de PARP-1. Las ROS también modifican proteínas, inducida la oxidación de los fosfolípidos de membrana. La peroxidación lipídica conduce a la fuga de Ca²⁺ y proteasas al desestabilizar las membranas reticulares mitocondriales, lisosómicas y endoplasmáticas. El aumento de Ca²⁺ intercelular conduce la apertura del poro de transición de

permeabilidad mitocondrial (MPT) (MPTP), lo que resulta en la pérdida de la membrana mitocondrial, hinchazón y ruptura de la membrana externa mitocondrial (Jog & Caricchio, 2014).

3.3 Autofagia.

La autofagia (del griego, “*auto*” uno mismo, “*phagy*” para comer) se refiere a cualquier vía de degradación celular que implique la entrega de carga citoplasmática al lisosoma (Levine & Kroemer, 2008). La autofagia es un proceso degenerativo en respuesta a diversos tipos de estrés, que incluyen la deficiencia de nutrientes, el daño a los organelos, la hipoxia, las especies reactivas de oxígeno (ROS), estrés en el retículo endoplásmico y el tratamiento farmacológico (Chen *et al.*, 2018).

La autofagia, de acuerdo a Levine & Klionsky (2004) y Rogov *et al.* (2014), es un proceso de degradación intracelular conservado evolutivamente, en el que las macromoléculas citoplásmicas, proteínas agregadas, organelos dañados o patógenos son llevados a los lisosomas y se digieren mediante hidrolasas lisosómicas para generar nucleótidos, aminoácidos, ácidos grasos, azúcares y ATP, y finalmente se reciclan en el citosol (Li *et al.*, 2020). Es típicamente una respuesta protectora, pro-supervivencia al principio; sin embargo, si se hiperactiva, finalmente matará la célula (Jain *et al.*, 2013).

Jing & Lim (2012) indican que la autofagia no sólo es responsable de la eliminación de proteínas y organelos anormales, sino que también participa en la eliminación de agentes infecciosos, incluidas bacterias y virus de las células huésped. Además, mencionan que datos recientes de estudios de modelos celulares muestran que la regulación automática de la autofagia podría ser valiosa para eliminar *Mycobacterium tuberculosis* (Gutiérrez *et al.*, 2004), *Streptococcus* (Nakagawa *et al.*, 2004), micobacterias (Sight *et al.*, 2006; Shin *et al.*, 2010), y el virus del herpes simple (Tallóczy *et al.*, 2006).

De acuerdo con Abada & Elazar (2014); Lamb *et al.* (2013); Mizushima & Komatsu (2011), la inducción de la autofagia da como resultado el reclutamiento de las proteínas Atg en una ubicación subcelular específica denominada sitio de ensamblaje del fagóforo (PAS) y nucleación de una membrana de aislamiento que forma una estructura en forma de copa denominada fagóforo. El alargamiento gradual de la membrana de aislamiento curva da como resultado la expansión del fagóforo en una esfera alrededor de una porción del citosol. La membrana de aislamiento finalmente se sella en una vesícula de doble membrana, denominada autofagosoma, atrapando así el material citosólico envuelto como carga autofágica. Después de la eliminación de la mayoría de las Atg y el suministro al lisosoma lo largo de los microtúbulos, la membrana

externa del autofagosoma se fusiona con la membrana lisosómica para formar el autolisosoma. Esta fusión da como resultado la formación de un cuerpo denominado autofagolisosoma (Dikic & Elazar, 2018).

4. Mecanismos moleculares de la autofagia.

4.1. Células somáticas.

Los trabajos de Klionsky (2007) Maiuri *et al.* (2007) Mizushima & Klionsky (2007) y Rubinsztein *et al.* (2007), afirman que la autofagia ocurre a niveles basales bajos en prácticamente todas las células para realizar funciones homeostáticas como durante el recambio de proteínas y organelos. Se regula rápidamente cuando las células necesitan nutrientes y energía intracelular durante la inanición, por ejemplo, durante la inanición, la abstinencia del factor de crecimiento o de las altas demandas bioenergéticas. La autofagia también se regula cuando las células se preparan para someterse a una remodelación estructural, como durante las transiciones del desarrollo o para deshacerse de los componentes citoplásmicos dañinos o, por ejemplo, durante el estrés oxidativo, la infección o la acumulación de agregados de proteínas. El estado nutricional, los factores hormonales y otras señales como la temperatura, las concentraciones de oxígeno y la densidad celular son importantes en el control de la autofagia (Levine & Kroemer, 2008).

Existen tres tipos definidos de autofagia: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas (Fig. 7), las cuales promueven la degradación proteolítica de los componentes citosólicos en el lisosoma (Glick *et al.*, 2010).

De acuerdo con Xie *et al.* (2008), la macroautofagia (denominada autofagia), es un proceso genéticamente regulado y dinámico asociado con la formación de autofagosoma, una vesícula citoplasmática de doble membrana que engloba los componentes celulares. La formación del autofagosoma comienza en el fagóforo (también conocido como membrana de aislamiento o membrana secuestrante) y requiere la conjugación de la proteína 1 asociada a los microtúbulos de la cadena ligera 3 (LC3), que regula la expansión del fagóforo y la terminación de la vesícula. El autofagosoma completo se fusiona con el lisosoma y se convierte en autolisosoma. Los componentes secuestrados son degradados por las hidrolasas lisosomales y liberados en el citosol por las permeasas del flujo de salida lisosomal (Jing & Lim, 2012).

El término de microautofagia, según Galluzi *et al.* (2017), se ha reservado para la degradación de proteínas y organelos intracelulares directamente engullidos por los lisosomas o la vacuola (en levaduras) (Tekirdagy & Cuervo, 2018). La

microautofagia endosómica se basa en los complejos de clasificación endosomales necesarios para el transporte (ESCRT) I y III, necesarios para la formación de las vesículas en las cuales la carga citosólica se internaliza y depende de la entrega de carga de proteínas por Hsc70 a través de interacciones electrostáticas de esta chaperona con la membrana limitante endosómica (Sahu *et al.*, 2011).

Saftig *et al.*, (2008) mencionan que en la autofagia mediada por chaperonas (CMA), las proteínas específicas son translocadas a través de la membrana lisosomal en un complejo con proteínas chaperonas (Glick *et al.*, 2010). La proteína chaperona Hsc70 (cognotada 70 de choque térmico) y las cochaperonas reconocen específicamente proteínas citosólicas que contienen una combinación específica de cinco aminoácidos denominada “KFERQ-motif” (Orenstein & Cuervo, 2010; Kirchner *et al.*, 2019). La proteína transmembrana LAMP-2A que es una isoforma de LAMP-2, actúa como un receptor en el lisosoma, y las proteínas desplegadas se entregan a la luz lisosomal a través de un complejo de translocación multimérico (Mizushima & Komatsu, 2011).

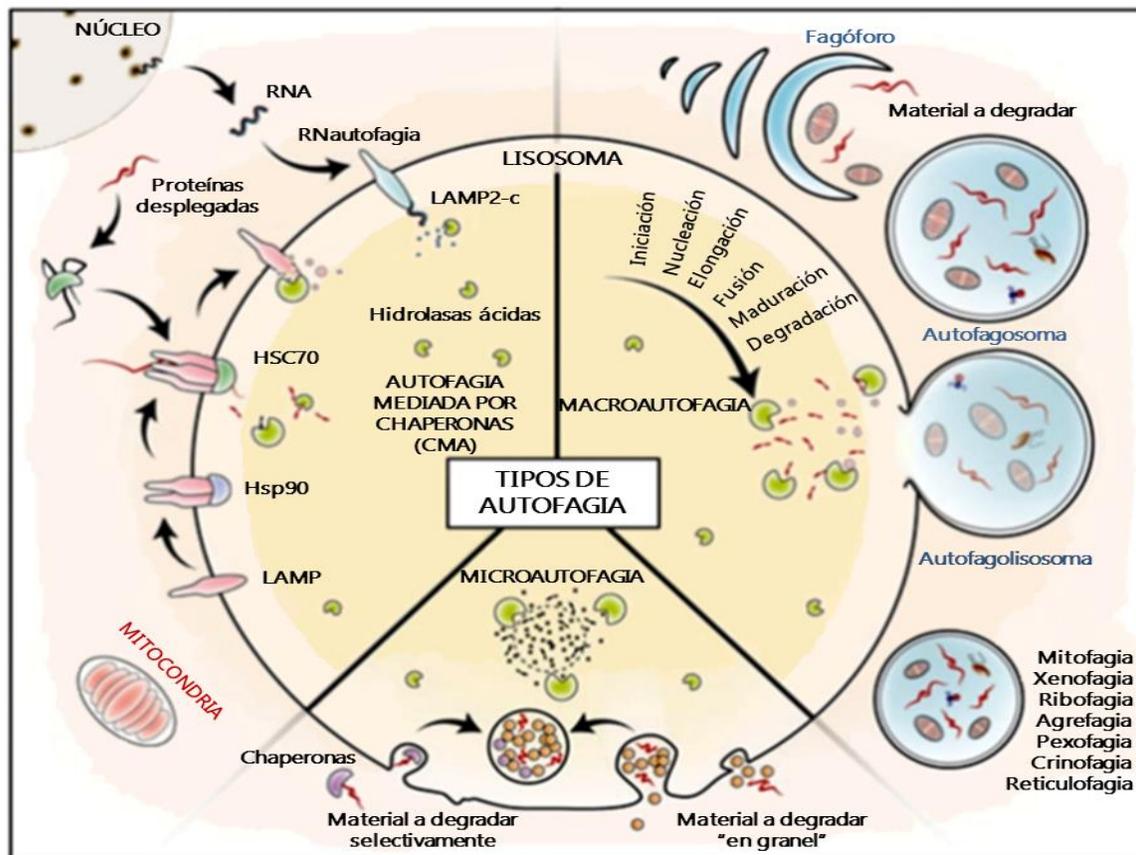


Fig. 7 En los mamíferos existen tres tipos de autofagia. La autofagia mediada por chaperonas (CMA) involucra la degradación de proteínas específicas dentro de lisosomas en un complejo con proteínas chaperonas. La macroautofagia involucra la formación de un autofagosoma que se fusiona con un lisosoma para formar un autolisosoma. Y la microautofagia en la cual el lisosoma se encarga de degradar el material citosólico. (Modificado de González-Polo *et al.*, 2016).

4.2. Patologías asociadas a la autofagia.

La autofagia controla los patógenos intracelulares al secuestrarlos dentro del autofagosoma para su degradación mediante los lisosomas. Esta eliminación selectiva de patógenos invasores se conoce como xenofagia. Esta vía específica puede estar vinculada a varios aspectos de la inmunidad innata y adaptativa, incluida la presentación de antígenos (Fig. 8), la producción de citosinas e interferones y el desarrollo de linfocitos (Saha *et al.*, 2018). Por otro lado, Zhou *et al.* (2011) y Nakahira *et al.* (2011), consideran que la capacidad que tiene la autofagia de eliminar las mitocondrias dañadas o irreversiblemente despolarizadas, la hace necesaria para evitar la acumulación de mitocondrias despolarizadas que liberan agonistas al inflamasoma (proteínas citosólicas que se activan en respuesta a la presencia de patógenos invasores) como ROS y DNA mitocondrial oxidado. Por lo tanto, la autofagia es un mecanismo antiinflamatorio de protección contra el daño endomembrana provocado por diversos agentes de origen endógeno o infecciosos y previene la inflamación innecesaria o excesiva, además del daño tisular (Deretic & Levine, 2018)

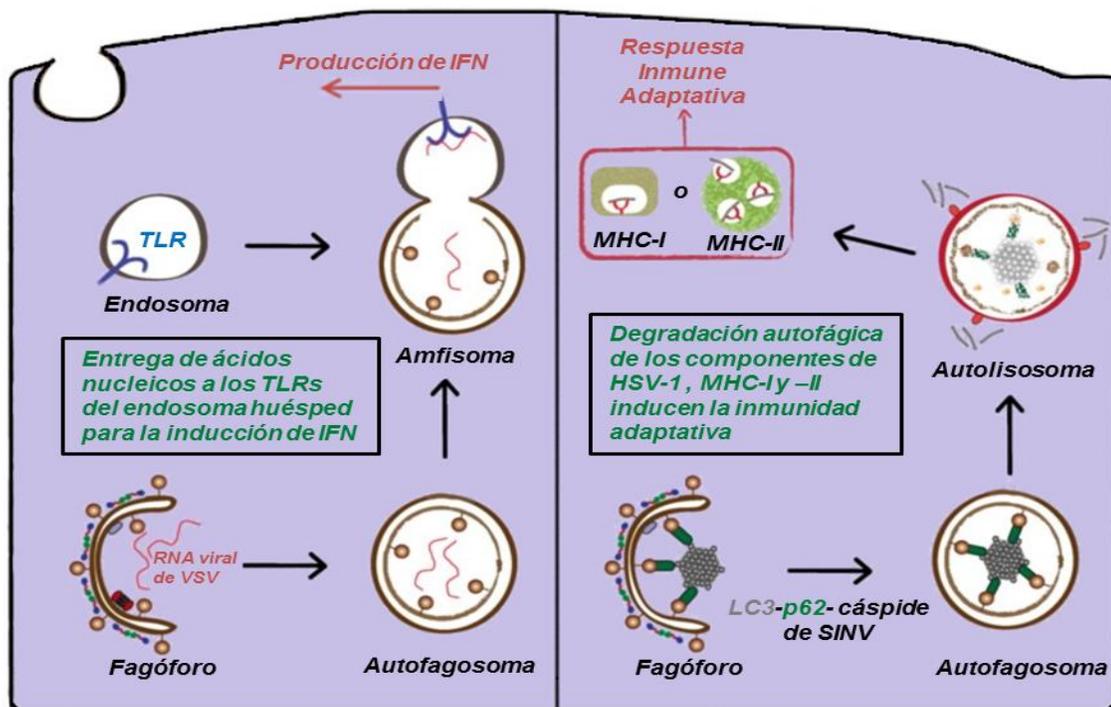


Fig. 8 La autofagia restringe la replicación viral mediante diferentes mecanismos. Puede transferir ácidos nucleicos virales a los endosomas para estimular las respuestas innatas mediante los TLRs. Digiere de forma selectiva los componentes virales dentro de lisosomas. Y contribuye en la respuesta inmune adaptativa al permitir la presentación de antígenos virales al entregarlos a los complejos MHC-I y MHC-II (Modificado de Chiramel *et al.*, 2013).

De acuerdo con Barnard et al. (2016) y White (2012), durante la tumorigénesis, la autofagia actúa como un mecanismo supresor tumoral mediante su función de control de calidad de proteínas y organelos, al proveer estabilidad en el genoma, prevenir daño tisular crónico, lesión celular e inflamación e inhibir la acumulación de agregados de proteínas p62, además de prevenir el inicio del tumor, la proliferación, la invasión y metástasis (Li *et al.*, 2020). Además, se ha demostrado que la autofagia apunta y degrada directamente la proteína transformadora activa RHOA, así como el factor de intercambio de nucleótidos RHOA-guanina (GEF) H1, que son reguladores cruciales de la dinámica de la actina y la migración celular (Dikic & Elazar, 2018).

La diabetes tipo dos y la obesidad se encuentran entre los problemas de salud más emergentes a nivel mundial. Los factores responsables del progreso de la diabetes son la disminución de la producción de insulina, el aumento de la adiposidad y el aumento de la resistencia a la insulina en los músculos esqueléticos. Estos dos últimos defectos son atribuidos principalmente a mitocondrias defectuosas caracterizadas por una alteración en la beta-oxidación, acumulación de lípidos, estrés oxidativo y daño mitocondrial. De acuerdo con Yang *et al.* (2010) y Kaniuk *et al.* (2007), se ha demostrado que la mitofagia, en esta etapa, elimina el estrés oxidativo y a las mitocondrias dañadas, desempeñando una función protectora contra el desarrollo de la resistencia a la insulina y al aumento de la adiposidad (Saha *et al.*, 2018).

Se conoce como sarcopenia a la pérdida de masa y fuerza del músculo esquelético en adultos mayores. Debido a que la autofagia promueve la atrofia de miofibras en jóvenes, se creía que la inhibición de la autofagia prevendría la sarcopenia. Sin embargo, estudios recientes han revelado que la autofagia en realidad mantiene la masa muscular y que su función disminuye durante el envejecimiento muscular. Consistentemente, aumentar la autofagia basal protege de la disfunción muscular relacionada con la edad al promover la degradación selectiva de proteínas mal plegadas y organelos disfuncionales. Por el contrario, la inhibición de la autofagia conduce a la pérdida de la fuerza muscular e induce a una respuesta de estrés desadaptativo responsable de la atrofia de miofibras en adultos mayores (Jiao & Demontis, 2017).

La autofagia también se ha convertido en un importante regulador de las funciones cardíacas. Preserva la estructura y la función cardíaca en condiciones basales y se activa durante el estrés, lo que limita el daño en la mayoría de las condiciones. Reduce las lesiones y preserva la función cardíaca durante la isquemia. También reduce la remodelación isquémica crónica y media la adaptación cardíaca a la sobrecarga de presión al restringir la acumulación de proteínas mal plegadas, la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo (Sciarretta *et al.*, 2018).

5. Flujo autofágico.

El término de flujo autofágico es utilizado para representar el proceso dinámico de la autofagia. Se refiere a todo el proceso de autofagia, incluida la formación de autofagosomas, la maduración, la fusión con los lisosomas, la descomposición posterior y la liberación de macromoléculas de regreso al citosol (Zhang *et al.*, 2013).

Las llamadas proteínas Atg centrales esenciales para la formación de autofagosomas y el suministro lisosómico de carga autofágica se agrupan por sus interacciones funcionales y físicas en cinco complejos de acuerdo con Klionsky *et al.* (2011): (i) el complejo ULK1 (cinasa 1 similar a Unc-51): la proteína cinasa serina/treonina ULK1, proteína 1 en espiral inducible por RB1 (FIP200; también conocida como RB1CC1), Atg13 y Atg101; (ii) Atg9: la única Atg integral de membrana nuclear; (iii) el complejo de clase III PI3K (PI3KC3): la subunidad catalítica que clasifica la proteína vacuolar 34 (VPS34) que convierte PI en PI-3-fosfato (PI3P), Beclina-1 y factor de transporte vesicular general p115, unido por Atg14 en el complejo PI3KC3 I (PI3KC3-C1) o proteína génica asociada a la resistencia a la radiación UV (UVRAG) en el complejo II (PI3KC3-C2); (iv) las proteínas WIPI (WP dominio de repetición que interactúan con fosfoinosítido) y su compañero de interacción funcional, opcionalmente físico Atg2; y (v) dos proteínas similares a ubiquitina (Ub) y objetivos de conjugación covalente (Zhang *et al.*, 2013). El proceso de autofagia comienza a partir de la formación de una membrana aislante y de un fagóforo (Saha *et al.*, 2018).

La proteína conocida como mTOR es una serina/treonina cinasa que forma dos complejos grandes, física y funcionalmente diferentes: mTORC1 y mTORC2 (Hung *et al.*, 2012; Yip *et al.*, 2010). mTORC2 es insensible a la rapamicina y se compone de subunidades como mLST8, Rictor, MSIN 1 y PROTOR. Y el complejo mTORC1 que constituye subunidades como ULK1, Atg13, Atg101, FIP200 y Raptor, es más sensible a las señales de nutrientes y a la rapamicina (Ravanan *et al.*, 2017; Gao, 2019). mTORC1 media principalmente en la regulación del crecimiento celular, la apoptosis y la autofagia, mientras que mTORC2 está involucrado principalmente en la supervivencia celular (Gao, 2019).

En la mayoría de los casos, según Jung *et al.* (2010) y Zhang (2015), la autofagia se realiza de manera dependiente de mTORC1 a través del cual todas las señales de estrés se integran en la vía de la autofagia. Bajo condiciones de inanición mTORC1 se inhibe para activar la autofagia (Ravanan *et al.*, 2017). La fosforilación de Rheb y Raptor en el complejo mTORC1, permite la activación de ULK1, quien a su vez fosforila Atg13 y FIP20. Toda esta señalización, permite el inicio del proceso autofágico (Ravanan *et al.*, 2017;

Dikic & Elazar, 2018). El paso de la nucleación se lleva a cabo principalmente por Vps34 y el complejo Beclina-1. Vps34, según Glick *et al.* (2010), es la única enzima asignada como fosfoinositol quinasa de clase III en mamíferos, cuyo sustrato solitario es PI, genera un componente vital llamado PI3P para la nucleación y el crecimiento del fagóforo. Vps34 genera este PI3P al fosforilar PI (fosfatidilinositol) en posición D3 (Ravanan *et al.*, 2017).

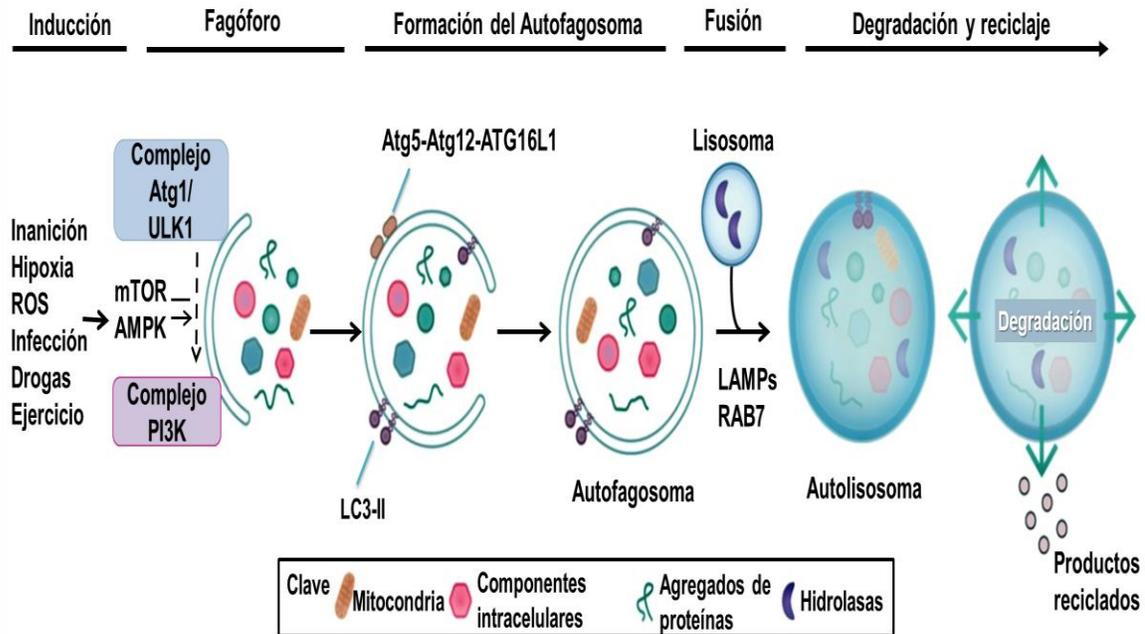


Fig. 9 Mecanismo molecular de la autofagia. La autofagia es un proceso que puede inducirse mediante las vías de señalización de mTOR y AMPK. Primero, se lleva a cabo el ensamblaje y la activación de dos complejos macromoleculares: Atg1/ULK1 (compuesto por ULK1, FIP200, Atg13 y Atg101) y el complejo PI3K clase III (compuesto por BECN1, ATG14, Ambra 1, Vps34, Vps15 y UVRAG) (Boya *et al.*, 2018). Posteriormente, para la formación del autofagosoma se llevan a cabo las siguientes reacciones: en la primera se conjuga Atg7 y Atg10, Atg5 y Atg12 y se unen a ATG16L. Y en la segunda, LC3 en su forma citosólica se conjuga con la fosfatidiletanolamina (PE) para generar LC3-II, lo que permite su anclaje en las membranas autofagosomales. Por último, el autofagosoma ya formado se fusiona con un lisosoma, dando origen a un autolisosoma listo para degradar material citosólico (Tomado de Boya *et al.*, 2018).

El homólogo de mamíferos de Atg6 se llama Beclina-1 la cual tiene un papel central en la regulación de la autofagia. La Beclina-1, según Kihara *et al.* (2001) y Tassa *et al.* (2003), forma un complejo con la clase III fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3 quinasa) Vps34. Panaretou *et al.* (1997) dicen que Vps34 se asocia con la serina/treonina cinasa Vps15. Además, UVRAG (gen asociado con la resistencia a la radiación UV) se asocia con el complejo Beclina 1-Vps34 y mejora la autofagia. Además, Fimia *et al.* (2007), mencionan que una proteína llamada Ambra1 se une a Beclina-1 y mejora la actividad de la quinasa Vps34 y la formación de autofagosomas (Eskelinen & Saftig, 2009).

Después de la nucleación, otras proteínas Atg son reclutadas a la membrana de los pre-autofagosomas para promover el alargamiento y la expansión, y finalmente, la finalización de la formación de autofagosomas (He & Klionsky, 2009; Simonsen & Tooze, 2009). Durante los pasos de alargamiento y expansión, Atg7 y Atg10 facilitan la formación del complejo Atg5-Atg12 unido covalentemente (Mizushima *et al.*, 1998; Mizushima *et al.*, 2003), que también interactúa con Atg16L1 (Wong *et al.*, 2011).

En 2015, Yang y colaboradores mencionan que el LC3 se sintetiza en primer lugar como una proteína precursora (pro-LC3), posteriormente, el péptido C-terminal del precursor pro-LC3 se escinde por los homólogos de Atg4B de mamíferos para formar LC3-I con una glicina C-terminal expuesta (Kabeya *et al.*, 2004; Kabeya *et al.*, 2000; Tanida *et al.*, 2004). LC3-I citosólica se activa luego por la enzima E1 Atg7 y se transfiere a la enzima E2 Atg3 (Tanida *et al.*, 2002; Tanida *et al.*, 2001; Kabeya *et al.*, 2000), y finalmente se modifica a una proteína unida de membrana, LC3-II, al conjugarse con el grupo amino de fosfatidiletanolamina (PE) (LC3-1/PE) (Li *et al.*, 2020). El LC3 conjugado se integra en el fagóforo en crecimiento mediante el sistema de conjugación de Atg5-Atg12, lo que facilita el crecimiento y el alargamiento del autofagosoma (Fig. 9). El sistema de conjugación Atg5-Atg12 se disocia después del cierre y maduración del autofagosoma (Shrestha *et al.*, 2020).

Un lisosoma degradativo maduro se define como: (A) un orgánulo de almacenamiento para formas activas de enzimas degradativas con pH ácido óptimo (hidrolasas), que permiten la degradación del sustrato; (B) membranas limitantes con proteínas específicas asociadas a la membrana glicosiladas tales como LAMP-1 y LAMP-2; y (C) carece de proteínas no lisosomales tales como IGF2R/CI-M6PR (receptor del factor de crecimiento 2 similar a la insulina) (Cheng *et al.*, 2018). Las proteínas de membrana asociadas a los lisosomas (LAMP-1 y LAMP-2), según Hunziker *et al.* (1996), son los principales componentes proteicos de la membrana lisosomal. Son proteínas transmembranales de tipo I con un gran dominio luminal, un dominio transmembranal y una cola citoplasmática C-terminal. Las colas citosólicas conservadas de LAMP-1 y LAMP-2 tienen 11 residuos de largo y contienen información necesaria para su direccionamiento intracelular después de la biosíntesis (Eskelinen *et al.*, 2004).

Después del cierre del fagóforo, el autofagosoma de doble membrana maduro se fusiona para degradar su contenido. Los autofagosomas y los lisosomas primero deben acercarse y luego unirse antes de que se produzca la fusión mediada por SNARE. El primer paso de la fusión del autofagosoma-lisosoma, la membrana externa autofagosómica se fusiona con la membrana lisosómica única (Fig. 9). La fusión se completa mediante la degradación de la membrana

interna autofagosómica por hidrolasas lisosómicas y la exposición de los contenidos del autofagosoma a la luz del lisosoma (Yu *et al.*, 2017).

Para lograr una fusión eficiente de autofagosomas y lisosomas, ambos organelos deben estar físicamente cerca. Heuser (1989) menciona que la inanición causa la agrupación perinuclear de los lisosomas, impulsada por cambios en el pH intracelular, mientras que los autofagosomas, según Jahreiss *et al.* (2008), se forman al azar en la región periférica de la célula. Fass *et al.* (2006) dicen que, una vez cerrados, los autofagosomas se unen y transportan a lo largo de los microtúbulos y finalmente se concentran en la región perinuclear donde se encuentran los lisosomas. La dineína, un motor de microtúbulos dirigido por el extremo negativo, media el movimiento centrípeto de los autofagosomas (Yu *et al.*, 2017).

Los determinantes de la selectividad en diferentes vías autofágicas son tan variados como los sustratos mismos y van desde motivos peptídicos, modificaciones covalentes (como ubiquitina), modificaciones postraduccionales (como acetilación, fosforilación) y reconocimiento mediante proteínas receptoras específicas (tales como p62 o NBR1) (Kaushik & Cuervo, 2012). Uno de los sustratos mejor caracterizados de la autofagia selectiva es p62, que también se conoce como secuestrador 1/SQSTM1 (Mizushima & Komatsu, 2011).

El receptor de carga humano p62/SQSTM1 media la degradación del material de carga ubiquitinado, como proteínas agregadas o bacterias citosólicas (Zaffagnini & Martens, 2016). De acuerdo con Shin (1998) y Myeku y Figueiredo-Pereira (2011), p62 interactúa de manera no covalente con cadenas de ubiquitina o poliubiquitina a través del dominio LIR (que también se conoce como el motivo de interacción Atg8), y al proteosoma a través del dominio PB1 (Liu *et al.*, 2016). Posteriormente, p62 se incorpora al autofagosoma y luego se degrada (Mizushima & Komatsu, 2011) junto con el contenido citoplásmico. Abounit *et al.* (2012), mencionan que, ALFY, otra proteína de unión a la ubiquitina se une a PI3P, p62 y Atg5 para asegurar a las proteínas presentes en el autofagosoma (Ravenna *et al.*, 2017).

El nivel intracelular de p62, según Puissant *et al.* (2012), depende de la regulación transcripcional y la degradación autofágica postraduccionales. La transcripción de p62 está modulada por el estrés oxidativo (Nrf2), la ruta Ras/MAPK, la ruta JNK/c-Jun y algunos compuestos químicos (p. ej. resveratrol, inductor de la autofagia). Aunque Thompson *et al.* (2003) aseguran que la inhibición del proteosoma y la inanición también pueden inducir la síntesis de p62 (Liu *et al.*, 2016). La oligomerización de p62 confiere gran avidéz a la interacción con la ubiquitina agrupada y, por lo tanto, estabiliza la unión al material de carga en el que se encuentra la ubiquitina (Zaffagnini & Martens, 2016).

IV. ANTECEDENTES

En los mamíferos ha sido documentado que los folículos ováricos que sufren atresia pueden ser eliminados por diversos procesos de muerte celular programada. Aunque la apoptosis ha sido ampliamente aceptada como la ruta convencional de eliminación en varios roedores, aportes recientes de Ortiz *et al.* (2006); Morais *et al.*, (2012); Escobar *et al.* (2013); Yadav *et al.* (2018), indican que la autofagia puede ser un mecanismo alternativo involucrado en el agotamiento del folículo a través de acciones independientes o en tándem con apoptosis (Gioia *et al.*, 2019).

Algunos estudios *in vitro* como el de Choi *et al.* (2010), arrojan evidencias que indican que los niveles de expresión de la proteína LC3-II y la proteína asociada a la apoptosis caspasa-3 activa, dependen de los niveles de gonadotropinas. Además, señalan que en las células de la granulosa, la inanición sérica induce la acumulación de autofagosomas para activar la apoptosis mediante la disminución de la expresión de Bcl-2, lo que sugiere que la autofagia puede promover la apoptosis en las células de la granulosa.

En otro estudio, se observó que en hembras recién nacidas de ratón espinoso (*Acomys cahirinus*) experimentan una mayor tasa de atresia folicular mediada por la autofagia, mientras que la forma dominante de la atresia ovárica en días postnatales consecutivos es la apoptosis (Hułas-Stasiak & Gawron, 2011).

En folículos de cerdos adultos, también se confirmó que la apoptosis y la autofagia son procesos que ocurren en las células de la granulosa que sufren la muerte celular programada, dando como consecuencia, el agotamiento de los folículos antrales. Adicionalmente, se observó que hay mayor abundancia de la proteína autofágica LC3B-II en células del *cumulus* y en ovocitos atrésicos, al mismo tiempo que no hay detección de actividad apoptótica (Gioia *et al.*, 2019). Con respecto a las células germinales, se han realizado tratamientos *in vitro* con el activador de autofagia, la rapamicina, lo que aumenta significativamente la expresión de las proteínas pro-autofágicas Beclina-1 y LC3, lo que promueve la maduración en ovocitos al inducir la autofagia (Lee *et al.*, 2015). Sin embargo, diversas evidencias obtenidas en nuestro grupo de trabajo, indican que la presencia de autofagia en niveles más allá de los fisiológicos, puede conducir a la eliminación de los ovocitos, contribuyendo así, a la atresia folicular en ovarios de rata Wistar.

Un aspecto importante, es que en los estudios que se han realizado previamente, se ha detonado la presencia incrementada de proteínas pro-autofágicas en ovocitos claramente alterados. Sin embargo, no se ha definido si el proceso autofágico concluye con la degradación del contenido en los autofagosomas.

V. JUSTIFICACIÓN

Se conoce la presencia de proteínas autofágicas en el ovario y se ha identificado un incremento significativo de LAMP-1 y LC3 en ovocitos en proceso de muerte, implicando a la autofagia como un mecanismo de eliminación celular de estas células germinales. Sin embargo, no se conoce si el proceso de degradación autofágico se lleva a cabo hasta la fase final del mismo. Por lo tanto, en el presente trabajo se busca identificar a nivel inmunohistoquímico el flujo autofágico en ovocitos de rata adulta en las diferentes etapas del ciclo estral.

VI. HIPÓTESIS

Se ha descrito un incremento de las proteínas que participan en el proceso autofágico durante la eliminación de ovocitos, por lo que se espera que los marcadores relacionados con el inicio de la autofagia como mTOR, así como del flujo autofágico p62, muestren cambios significativos de acuerdo con la progresión de eliminación celular.

VII. OBJETIVOS

Objetivo general.

- Analizar a nivel inmunohistoquímico el flujo autofágico en ovocitos atrésicos de ovario de rata adulta.

Objetivos particulares.

1. Determinar las características morfológicas del ovario de rata adulta en las diferentes etapas del ciclo estral.
2. Describir las características estructurales de ovocitos de folículos atrésicos y no atrésicos.
3. Identificar la ausencia-abundancia de las proteínas mTOR, LC3 y LAMP-1 en ovocitos.
4. Definir el flujo autofágico por medio de la presencia-abundancia de la proteína p62 en ovocitos autofágicos.

VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

i. Procesamiento del material biológico.

1. Extraer ovarios derecho e izquierdo de ratas Wistar en diferente fase del ciclo estral (3 ratas distintas en cada fase).
2. Fijar las muestras en paraformaldehído al 4% preparado en PBS durante 24 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. Depositar 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 de 7 µm de grosor de ovario derecho e izquierdo, seriados por cada fase estral de diferentes ratas Wistar adultas

(Fig. 10). Colocar los cortes en portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina y dejar dentro de la estufa a 37°C durante al menos 24 horas.

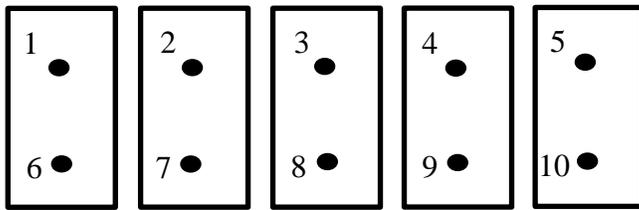


Fig. 10 Representación del orden de los cortes histológicos de ovario de rata adulta seriados.

2. Dejar los cortes histológicos dentro de la estufa durante 5 minutos a una temperatura de 60°C.
3. Desparafinar los cortes colocándolos en Xilol durante 10 minutos y posteriormente, en cada uno de los siguientes alcoholes graduales, durante 10 minutos:

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

4. Enjuagar durante 5 minutos en agua destilada.
5. Sumergir los cortes desparafinados en hematoxilina durante 10 minutos. Retirar el colorante y posteriormente, enjuagarlos durante 10 minutos al chorro del agua de la llave.
6. Enjuagar las muestras en agua destilada, posteriormente en etanol ácido (HCl 10% en Etanol al 70%) y en agua amoniacal (NaOH 1%).
7. Realizar una inmersión de los cortes en etanol al 50% durante unos segundos.
8. Depositar en eosina alcohólica durante 3 minutos.
9. Enjuagar los cortes histológicos en las siguientes soluciones graduales de alcohol hasta llegar al xilol:

Etanol 80%
Etanol 90%
Etanol absoluto
Etanol-Xilol
Xilol

10. Realizar el montaje de las muestras con resina sintética y dejar secar dentro de la estufa a 40°C.

11. Por último, observar en el microscopio Nikon Eclipse E600 y tomar fotografías utilizando una cámara digital Nikon DXM1200, de las secciones de ovarios. Identificar a los ovocitos de folículos sanos y folículos atrésicos en las 4 fases del ciclo estral.

iii. Inmunolocalizaciones de LAMP-1, LC3, mTOR, mTORp y p62.

1. Desparafinar e hidratar los cortes histológicos.
2. Enjuagar en PBS 1X durante 10 minutos.
3. Para la recuperación antigénica, colocar los cortes histológicos dentro de un vaso de Coplin, al que se agrega un amortiguador de citratos. Utilizando un baño María, introducir al microondas en potencia 10 con una duración de 3 minutos y posteriormente con una potencia de 3 durante 6 minutos.
4. Dejar enfriar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
5. Mientras tanto, pesar 1.125 g de Glicina y diluir en 150 ml de PBS 1X (glicina 100 mM).
6. Ya finalizados los 30 minutos, lavar los cortes histológicos tres veces en PBS 1X con una duración de 10 minutos en cada lavado.
7. Extraer el PBS 1X y agregar la glicina 100 mM, en la cual se incuban las muestras durante 1 hora.
8. Preparar las disoluciones de los anticuerpos primarios (Tabla 1.).

Anticuerpo	Concentración
	$\mu\text{L} / 100 \mu\text{L de PBS}$ 1x
α LAMP-1	1/100
α LC3	1/100
α mTOR	2/100
α mTORp	2/100
α p62	2/100

Tabla 1. Anticuerpos y diluciones utilizados.

9. Preparar una cámara húmeda.
10. Incubar cada anticuerpo en sus correspondientes muestras (Tabla 2) y mantener dentro de la cámara húmeda a 4°C durante toda la noche.

	α -LAMP-1	α -LC3	α -mTOR	α -mTORp	α -p62
Estro	P1 S3	P2 S3	P3 S3	P4 S3	P5 S3
Metaestro	P1 S2	P2 S2	P3 S2	P4 S2	P5 S2
Diestro	P1 S2	P2 S2	P3 S2	P4 S2	P5 S2
Proestro	P1 S5	P2 S5	P3 S5	P4 S5	P5 S5

Tabla 2. Organización de las series de cortes histológicos de ovario de rata adulta en diferentes estadios del ciclo estral con sus respectivos anticuerpos primarios (P= portaobjetos, S= serie).

11. Lavar 3 veces en PBS 1X (cada lavado de 3 minutos).
12. Preparar una disolución de 1 μ L del anticuerpo secundario *Goat Anti-Rabbit* Alexa 488 nm en 200 μ L de PBS 1X.
13. Incubar el anticuerpo secundario en todas las muestras durante 2 horas, protegidas de la luz.
14. Lavar 3 veces en PBS 1X (3 minutos cada lavado).
15. A cada muestra agregar DAPI (10 μ M) durante 1 minuto.
16. Lavar 3 veces en PBS 1X (de 3 minutos cada lavado).
17. Por último, realizar el montaje de las muestras utilizando medio de montaje Fluoroshield (abcam).

iv. Quantificación de la intensidad de fluorescencia.

1. Para cada proteína (LAMP-1, LC3, mTOR, mTORp y p62) dividir dos grupos: ovocitos e folículos atrésicos y ovocitos de folículos sanos.
2. Fotografiar imágenes de los ovocitos atrésicos y sanos mediante una cámara digital Nikon DXM1200F de alta resolución, en Contraste de Fases, FITC y DAPI.
3. Procesar y analizar las imágenes en el programa Image J (Programa de Java de procesamiento y análisis de imágenes).
4. Analizar los datos de intensidad de fluorescencia (píxeles/cm²) realizando una prueba de t-Student con un valor de significancia de $P < 0.05$ para determinar si hay diferencias entre la expresión de las proteínas autofágicas en ovocitos atrésicos y los ovocitos sanos.

IX. RESULTADOS.

1. Morfología en el ovario de rata durante el ciclo estral.

Para observar la estructura del ovario durante las diferentes fases del ciclo estral, se llevó a cabo una tinción hematoxilina-eosina en muestras de ovarios de ratas adultas; lo que permitió identificar diferentes tipos de folículos, alteraciones que indican si el folículo se mantiene sano durante su desarrollo o si se encuentra en estado atrésico.

1.1 Folículos Sanos.

Los folículos sanos se distinguieron al presentar una forma circular muy regular. Se lograron identificar los diferentes tipos celulares que conforman a la estructura: células de la teca, células de la granulosa y la célula germinal u ovocito. Las células de la teca tienen una forma alargada, se encuentran estrechamente relacionadas con la lámina basal la cual establece un límite entre las células de la teca y las células de la granulosa. Estas células se encuentran unidas entre sí, rasgo importante para definir la normalidad o salud de los folículos. Por otro lado, el ovocito es una célula con forma redonda la cual está rodeada por la zona pelúcida, cuando el folículo ha alcanzado la etapa de desarrollo hacia folículo secundario y mantiene una estrecha relación con las células somáticas que lo rodean.

En todas las fases del ciclo estral, se lograron identificar folículos sanos en diferente etapa de maduración. La Fig. 11 muestra folículos sanos que fueron observados en diferentes organismos. En A, se muestra un folículo de Graaf en cuyo interior se ha formado un *cumulus ooforo* que rodea al ovocito y también se observa una enorme cavidad antral; este folículo es de un ovario de rata en estro. En la imagen B se muestra un folículo antral cuyo ovocito se encuentra rodeado por las células de granulosa; este folículo es de un ovario de rata en metaestro. En C se muestra un folículo secundario en el cual las células de la granulosa están proliferando. Al lado del folículo, se puede observar un folículo primordial en cuyo interior hay un ovocito rodeado de células foliculares; estos folículos son de un ovario de rata en diestro. En la imagen D se muestra un folículo en etapa antral, las células de la granulosa mantienen una estrecha relación con el ovocito y se puede apreciar el crecimiento de la cavidad antral; este folículo es de un ovario de rata en proestro.

1.2 Folículos atrésicos.

Los folículos atrésicos se identificaron como aquellos que presentan una forma retraída, dado un colapso provocado por la invasión del tejido conjuntivo conforme avanza la degeneración. Como se ha mencionado previamente, la mayoría de los ovocitos no alcanzan la madurez y serán eliminados ya sea mediante vías apoptóticas y no apoptóticas. Asimismo, se identificaron los siguientes cambios celulares dentro de los folículos que mostraron atresia: el

ovocito se degenera y manifiesta una forma ovoide, las células de la granulosa se empiezan a compactar, separar y pueden sufrir cambios morfológicos que podrían corresponder a la apoptosis, ya que se observa fragmentación celular. Se identificaron folículos atrésicos en las etapas secundaria y antral en diferentes fases del ciclo estral de diferentes organismos, como se muestra en la Fig. 12. En la imagen A, se muestra un folículo antral; correspondiente a un ovario de rata en estro. En la imagen B, se muestra un folículo antral de un ovario de rata en metaestro. En la imagen C, se muestra también un folículo antral en cuyo interior se puede observar que hay una evidente disminución en el número de capas de células de la granulosa que rodean al ovocito; este folículo es de ovario de rata en diestro. Y en la imagen D, se muestra un folículo secundario el cual inició el proceso de atresia antes de que comenzara a formarse su cavidad antral; este folículo es de un ovario de una rata en proestro. En las cuatro imágenes A-D se puede apreciar que en efecto, durante la atresia los ovocitos sufren compactación y es por ello que adaptan una forma ovoide. Las células de la granulosa comienzan a separarse y se ven fuertemente teñidas dado a que también sufren compactación y posiblemente, apoptosis.

1.3 Folículos con morfología apoptótica.

Se identificaron folículos cuya atresia folicular se encuentra muy avanzada, de hecho se pueden identificar características morfológicas tanto en las células somáticas como en las germinales, que podrían corresponder a la apoptosis, ya que se distinguieron las siguientes características: ovocitos fuertemente compactados que presentan cromatina fragmentada, una zona pelúcida desprendida que indica una desintegración lenta, incursión del tejido conjuntivo al interior del folículo, e invasión a las capas de células de la granulosa por macrófagos.

Se identificaron folículos con morfología apoptótica en todas las fases del ciclo estral. En la Fig. 13 se muestran folículos observados en diferentes organismos, cuyos ovocitos presentan morfología apoptótica. En la imagen A, se muestra un folículo colapsado cuya cavidad antral ha sido invadida por un macrófago, este folículo corresponde a un ovario de una rata en estro. En la imagen B, se muestra un folículo atrésico de un ovario de una rata en metaestro. En la imagen C, se observa otro de un ovario de rata en diestro. Y en la imagen D se muestra un también un folículo atrésico de un ovario de rata en proestro.

En las cuatro imágenes A-D, la zona pelúcida que rodea a los ovocitos, se observa como una banda homogénea teñida que se está desintegrando. En las imágenes C y D se puede apreciar que la incursión del tejido conjuntivo al interior de folículo es más evidente. Y en las imágenes A y D se muestra una fuerte compactación en los ovocitos y cromatina fragmentada.

1.4 Folículos con características autofágicas.

En todas las fases del ciclo estral se identificaron folículos en proceso de atresia, evidenciada por la separación de las células de la granulosa entre sí y del ovocito. En algunos casos se logró identificar que el citoplasma del ovocito presentaba irregularidades en el citoplasma, indicando la presencia de vesículas claras que podrían corresponder a vesículas autofágicas, lo anterior indica una eliminación del ovocito mediada por un mecanismo diferente a la apoptosis.

En la Fig. 14, se muestran folículos atrésicos con ovocitos con vesículas claras en el citoplasma, observados en diferentes organismos. En la imagen A, se muestra un folículo antral en el que se observa a un ovocito con regiones claras en el citoplasma alrededor de su núcleo; este folículo pertenece a un ovario de rata en estro. En la imagen B, se muestra un folículo antral en el cual es muy evidente la separación que existe entre las células de la granulosa y el ovocito. En la región periférica del citoplasma del ovocito se observan vesículas claras grandes; este folículo es de un ovario de rata en metaestro. En la imagen C, se muestra un folículo secundario. Este folículo parece no estar alterado, sin embargo, las células de la granulosa prácticamente se han separado del ovocito, así mismo, en la región citoplasmática del ovocito se observan pequeñas vesículas claras. También se puede observar la presencia de un folículo primario a lado de éste el cual tiene una morfología aparentemente normal. Estos folículos son de un ovario de rata en diestro. En la imagen D, se muestra otro folículo antral el cual ha perdido su morfología redondeada lo mismo que el ovocito que se localiza en su interior. Dentro del ovocito se aprecian vesículas claras alrededor del núcleo; este folículo pertenece a un ovario de una rata en proestro.

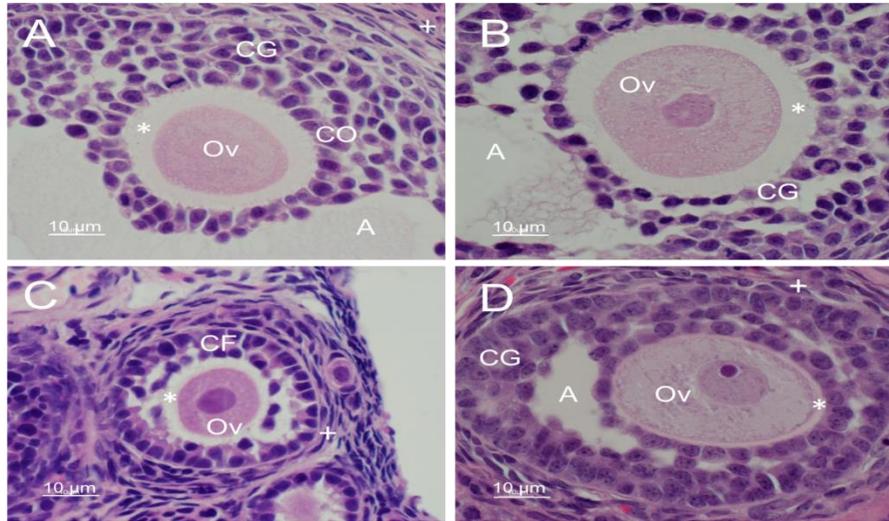


Fig. 11 Folículos sanos. A) Se observa un folículo de Graaf de un ovario de rata en estro. El ovocito (Ov) se encuentra rodeado por el *cúmulo ovóforo* (CO) y por una enorme cavidad antral (CA). B) Folículo antral de rata en metaestro, se observa un ovocito (Ov) rodeado de las células de la granulosa (CG) y la cavidad antral (CA). C) Permite observar un folículo secundario con ovocito rodeado por células de la granulosa en proliferación, así mismo, se puede observar la presencia de otro folículo primordial cuyo ovocito está rodeado por células foliculares. Estos folículos pertenecen a un individuo en diestro. D) Ovocito de rata en proestro en etapa antró en formación, las células de la granulosa guardan estrecha relación con el ovocito y se aprecia el inicio de la formación de la cavidad antral. Se observa la zona pelúcida (*) que rodea al ovocito (Ov), y las células de la teca (+) alrededor del folículo. *Tinción H-E.*

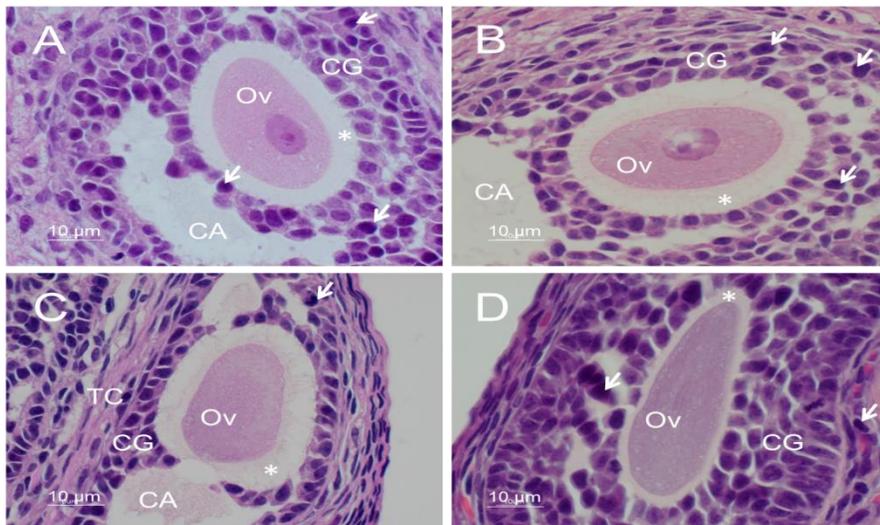


Fig. 12 Folículos atrésicos de ovarios de rata en diferentes fases del ciclo estral. A) Folículo antral de rata en estro, B) Folículo antral de rata en metaestro, C) Folículo antral de rata en diestro, en el cual se aprecia la disminución en el número de capas celulares que rodean al ovocito. El folículo empieza a colapsar debido a la invasión del tejido conjuntivo (TC). D) Folículo secundario de rata en proestro. Durante la atresia, los ovocitos sufren compactación y es por ello que adaptan una forma ovoide. Y las células de la granulosa (CG) empiezan a separarse y a sufrir apoptosis (→). *Tinción H-E.*

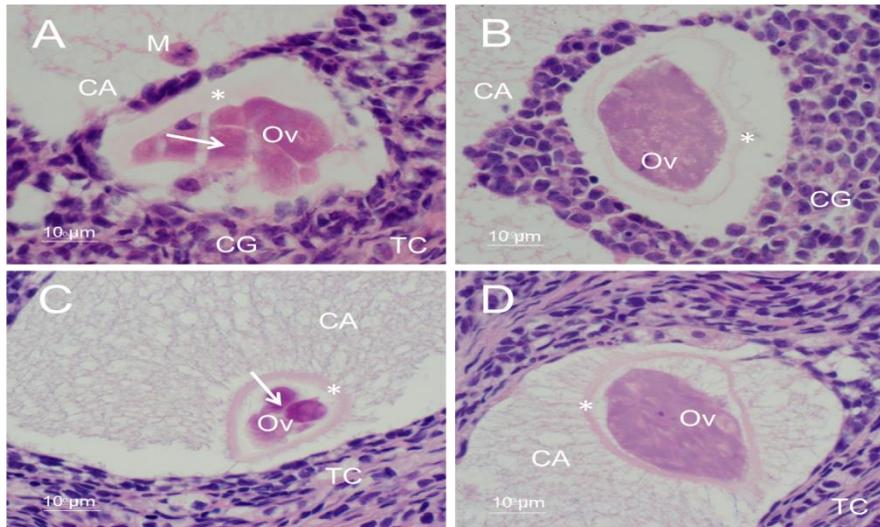


Fig. 13 Folículos con morfología apoptótica. (A) Estro, (B) Metaestro, (C) Diestro y (D) Proestro. En los folículos de (A) y (B) las células germinales muestran una fuerte compactación, cromatina fragmentada (→) y la zona pelúcida (*) está desprendida completamente del ovocito como una banda homogénea teñida. En los folículos atrésicos (C) y (D), es más evidente su retracción dado que se observa la incursión del tejido conjuntivo (TC) del estroma, donde antes había capas de células de la granulosa alrededor del ovocito. Asimismo también ocurre la invasión por macrófagos (M) como se observa en el interior de la cavidad antral (CA) del folículo de la fase estro (A). *Tinción H-E.*

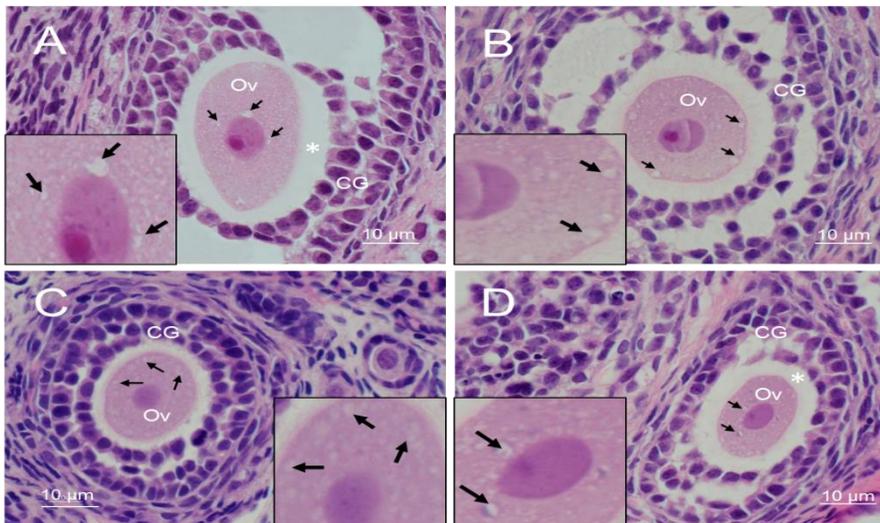


Fig. 14 Folículos con características autofágicas. A) Folículo antral de rata en estro en el que se observa a un ovocito con regiones claras (→) en el citoplasma alrededor del núcleo. B) Folículo antral de ovario de rata en metaestro, en el cual se observa la separación existente entre las células de granulosa y el ovocito. Además, se observan vesículas claras (→) en la región periférica del citoplasma del ovocito. C) Folículo secundario de rata en diestro, en el cual se aprecia que las células de la granulosa se han separado del ovocito, y en el interior de éste se observan vesículas claras (→). D) Folículo antral de rata en proestro, en el cual se observa al ovocito con forma ovoide y dentro de éste se parecían vesículas claras (→) alrededor del núcleo. *Tinción H-E.*

2. Análisis inmunohistoquímico de proteínas relacionadas a la autofagia.

Para definir si las vesículas claras observadas con la tinción general de hematoxilina-eosina en los ovocitos, corresponden a elementos del proceso autofágico, se realizó la inmunodetección de proteínas involucradas en el evento, así como una posterior cuantificación de la intensidad de fluorescencia de las marcas. En primer lugar, se identificó la presencia de lisosomas, ya que éstos organelos se encuentran estrechamente relacionados con el proceso autofágico debido a que son los organelos encargados de degradar el contenido de los autofagosomas. Lo anterior se realizó por medio de la inmunolocalización de la proteína LAMP-1, la cual se encuentra en la membrana de los lisosomas. Se logró identificar que los ovocitos con un citoplasma irregular dentro de folículos atrésicos, poseían una incrementada marca positiva a la proteína LAMP-1, en comparación a aquellos dentro de los folículos no atrésicos (normales) (Fig. 15).

Adicionalmente, se identificó la presencia-abundancia de la proteína LC3, la cual indica la presencia directa de autofagosomas. Estas observaciones permitieron definir que en los ovocitos de folículos atrésicos con vesículas claras, existe una marca incrementada de LC3 en comparación a aquellos de folículos sanos o con citoplasma regular (Fig. 16).

Una vez definido que los ovocitos con presencia de vesículas claras están en un proceso autofágico, para definir la participación de esta proteína para iniciar a la autofagia en ovocitos atrésicos. Los resultados indicaron que la proteína mTORp se ve incrementada en los ovocitos de folículos atrésicos (Fig.18), en los que se ha observado un citoplasma con vesículas claras. Así mismo, se vio una reducción en la marca de la proteína mTOR no fosforilada en los ovocitos de folículos atrésicos (Fig. 17). Estos resultados evidencian que la autofagia en ovocitos atrésicos de ovario de rata incluye la participación de la proteína mTOR en su forma fosforilada.

Finalmente, se identificó el flujo autofágico, por medio de la inmunodetección de la proteína p62. Estas observaciones permitieron definir que existe una disminución de la marca correspondiente a la proteína p62 en aquellos ovocitos de folículos atrésicos cuyo citoplasma contiene una gran cantidad de vesículas claras, en comparación con los ovocitos de folículos sanos (Fig. 19), lo que indica que en los ovocitos que sufren un proceso de autofagia incrementada, no sólo hay secuestro del material citoplasmático en autofagosomas, sino que se está llevando a cabo la degradación del material autofagocitado y conducido a los lisosomas.

Una vez que se definió que los ovocitos con vesículas citoplásmicas claras de folículos atrésicos, están llevando a cabo el proceso de autofagia, se identificaron todas las proteínas que participan en el evento autofágico, desde el inicio hasta la degradación del contenido de los autofagosomas. Lo anterior se logró haciendo cortes seriados de un mismo ovocito. Se evaluó en ovocitos sanos y alterados la presencia-abundancia de las proteínas mTOR, mTORp, LC3, LAMP-1 y p62. Los resultados observados indican que en los ovocitos

atrésicos existe una marca incrementada de las proteínas mTORp, LC3 y LAMP-1, lo que evidencia que en efecto se está llevando a cabo una incrementada actividad autofágica, en comparación con los ovocitos sanos (Fig. 20). Adicionalmente, se identificó que los ovocitos en degeneración, poseen una marca disminuida en comparación con los ovocitos sanos, de las proteínas mTOR y p62 (Fig. 20).

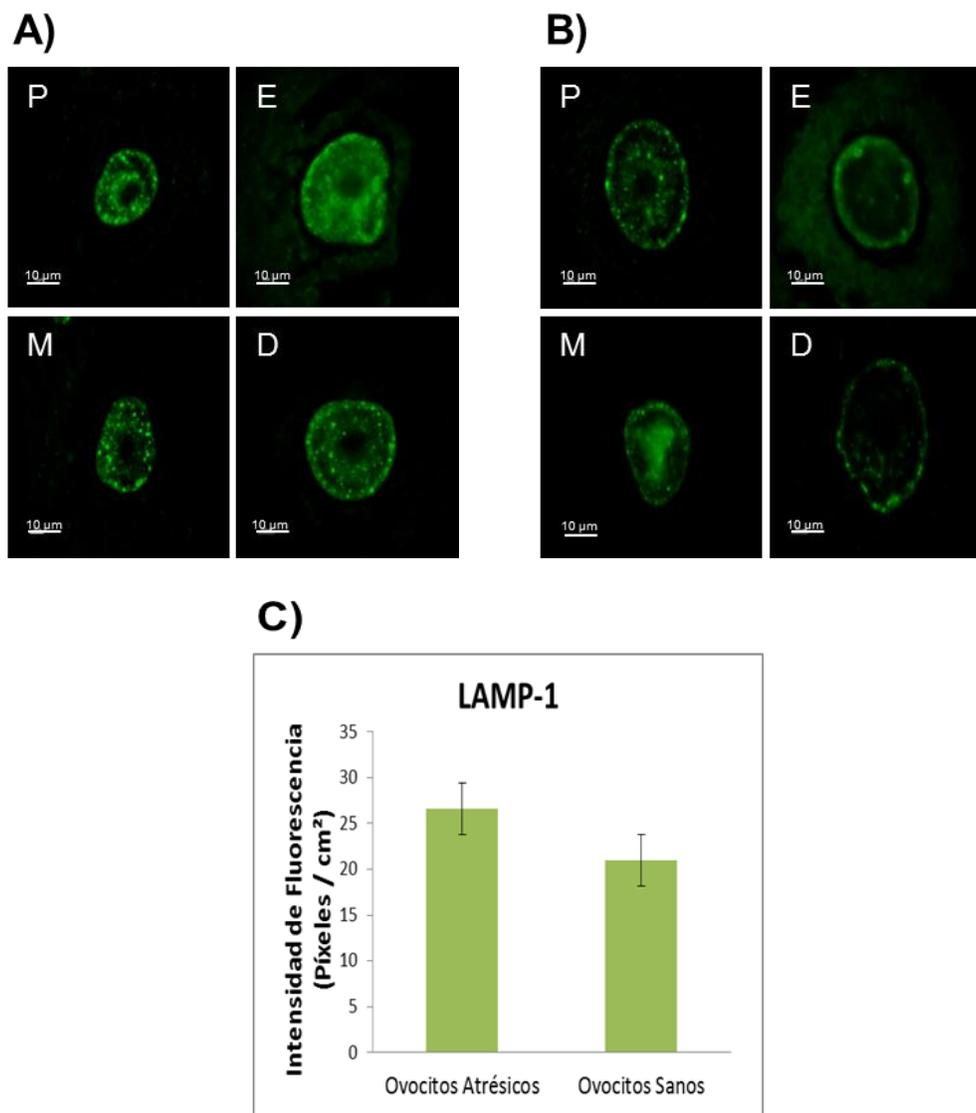


Fig. 15 Inmunodetección de LAMP-1 en ovocitos atrésicos y ovocitos sanos en diferentes fases del ciclo estral: proestro (P), estró (E), metaestro (M) y diestro (D). A) Ovocitos atrésicos con marca fluorescente indicando la presencia de la proteína LAMP-1 en niveles incrementados, comparados con B) los ovocitos sanos. C) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de ovocitos atrésicos y ovocitos sanos. El promedio más alto de intensidad de fluorescencia corresponde a los ovocitos atrésicos (n=67), siendo este de 27.5713 píxeles/cm²; mientras que los ovocitos sanos (n= 39) presentan el promedio más bajo de intensidad, el cual es de 20.9931 píxeles/cm². Las barras de error representan el error estándar. Se realizó una prueba t-Student para comparar la intensidad de fluorescencia de ambos grupos de celular, y se observaron diferencias significativas entre los ovocitos atrésicos y sanos P<0.05.

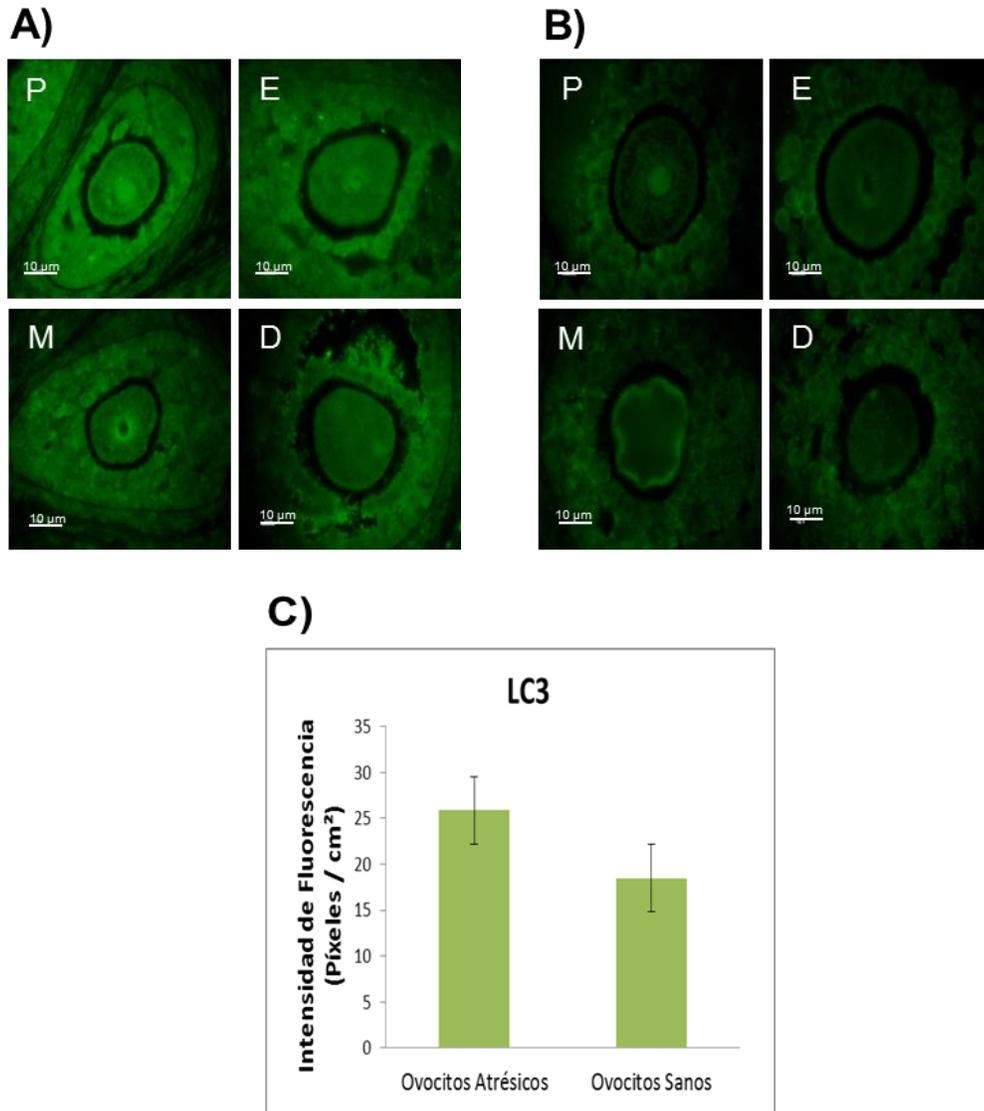


Fig. 16 Inmunolocalización de LC3 en ovocitos atrésicos y ovocitos sanos en diferentes fases del ciclo estral: proestro (P), estro (E), metaestro (M) y diestro (D). A) Micrografía de fluorescencia que muestra una marca positiva de la proteína relacionada a la autofagia LC3, en ovocitos atrésicos en distintas fases del ciclo estral. B) Micrografía de fluorescencia de ovocitos sanos en las cuatro fases del ciclo estral que presentan una marca baja de LC3 comparada con los ovocitos de folículos atrésicos. C) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia. Los ovocitos atrésicos (n= 70) tienen un mayor promedio de intensidad siendo este de 25.8768 píxeles/cm², a diferencia del promedio de intensidad de los ovocitos sanos (n=56), siendo este de 18.4853 píxeles/cm². Las barras de error representan el error estándar. Se llevó a cabo una prueba de t-Student y se determinó que hay diferencias significativas de intensidad de fluorescencia entre ovocitos atrésicos v sanos P<0.05.

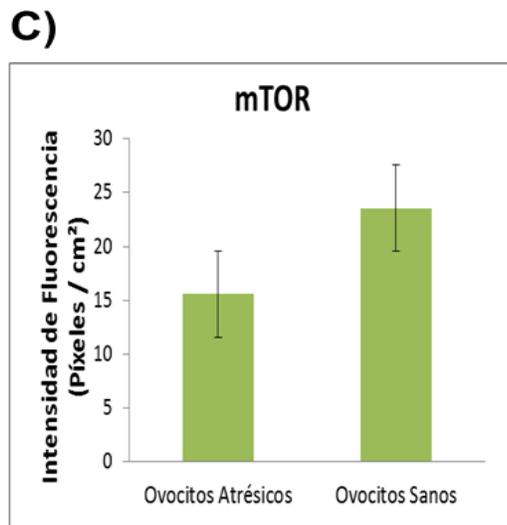
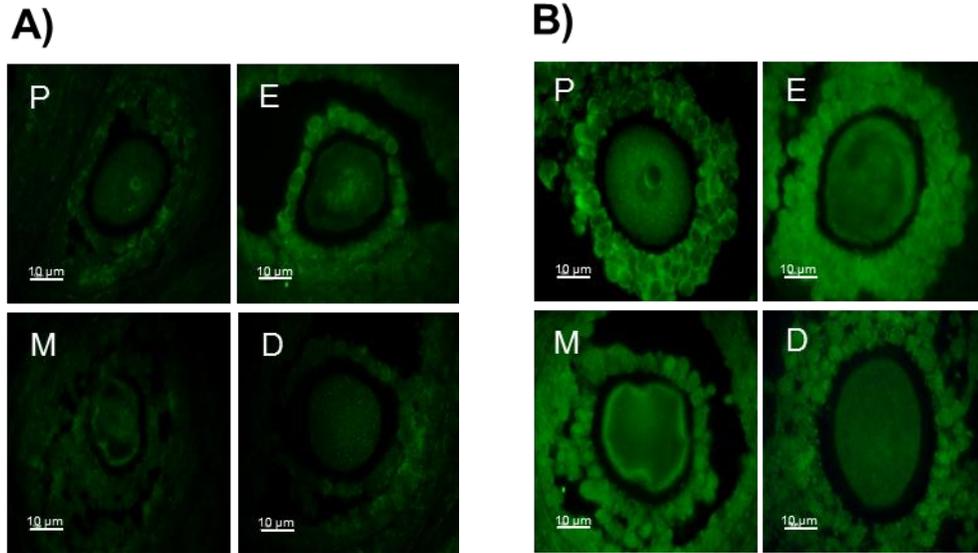


Fig. 17 Detección de la proteína mTOR en ovocitos atrésicos y ovocitos sanos en diferentes fases del ciclo estral: proestro (P), estro (E), metaestro (M) y diestro (D). A) Micrografía de fluorescencia que muestra una marca disminuida de mTOR en ovocitos atrésicos en comparación con los ovocitos de folículos no atrésicos. B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de mTOR, en la cual se observa un promedio mayor de intensidad fluorescencia en los ovocitos sanos (n= 74) de 23.5639 píxeles/cm², a diferencia de los ovocitos atrésicos (n=53), los cuales presentan un promedio de intensidad de 15.5672 píxeles/cm². Las barras de error representan el error estándar. Mediante una prueba de t-Student se determinó una diferencia significativa de la intensidad del marcaje de mTOR entre los ovocitos sanos y atrésicos $P < 0.05$.

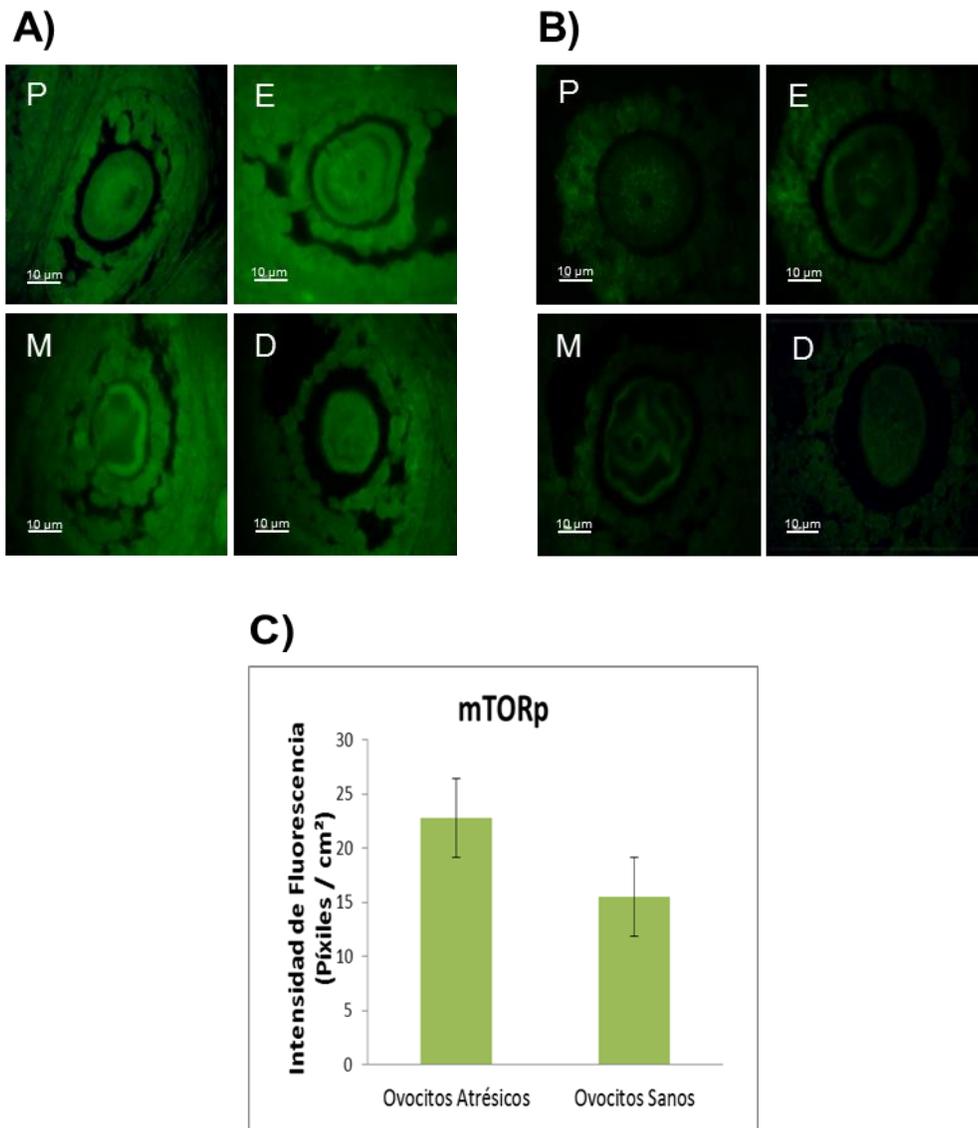


Fig. 18 Inmunodetección de la proteína mTORp en ovocitos atrésicos y en ovocitos sanos en diferentes fases del ciclo estral: proestro (P), estro (E), metaestro (M) y diestro (D). A) Micrografía de fluorescencia que muestra una marca positiva de mTORp en ovocitos atrésicos. B) Micrografía de fluorescencia en la que se observa una marca tenue de la proteína mTORp en ovocitos sanos de las cuatro fases del ciclo estral. C) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de mTORp. Los ovocitos atrésicos (n = 60) presentan un promedio de intensidad de 22.7683 píxeles/cm², es decir más alto que el de los ovocitos sanos (n=46) cuyo promedio es 15.4719 píxeles/cm². Las barras de error representan el error estándar. Mediante un prueba de t-Student se observó que hay diferencias significativas de la intensidad de la marca de mTORp entre los ovocitos sanos y atrésicos P<0.05.

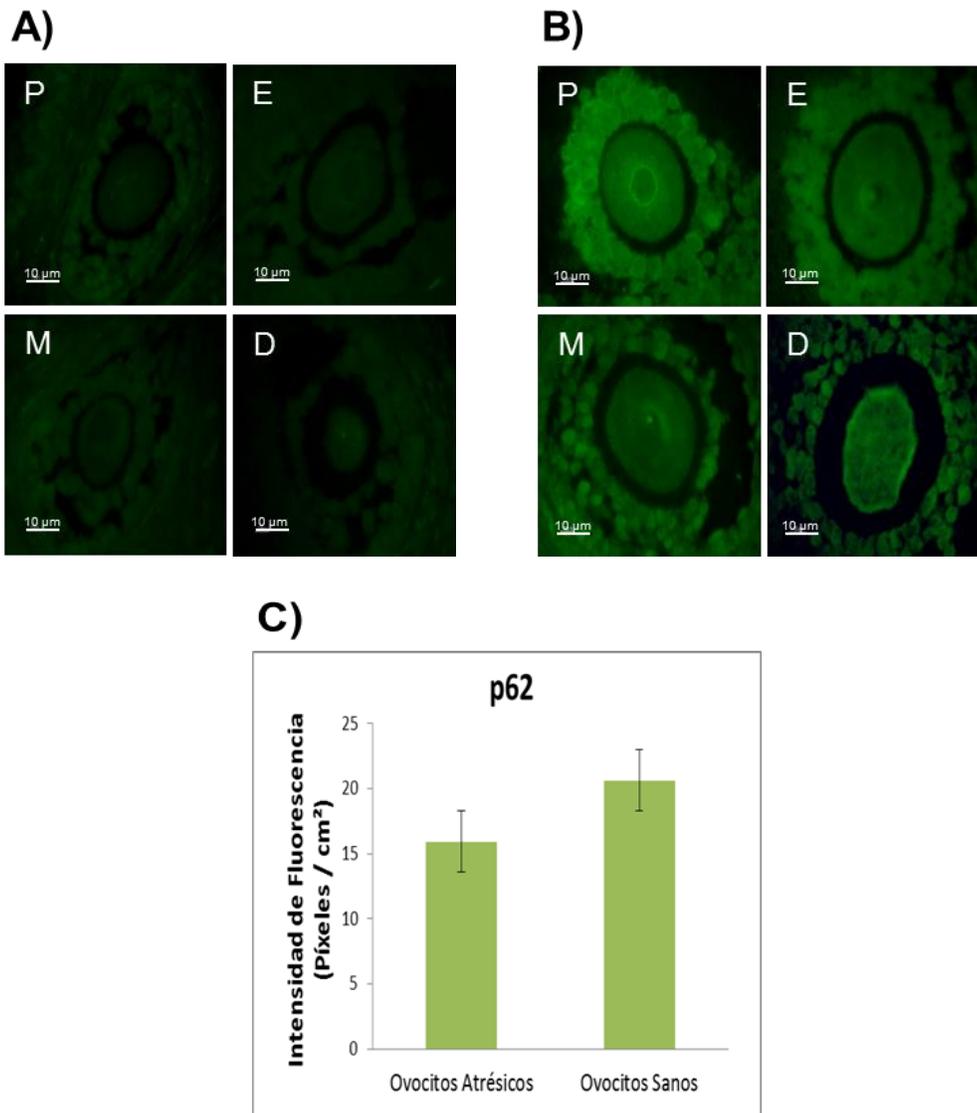
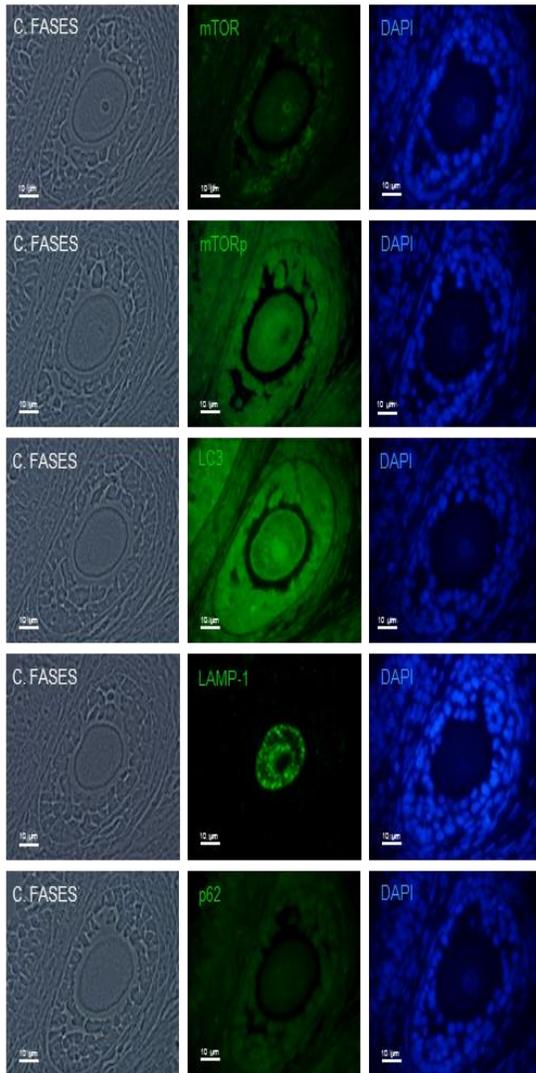


Fig. 19 Detección de la proteína p62 en ovocitos atrésicos y ovocitos sanos en diferentes fases del ciclo estral: proestro (P), estró (E), metaestro (M) y diestro (D). A) Micrografía de fluorescencia de ovocitos atrésicos en distintas fases del ciclo estral que muestran una baja marca de la proteína relacionada a la autofagia p62 en relación con los folículos no atrésicos. B) Cuantificación de la intensidad de p62. Se observa que los ovocitos sanos (n=74) tienen un promedio más alto de intensidad de fluorescencia de 20.6046 píxeles/cm²; a diferencia de los ovocitos atrésicos (n= 66) los cuales tienen un promedio de 15.9193 píxeles/cm². Las barras de error representan el error estándar. Para determinar si hay diferencias significativas entre los ovocitos sanos y atrésicos, se llevó a cabo una prueba t-student en la cual P= 0.0011, lo que indica que si hay diferencias significativas ya que P<0.005.

A)



B)

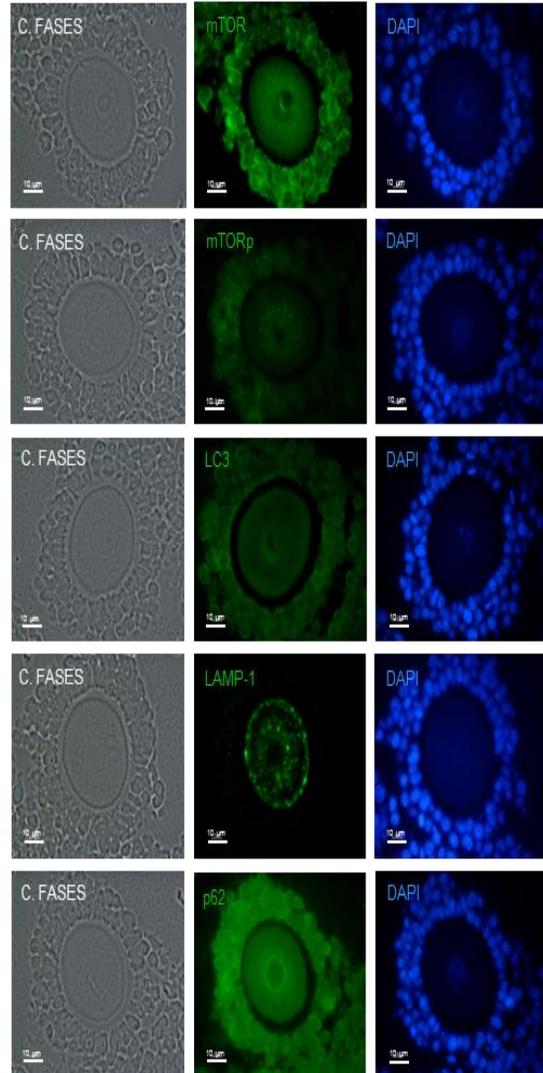


Fig. 20 Micrografías comparativas del marcaje de las proteínas mTOR, mTORp, LC3, LAMP-1 y p62 en un ovocito atrésico (A) y un ovocito sano (B). A) El contraste de fases (C FASES), permite apreciar la morfología del folículo, que muestra una forma irregular y vesículas claras en el citoplasma. Las micrografías de fluorescencia evidencian las marcas positivas para las proteínas mTORp, LC3 y LAMP-1., así mismo, la señal para mTOR y p62 son bajas. Se observa una marca basal para la proteína LAMP-1. Con el contraste de fases, se observa que el ovocito mantiene su forma redonda y las células de la granulosa siguen unidas entre sí.

X. DISCUSIÓN.

La constante eliminación de folículos ováricos implica un amplio remodelamiento tisular. En el presente estudio se analizaron a nivel histológico los ovarios de ratas en diferentes fases del ciclo estral. Logramos observar que hay un aumento considerable de folículos secundarios y de Graaf durante las fases proestro y estro, lo que está relacionado con la cercanía de la ovulación hacia el final del proestro (Sato *et al.*, 2016). En la fase metaestro aumenta el número de cuerpos lúteos y decrece el número de folículos en cualquier etapa. Y en la fase diestro comienza un leve incremento de folículos en desarrollo. Todos estos cambios, están relacionados con el evento de ovulación, ya que los ovocitos son liberados en el estro y por lo tanto, se logran ver cuerpos lúteos después de esta etapa del ciclo estral.

Las tinciones histológicas con hematoxilina-eosina, permitieron identificar folículos sanos y atrésico, en todas las etapas del ciclo estral; los cuales en su mayoría corresponden a las etapas secundaria y antral. Esto debido a que los folículos secundarios o antrales tienen una alta probabilidad de convertirse en folículos atrésicos tempranos (Zhou *et al.*, 2019). Por esta razón resultó difícil observar morfológicamente folículos primordiales y primarios atrésicos.

Los folículos atrésicos observados de ratas adultas en diferentes fases del ciclo estral presentaban un colapso en proceso dada la invasión de tejido conjuntivo que compone al estroma. Los ovocitos sufren una compactación inicial la cual provoca que estas células adapten una forma ovoide, mientras que las células de la granulosa comienzan a separarse y a sufrir apoptosis.

En este estudio se observó estructuralmente que cuando la atresia es mediada por la apoptosis, los folículos se caracterizan principalmente por una fuerte compactación en los ovocitos y fragmentación de los mismos. Hay desprendimiento de la zona pelúcida lo que indica una compactación citoplasmática, además, se aprecia la invasión por macrófagos en la cavidad del folículo. La presencia de regiones con vesículas claras en los citoplasmas de ovocitos en folículos atrésicos, fue un importante indicativo de que estas células están siendo eliminadas por una ruta diferente a la apoptosis, lo cual fue corroborado con las inmunodetecciones de las proteínas que participan en la ejecución de la autofagia. En este tipo de folículos, se observa la separación de las células de la granulosa y los ovocitos, lo cual puede afectar la comunicación entre la célula germinal y las células de la granulosa. La interacción que existe entre el ovocito y las células somáticas es importante porque gracias a ésta se puede determinar el destino del folículo mismo y la calidad de la célula germinal. Por lo que es necesario observar a nivel estructural, la pérdida progresiva de las uniones de tipo gap entre las células de la granulosa y el

ovocito durante la atresia folicular. Pudiéndose realizar, además, una comparación de estas pérdidas de comunicación bidireccional durante la apoptosis y la autofagia. Sin embargo, cabe mencionar, que también es importante observar si hay cambios en la conformación de las conexinas que componen los conexones (hemicconductos) de las uniones gap durante la atresia folicular, lo cual pueda provocar un desacoplamiento entre las seis subunidades de conexina que impida la apertura o cierre de los conexones.

Aunque la autofagia ha sido descrita como un mecanismo de supervivencia al cual recurren las células para mantener la homeostasis contra el estrés del ambiente celular, también, es reconocida como un mecanismo de muerte celular programada que actúa durante la atresia folicular, degradando tanto a las células somáticas como a las células germinales (Ortiz *et al.*, 2006; Escobar *et al.*, 2008, 2010, 2012).

En este trabajo se evidenció la participación de la autofagia en la eliminación de ovocitos de ovarios de ratas adultas en las diferentes fases del ciclo estral. Nuestros resultados expusieron que hay un alto marcaje de la proteína LAMP-1 en los ovocitos atrésicos, lo que indica un gran número de lisosomas dentro de las células germinales. Los lisosomas degradan el material extracelular que ha sido internalizado por endocitosis y componentes intracelulares que han sido secuestrados por autofagia (Saftig & Klumperman, 2009).

Adicionalmente, en este estudio se muestra un alto marcaje de la proteína LC3 en ciertos ovocitos atrésico en todas las fases del ciclo estral. Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Escobar *et al.* (2012), en el cual se observó también un marca aumentada de LAMP-1 y LC3 en ovocitos autofágicos a comparación de aquellos que están experimentando un proceso de muerte no autofágica (Escobar *et al.*, 2012). Los altos marcajes de LAMP-1 y LC3 observados coinciden con la frecuencia de presencia de vesículas autofágicas en los ovocitos atrésicos. Por lo que se presume que estos ovocitos se encontraban experimentando muerte celular programada por autofagia.

Otra proteína observada en este estudio es mTOR en su forma normal y fosforilada. Es una proteína que coordina el crecimiento y el metabolismo de las células eucariotas con aportes ambientales que incluyen nutrientes y factores de crecimiento (Saxton y Sabatini. 2017). Ito *et al.* (2018) y Jimenez *et al.* (2018) mencionan que la vía de señalización de mTOR inhibe la autofagia cuando la expresión de la quinasa aumenta con el incremento de las concentraciones de aminoácidos, ATP y hormonas celulares (Zheng *et al.*, 2019).

Los resultados obtenidos en las cuatro fases del ciclo estral, indican que en los ovocitos atrésicos hay una aumentada marca de mTORp (mTOR fosforilado) y una marca disminuida de mTOR. En contraste, los ovocitos sanos presentan una alta marca de mTOR y una marca disminuida de mTORp. Lo anterior indica

que mTOR está presente en los ovocitos de ovario de rata en distintas etapas del ciclo estral, y al parecer su forma fosforilada promueve la autofagia en ovocitos atrésicos ya que presentan un alto marcaje de mTORp, mientras que en las células sanas, la autofagia se mantiene inhibida dado que presentan una marca disminuida de mTORp.

Por último, en este trabajo también se observó el comportamiento de la proteína p62, la cual es relevante durante los últimos pasos de la autofagia. Según Pankiv *et al.* (2007), p62 se une a las proteínas propensas a agregados conjugados con ubiquitina como la proteína LC3 (Eskelinen & Saftig, 2009). En otros estudios de Kirkin *et al.* (2009), Nezis *et al.* (2008), Kim *et al.* (2008) y Pankiv *et al.* (2007), se ha propuesto que p62 junto con su socio PB1, NBR1 regule el empaque y el suministro de proteínas agregadas poliubiquitinadas, mal plegadas y organelos disfuncionales para su eliminación mediante la autofagia en células de mamíferos y en la mosca de la fruta *Drosophila* (Moscat & Díaz-Meco, 2009). Por lo tanto, p62 mejora el reclutamiento selectivo de la maquinaria autofágica para los agregados y mejora su eliminación autofágica (Eskelinen & Saftig, 2009).

En los ovocitos atrésicos se observó que la marca de p62 está disminuida a comparación con los ovocitos sanos lo cual posiblemente se debe a que p62 al ser una proteína que etiqueta el material citosólico a degradar, es también secuestrado por los autolisosomas junto con el material. No obstante, los ovocitos sanos presentan una aumentada marca de p62, lo que sugiere que al no llevarse a cabo la autofagia, p62 sigue presente en la célula.

XI. CONCLUSIONES.

- Se identificaron ovocitos con alteraciones morfológicas en las cuatro etapas del ciclo estral.
- Se observaron diferencias morfológicas entre los ovocitos en degradación, las que pueden corresponder a apoptosis y otras a la presencia de vesículas claras en el citoplasma.
- Existe una relación directa entre la presencia de abundantes vesículas claras en los citoplasmas del ovocito y los marcadores pro-autofágicos, indicando ovocitos con incremento de la actividad autofágica.
- Se evidenció que existe una relación inversamente proporcional entre la presencia de la proteína mTOR y mTORp, indicando la participación en la forma fosforilada de mTOR durante la autofagia en ovocitos de folículos atrésicos.
- Se encontró que existe un flujo autofágico en los ovocitos de rata adulta, evidenciado por la disminución de p62.

XII. REFERENCIAS.

- 1) Abada, A., & Elazar, Z. (2014). **Getting ready for building: signaling and autophagosome biogenesis.** *EMBO Reports*, 15(8), 839–852. doi:10.15252/embr.201439076
- 2) Abounit, K., Scarabelli, T. M., & McCauley, R. B. (2012). **Autophagy in mammalian cells.** *World Journal of Biological Chemistry*, 3(1), 1. doi:10.4331/wjbc.v3.i1.1
- 3) Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2008). **Biología molecular de la célula.** 5ta edición. México: Ediciones Omega.
- 4) Alers, S., Loffler, A. S., Wesselborg, S., & Stork, B. (2011). **Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the Regulation of Autophagy: Cross Talk, Shortcuts, and Feedbacks.** *Molecular and Cellular Biology*, 32(1), 2–11. doi:10.1128/mcb.06159-11
- 5) Ando, Y., Ohuchida, K., Otsubo, Y., Kibe, S., Takesue, S., Abe, T., Iwamoto, C., Shindo, K., Moriyama, T., Nakata, K., Miyasaka, Y., Ohtsuka, T., Oda, Y. & Nakamura, M. (2020). **Necroptosis in pancreatic cancer promotes cancer cell migration and invasion by release of CXCL5.** *PLOS ONE*, 15(1), e0228015. doi:10.1371/journal.pone.0228015
- 6) Barbacka-Surowiak, G, Surowiak, J, Stoklosowa, S. (2003). **The involvement of suprachiasmatic nuclei in the regulation of estrous cycles in rodents.** *Reprod Biol* 3:99-129.
- 7) Barnard, R. A., Regan, D. P., Hansen, R. J., Maycotte, P., Thorburn, A., & Gustafson, D. L. (2016). **Autophagy Inhibition Delays Early but Not Late-Stage Metastatic Disease.** *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 358(2), 282–293. doi:10.1124/jpet.116.233908
- 8) Berghe, T. V., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., & Vandenabeele, P. (2014). **Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(2), 135–147. doi:10.1038/nrm3737
- 9) Boya, P., Codogno, P., & Rodríguez-Muela, N. (2018). **Autophagy in stem cells: repair, remodelling and metabolic reprogramming.** *Development*, 145(4), dev146506. doi:10.1242/dev.146506
- 10) Caligioni, C. S. (2009). **Assessing Reproductive Status/Stages in Mice.** *Current Protocols in Neuroscience*. doi:10.1002/0471142301.nsa04is48
- 11) Castro, S. & Covarrubias L. F. (2003). **Capítulo 20: Muerte Celular Programada.** En: Jiménez, L. F. & Merchant, H. (Eds.). *Biología Celular y Molecular*. 1ra edición. México: Pearson Education.
- 12) Chaabane, W., User, S. D., El-Gazzah, M., Jaksik, R., Sajjadi, E., Rzeszowska-Wolny, J., & Łos, M. J. (2012). **Autophagy, Apoptosis,**

- Mitoptosis and Necrosis: Interdependence Between Those Pathways and Effects on Cancer.** *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 61(1), 43–58. doi:10.1007/s00005-012-0205-y
- 13) Chen, Q., Kang, J., & Fu, C. (2018). **The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis.** *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 3(1). doi:10.1038/s41392-018-0018-5
- 14) Cheng, X.-T., Xie, Y.-X., Zhou, B., Huang, N., Farfel-Becker, T., & Sheng, Z.-H. (2018). **Revisiting LAMP1 as a marker for degradative autophagy-lysosomal organelles in the nervous system.** *Autophagy*, 14(8), 1472–1474. doi:10.1080/15548627.2018.1482147
- 15) Chiramel, A., Brady, N., & Bartenschlager, R. (2013). **Divergent Roles of Autophagy in Virus Infection.** *Cells*, 2(1), 83–104. doi:10.3390/cells2010083
- 16) 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. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.11.021
- 17) Christian, C. A., & Moenter, S. M. (2010). **The Neurobiology of Preovulatory and Estradiol-Induced Gonadotropin-Releasing Hormone Surges.** *Endocrine Reviews*, 31(4), 544–577. doi:10.1210/er.2009-0023
- 18) Declercq, W., Vanden Berghe, T., & Vandenabeele, P. (2009). **RIP Kinases at the Crossroads of Cell Death and Survival.** *Cell*, 138(2), 229–232. doi:10.1016/j.cell.2009.07.006
- 19) Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G. D., Mitchison, T. J., Moskowitz, M. A. & Yuan, J. (2005). **Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury.** *Nature Chemical Biology*, 1(2), 112–119. doi:10.1038/nchembio711
- 20) Deretic, V., & Levine, B. (2018). **Autophagy balances inflammation in innate immunity.** *Autophagy*, 14(2), 243–251. doi:10.1080/15548627.2017.1402992
- 21) Dikic, I., & Elazar, Z. (2018). **Mechanism and medical implications of mammalian autophagy.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(6), 349–364. doi:10.1038/s41580-018-0003-4
- 22) Dhuriya, Y. K., & Sharma, D. (2018). **Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death.** *Journal of Neuroinflammation*, 15(1). doi:10.1186/s12974-018-1235-0
- 23) Duprez, L., Wirawan, E., Berghe, T. V., & Vandenabeele, P. (2009). **Major cell death pathways at a glance.** *Microbes and Infection*, 11(13), 1050–1062. doi:10.1016/j.micinf.2009.08.013

- 24) Edson, M. A., Nagaraja, A. K., & Matzuk, M. M. (2009). **The Mammalian Ovary from Genesis to Revelation.** *Endocrine Reviews*, 30(6), 624–712. doi:10.1210/er.2009-0012
- 25) Ellis, H. (1986). **Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*.** *Cell*, 44(6), 817–829. doi:10.1016/0092-8674(86)90004-8
- 26) Elmore, S. (2007). **Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death.** *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. doi:10.1080/01926230701320337
- 27) Eppig, J. J., Wigglesworth, K., & Pendola, F. L. (2002). **The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(5), 2890–2894. doi:10.1073/pnas.052658699
- 28) Escobar, M. L., Echeverría, O. M., Ortíz, 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. doi:10.1007/s10495-008-0248-z
- 29) Escobar, M. L., Echeverría, O. M., Sánchez-Sánchez, L., Méndez, C., Pedernera, E., & Vázquez-Nin, G. H. (2010). **Analysis of different cell death processes of prepubertal rat oocytes in vitro.** *Apoptosis*, 15(4), 511–526. doi:10.1007/s10495-009-0448-1
- 30) Escobar, M. L., Echeverría, O. M., Ortíz, R., & Vázquez-Nin, G. H. (2012). **Immunohistochemical and ultrastructural visualization of different routes of oocyte elimination in adult rats.** *European Journal of Histochemistry*, 56(2), 102-110. doi: 10.4081/ejh.2012.e17
- 31) Escobar, M. L., Echeverria, O. M., & Vazquez-Ni, G. H. (2013). **Role of Autophagy in the Ovary Cell Death in Mammals.** *Autophagy - A Double-Edged Sword - Cell Survival or Death?* doi:10.5772/54777
- 32) Eskelinen, E.-L., Schmidt, C. K., Neu, S., Willenborg, M., Fuertes, G., Salvador, N., Tanaka, Y., Lullmann-Rauch, R., Hartmann, D., Heeren, J., von Figura, K., Knecht, E., & Saftig, P. (2004). **Disturbed Cholesterol Traffic but Normal Proteolytic Function in LAMP-1/LAMP-2 Double-deficient Fibroblasts.** *Molecular Biology of the Cell*, 15(7), 3132–3145. doi:10.1091/mbc.e04-02-0103
- 33) Eskelinen, E.-L., & Saftig, P. (2009). **Autophagy: A lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1793(4), 664–673. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.07.014
- 34) Everett, JW, Sawyer, CH (1950). **A 24-hour periodicity in the “LH-release apparatus” of female rats, disclosed by barbiturate sedation.** *Endocrinology* 47:198-218. doi: 10.1210/endo-47-3-198

- 35) Fass, E., Shvets, E., Degani, I., Hirschberg, K., & Elazar, Z. (2006). **Microtubules Support Production of Starvation-induced Autophagosomes but Not Their Targeting and Fusion with Lysosomes.** *Journal of Biological Chemistry*, 281(47), 36303–36316. doi:10.1074/jbc.m607031200
- 36) Fauser, B. C. J. M., & van Heusden, A. M. (1997). **Manipulation of Human Ovarian Function: Physiological Concepts and Clinical Consequences1.** *Endocrine Reviews*, 18(1), 71–106. doi:10.1210/edrv.18.1.0290
- 37) Fimia, G. M., Stoykova, A., Romagnoli, A., Giunta, L., Di Bartolomeo, S., Nardacci, R., Corazzi, C., Fuoko, A., Ucar, A., Schwartz, P., Gruss, P., Piacentini, K., Chowdhury, K. & Cecconi, F. (2007). **Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system.** *Nature*. doi:10.1038/nature05925
- 38) Fox, R. R. & Laird, C. W. (1970). **Sexual cycles.** En: Hafez, E. S. E. (Ed.). *Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals.* Estados Unidos de América: Lea and Febiger.
- 39) Frasier, C. R., Brown, D. A., Sloan, R. C., Hayes, B., Stewart, L. M., Patel, H. D., Lust, R. M. & Rosenbaum, M. D. (2013). **Stage of the Estrous Cycle Does Not Influence Myocardial Ischemia–Reperfusion Injury in Rats (*Rattus norvegicus*).** *Comparative Medicine*, 63(5), 426–421.
- 40) Fuchs, Y., & Steller, H. (2015). **Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(6), 329–344. doi:10.1038/nrm3999
- 41) Fulda, S., Gorman, A. M., Hori, O., & Samali, A. (2010). **Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death.** *International Journal of Cell Biology*, 2010, 1–23. doi:10.1155/2010/214074
- 42) Galluzzi, L., Baehrecke, E. H., Ballabio, P., Boya, P., Bravo-San Pedro, J. M., Cecconi, F., Choi, A. M., Chu, C. T., Codogno, P., Colombo, M. I., Cuervo, A. M., Debnath, J., Deretic, V., Dikic, I., Eskelinen, E.-L., Fimia, G. M., Fulda, S., Gewirtz, D. A., Verde, D. R., Hansen, M., Harper, J. W., Jäättelä, M., Johansen, T., Juhasz, G., Kimmelman, A. C., Kraft, C., Ktistakis, N. T., Kumar, S., Levine, B., López-Otin, C., Madeo, F., Martens, S., Martinez, J., Meléndez, A., Mizushima, N., Münz, C., Murphy, L. O., Penninger, J. M., Piacentini, M., Reggiori, F., Rubinsztein, D. C., Ryan, K. M., Santambrogio, L., Scorrano, L., Simon, A. K., Simon, H.-U., Simonsen, A., Tavernarakis, N., Tooze, S. A., Yoshimori, T., Yuan, J., Yue, Z., Zhong, Q. & Kroemer, G. (2017). **Molecular definitions of autophagy and related processes.** *The EMBO Journal*, 36(13), 1811–1836. doi:10.15252/emboj.201796697

- 43) Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., , Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazán, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., Blagosklonny, M. V., Blomgren, K., Borner, C., Boya, P., Brenner, C., Campanella, M. Á., Candi, E., Carmona-Gutiérrez, D., Cecconi, F., Chan, F. K.-M., Araña, N. S., Cheng, E. H., Chipuk, J. E., Cidlowski, J. A., Ciechanover, A., Cohen, G. M., Conrad, M., Cubillos-Ruiz, J. R., Czabotar, P. E., D'Angiolella, V., Dawson, T. M., Dawson, V. L., De Laurenzi, V., De Maria, R., Debatin, K.-M., DeBerardinis, R. J., Deshmukh, M., Di Daniele, N., Di Virgilio, F., Dixit, V. M., Dixon, S. J., Duckett, C. S., Dynlacht, B. D., El-Deiry, W. S., Elrod, J. W., Fimia, G. M., Fulda, S., García-Sáez, A. J., Garg, A. D., Garrido, C., gavathiotis, E., Golstein, P., Gottlieb, E., Green, D. R., Greene, L. A., Gronemeyer, H., Gross, A., Hajnoczky, G., Hardwick, J. M., Harris, I. S., Hengartner, M. O., Hetz, C., Ichijo, H., Jäättelä, M., Joseph, B., Jost, P. J., Juin, P. P., Kaiser, W. J., Karin, M., Kaufmann, T., Kepp, O., Kimchi, A., Kitsis, R. N., Klionsky, D. J., Knight, R. A., Kumar, S., Lee, S. W., Lemasters, J. J., Levine, B., Linkermann, A., Lipton, S. A., Lockshin, R. A., López-Otín, C., Lowe, S. W., Luedde, T., Lugli, E., MacFarlane, M., Madeo, F., Malewicz, M., Malorni, W., Manic, G., Marine, J.-C., Martín, S. J., Martinou, J.-C., Medema, J. P., Mehlen, P., Meier, P., Melino, S., Miao, E. A., Molkentin, J. D., Moll, U. M., Muñoz-Pinedo, C., Nagata, S., Nuñez, G., Oberst, A., Oren, M., Overholtzer, M., Pagano, M., Panaretakis, T., Pasparakis, M., Penninger, J. M., Pereira, D. M., Pervaiz, S., Peter, M. E., Piacentini, M., Pinton, P., Prehn, J. HM, Puthalakath, H., Rabinovich, G. A., Rehm, M., Rizzuto, R., Rodrigues, C. MP, Rubinsztein, D. C., Rudel, T., Ryan, K. M., Sayan, E., Scorrano, L., Shao, F., Shi, Y., Silke, J., Simon, H.-U., Sistigu, A., Stockwell, B. R., Strasser, A., Szabadkai, G., Tait, S. WG, Tang, D., Tavernarakis, N., Thorburn, A., Tsujimoto, Y., Turk, B., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., Vander Heiden, M. G., Villunger, A., Virgin, H. W., Vousden, K. H., Vucic, D., Wagner, E. F., Walczak, H., Wallach, D., Wang, Y., Wells, J. A., Wood, W., Yuan, J., Zakeri, Z., Zhivotovsky, B., Zitvogel, L., Melino, G. & Kroemer, G. (2018). **Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018.** *Cell Death & Differentiation*, 25(3), 486–541. doi:10.1038/s41418-017-0012-4
- 44) Gao, H., Khawar, M.B. & Li, W. (2019). **Autophagy in Reproduction.** En: Qin, Z.-H. (Ed.) *Autophagy: Biology and Diseases.* Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 1206. Singapur: Springer.

- 45) Gao, Q. (2019) **Oxidative Stress and Autophagy**. En: Qin, Z. H. (Ed.) *Autophagy: Biology and Diseases*. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 1206. Singapur: Springer.
- 46) Gartner, L. P. & Hiatt, J. L. (2002). **Texto Atlas de Histología**. 2da edición. México: McGraw-Hill Interamericana.
- 47) Gioia, L., Festuccia, C., Colapietro, A., Gloria, A., Contri, A., & Valbonetti, L. (2019). **Abundances of autophagy-related protein LC3B in granulosa cells, cumulus cells, and oocytes during atresia of pig antral follicles**. *Animal Reproduction Science*, 106225. doi:10.1016/j.anireprosci.2019.106225
- 48) Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). **Autophagy: cellular and molecular mechanisms**. *The Journal of Pathology*, 221(1), 3–12. doi:10.1002/path.2697
- 49) Goldman, J. M., Murr, A. S., & Cooper, R. L. (2007). **The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies**. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 80(2), 84–97. doi:10.1002/bdrb.20106
- 50) González-Polo, R. A., Pizarro-Estrella, E., Yakkine-Diop, S. M. S., Rodríguez-Arribas, M., Gómez-Sánchez, R., Casado-Naranjo, I., Bravo-San Pedro, J. M. & Fuentes, J. M. (2016). **The Basics of Autophagy**. En: Maiuri, M. C. & De Stefano, D. (Eds.). *Autophagy Networks in Inflammation*. Suiza: Springer.
- 51) Green, D. R., & Llambi, F. (2015). **Cell Death Signaling**. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(12), a006080. doi:10.1101/cshperspect.a006080
- 52) Gougeon, A. (1996). **Regulation of Ovarian Follicular Development in Primates: Facts and Hypotheses**. *Endocrine Reviews*, 17(2), 121–155. doi:10.1210/edrv-17-2-121
- 53) Gutierrez, M. G., Master, S. S., Singh, S. B., Taylor, G. A., Colombo, M. I., & Deretic, V. (2004). **Autophagy Is a Defense Mechanism Inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis Survival in Infected Macrophages**. *Cell*, 119(6), 753–766. doi:10.1016/j.cell.2004.11.038
- 54) He, C., & Klionsky, D. J. (2009). **Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy**. *Annual Review of Genetics*, 43(1), 67–93. doi:10.1146/annurev-genet-102808-114910
- 55) Heuser, J. (1989). **Changes in lysosome shape and distribution correlated with changes in cytoplasmic pH**. *The Journal of Cell Biology*, 108(3), 855–864. doi:10.1083/jcb.108.3.855
- 56) Hill, R., Wyse, G. A. & Anderson, M. (2006). **Fisiología Animal**. 1ra edición. España. Editorial Médica Panamericana

- 57) Hirshfield, A. N. (1991). **Development of Follicles in the Mammalian Ovary.** *International Review of Cytology*, 43–101. doi:10.1016/s0074-7696(08)61524-7
- 58) Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J.-L., Schneider, P., Seed, B. & Tschopp, J. (2000). **Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule.** *Nature Immunology*, 1(6), 489–495. doi:10.1038/82732
- 59) Hung, C.-M., Garcia-Haro, L., Sparks, C. A., & Guertin, D. A. (2012). **mTOR-Dependent Cell Survival Mechanisms.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(12), a008771–a008771. doi:10.1101/cshperspect.a008771
- 60) Hunziker, W., Simmen, T., and Honing, S. (1996). **Trafficking of lysosomal membrane proteins in polarized kidney cells.** *Nephrologie* 17, 347-350.
- 61) Hułas-Stasiak, M., & Gawron, A. (2011). **Follicular atresia in the prepubertal spiny mouse (*Acomys cahirinus*) ovary.** *Apoptosis*, 16(10), 967–975. doi:10.1007/s10495-011-0626-9
- 62) Ito, N., Ruegg, U., & Takeda, S. (2018). **ATP-Induced Increase in Intracellular Calcium Levels and Subsequent Activation of mTOR as Regulators of Skeletal Muscle Hypertrophy.** *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 2804. doi:10.3390/ijms19092804
- 63) Jahreiss, L., Menzies, F. M., & Rubinsztein, D. C. (2008). **The Itinerary of Autophagosomes: From Peripheral Formation to Kiss-and-Run Fusion with Lysosomes.** *Traffic*, 9(4), 574–587. doi:10.1111/j.1600-0854.2008.00701.x
- 64) Jain, M. V., Paczulla, A. M., Klonisch, T., Dimgba, F. N., Rao, S. B., Roberg, K., Schweizer, F., Lengerke, C., Davoodpour, P., Palicharla, V. R., Maddika, S. & Łos, M. (2013). **Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development.** *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 17(1), 12–29. doi:10.1111/jcmm.12001
- 65) Jan, R., & Chaudhry, G.-S. (2019). **Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics.** *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 9(2), 205–218. doi:10.15171/apb.2019.024
- 66) Jerrell, J. M. (2005). **Behavior and Symptom Identification Scale 32.** *The Journal of Behavioral Health Services & Research*, 32(3), 341–346. doi:10.1097/00075484-200507000-00009
- 67) Jiao, J., & Demontis, F. (2017). **Skeletal muscle autophagy and its role in sarcopenia and organismal aging.** *Current Opinion in Pharmacology*, 34, 1–6. doi: 10.1016/j.coph.2017.03.009

- 68) Jimenez C.M., Calderon M.A., Hernandez N., Jaimovich E., & Radic S.B. (2018). **Extracellular ATP promotes protein synthesis in skeletal muscle through activation of the Akt-mTOR signaling pathway.** *FASEB J*, vol. 32. https://doi.org/10.1096/fasebj.2018.32.1_supplement.856.29
- 69) Jing, K., & Lim, K. (2012). **Why is autophagy important in human diseases?** *Experimental & Molecular Medicine*, 44(2), 69. doi:10.3858/emm.2012.44.2.028
- 70) Jog, N. R., & Caricchio, R. (2014). **The role of necrotic cell death in the pathogenesis of immune mediated nephropathies.** *Clinical Immunology*, 153(2), 243–253. doi: 10.1016/j.clim.2014.05.002
- 71) Johnsen, H. L., & Horvitz, H. R. (2016). **Both the apoptotic suicide pathway and phagocytosis are required for a programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*.** *BMC Biology*, 14(1). doi:10.1186/s12915-016-0262-5
- 72) Johnson, J., Bagley, J., Skaznik-Wikiel, M., Lee, H.-J., Adams, G. B., Niikura, Y., Tschudy, K. S., Tilly, J. C., Cortes, M. L., Forkert, R., Spitzer, T., Iacomini, J., Scadden, D. T. & Tilly, J. L. (2005). **Oocyte Generation in Adult Mammalian Ovaries by Putative Germ Cells in Bone Marrow and Peripheral Blood.** *Cell*, 122(2), 303–315. doi:10.1016/j.cell.2005.06.031
- 73) 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. doi:10.1016/j.febslet.2010.01.017
- 74) Kabeya, Y. (2000). **LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing.** *The EMBO Journal*, 19(21), 5720–5728. doi:10.1093/emboj/19.21.5720
- 75) Kabeya, Y. (2004). **LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation.** *Journal of Cell Science*, 117(13), 2805–2812. doi:10.1242/jcs.01131
- 76) Kaczmarek, A., Vandenabeele, P., & Krysko, D. V. (2013). **Necroptosis: The Release of Damage-Associated Molecular Patterns and Its Physiological Relevance.** *Immunity*, 38(2), 209–223. doi:10.1016/j.immuni.2013.02.003
- 77) Kaniuk, N. A., Kiraly, M., Bates, H., Vranic, M., Volchuk, A., & Brumell, J. H. (2007). **Ubiquitinated-Protein Aggregates Form in Pancreatic-Cells During Diabetes-Induced Oxidative Stress and Are Regulated by Autophagy.** *Diabetes*, 56(4), 930–939. doi:10.2337/db06-1160
- 78) Kaushik, S., & Cuervo, A. M. (2012). **Chaperones in autophagy.** *Pharmacological Research*, 66(6), 484–493. doi:10.1016/j.phrs.2012.10.002
- 79) Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). **Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics.** *British Journal of Cancer*, 26(4), 239–257. doi:10.1038/bjc.1972.33

- 80) Kihara, A., Kabeya, Y., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2001). **Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network.** *EMBO Reports*, 2(4), 330–335. doi:10.1093/embo-reports/kve061
- 81) Kim, P. K., Hailey, D. W., Mullen, R. T., & Lippincott-Schwartz, J. (2008). **Ubiquitin signals autophagic degradation of cytosolic proteins and peroxisomes.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(52), 20567–20574. doi:10.1073/pnas.0810611105
- 82) Kirchner, P., Bourdenx, M., Madrigal-Matute, J., Tiano, S., Diaz, A., Bartholdy, B. A., Will, B. & Cuervo, A. M. (2019). **Proteome-wide analysis of chaperone-mediated autophagy targeting motifs.** *PLOS Biology*, 17(5), e3000301. doi:10.1371/journal.pbio.3000301
- 83) Kirkin, V., Lamark, T., Sou, Y.-S., Bjørkøy, G., Nunn, J. L., Bruun, J.-A., Shvets, E., McEwan, D. G., Clausen, T.H., Wild, P., Bilusic, I., Theurillat, J.P., Øvervatn, A., Ishii, T., Elazar, Z., Komatsu, M., Dikic, I. & Johansen, T. (2009). **A Role for NBR1 in Autophagosomal Degradation of Ubiquitinated Substrates.** *Molecular Cell*, 33(4), 505–516. doi:10.1016/j.molcel.2009.01.020
- 84) Klionsky, D. J. (2007). **Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(11), 931–937. doi:10.1038/nrm2245
- 85) Klionsky, D. J., Baehrecke, E. H., Brumell, J. H., Chu, C. T., Codogno, P., Cuervo, A. M., Debnath, J., Deretic, V., Elazar, Z., Eskelinen, E. L., Finkbeiner, S., Fueyo-Margareto, J., Gewirtz, D., Jäättelä, M., Kroemer, G., Levine, B., Melia, T. J., Mizushima, N., Rubinsztein, D. C., Simonsen, A., Thorburn, A., Thumm, M. & Tooze, S. A. (2011). **A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes (2nd edition).** *Autophagy*. 2011 Nov; 7(11):1273-94. doi: 10.4161/auto.7.11.17661.
- 86) Kono, H., & Rock, K. L. (2008). **How dying cells alert the immune system to danger.** *Nature Reviews Immunology*, 8(4), 279–289. doi:10.1038/nri2215
- 87) Kroemer, G., Galluzzi, L., & Brenner, C. (2007). **Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death.** *Physiological Reviews*, 87(1), 99–163. doi:10.1152/physrev.00013.2006
- 88) Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemari, E. S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V, El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R. Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Núñez, G., Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovskiy, V. & Melino, G. (2009). **Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009.** *Nature*, Vol. 16(1): 3-11

- 89) LaCasse, E. C., Mahoney, D. J., Cheung, H. H., Plenchette, S., Baird, S., & Korneluk, R. G. (2008). **IAP-targeted therapies for cancer.** *Oncogene*, 27(48), 6252–6275. doi:10.1038/onc.2008.302
- 90) Lamb, C. A., Yoshimori, T., & Tooze, S. A. (2013). **The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(12), 759–774. doi:10.1038/nrm3696
- 91) Lavrik, I. (2005). **Death receptor signaling.** *Journal of Cell Science*, 118(2), 265–267. doi:10.1242/jcs.01610
- 92) Lee, J., Park, J.-I., Yun, J. I., Lee, Y., Yong, H., Lee, S. T., Park, C.-K., Hyun, S.-H., Lee, G.-S., & Lee, E. (2015). **Rapamycin treatment during in vitro maturation of oocytes improves embryonic development after parthenogenesis and somatic cell nuclear transfer in pigs.** *Journal of Veterinary Science*, 16(3), 373. doi:10.4142/jvs.2015.16.3.373
- 93) Legan, S. J., & Karsch, F. J. (1975). **A Daily Signal for the LH Surge in the Rat.** *Endocrinology*, 96(1), 57–62. doi:10.1210/endo-96-1-57
- 94) Levine, B., & Klionsky, D. J. (2004). **Development by Self-Digestion.** *Developmental Cell*, 6(4), 463–477. doi:10.1016/s1534-5807(04)00099-1
- 95) Levine, B., & Kroemer, G. (2008). **Autophagy in the Pathogenesis of Disease.** *Cell*, 132(1), 27–42. doi:10.1016/j.cell.2007.12.018
- 96) Li, J., McQuade, T., Siemer, A. B., Napetschnig, J., Moriwaki, K., Hsiao, Y.-S., Damko, E., Moquin, D., Walz, T., McDermott, A., Chan, F. K.-M. & Wu, H. (2012). **The RIP1/RIP3 Necrosome Forms a Functional Amyloid Signaling Complex Required for Programmed Necrosis.** *Cell*, 150(2), 339–350. doi:10.1016/j.cell.2012.06.019
- 97) Li, X., He, S., & Ma, B. (2020). **Autophagy and autophagy-related proteins in cancer.** *Molecular Cancer*, 19(1). doi:10.1186/s12943-020-1138-4
- 98) Liu, W. J., Ye, L., Huang, W. F., Guo, L. J., Xu, Z. G., Wu, H. L., Yang, C., & Liu, H. F. (2016). **p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin–proteasome system upon ubiquitinated protein degradation.** *Cellular & Molecular Biology Letters*, 21(1). doi:10.1186/s11658-016-0031-z
- 99) Liu, X., Yang, W., Guan, Z., Yu, W., Fan, B., Xu, N., & Liao, D. J. (2018). **There are only four basic modes of cell death, although there are many ad-hoc variants adapted to different situations.** *Cell & Bioscience*, 8(1). doi:10.1186/s13578-018-0206-6
- 100) Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M. P., Zipursky S.L. & Darnell J. (2005). **Biología celular y molecular.** 5ta edición. Argentina: Ed. Médica Panamericana.
- 101) Loh, D. H., Kuljis, D. A., Azuma, L., Wu, Y., Truong, D., Wang, H. B., & Colwell, C. S. (2014). **Disrupted Reproduction, Estrous Cycle, and Circadian Rhythms in Female Mice Deficient in Vasoactive Intestinal**

- Peptide.** *Journal of Biological Rhythms*, 29(5), 355–369. doi:10.1177/0748730414549767
- 102) Long, J. A. & Evans, H. M. (1922). **Memories of University of California.** Estados Unidos de América: Prensa de la Universidad de California.
- 103) Loreto, C., La Rocca, G., Anzalone, R., Caltabiano, R., Vespasiani, G., Castorina, S., Ralph, S., Celtek, Musumeci, G., Giunta, S., Djinnovic, Básico, D., & Sansalone, S. (2014). **The Role of Intrinsic Pathway in Apoptosis Activation and Progression in Peyronie’s Disease.** *BioMed Research International*, 2014, 1–10. doi:10.1155/2014/616149
- 104) Luo, S., & Rubinsztein, D. C. (2009). **Apoptosis blocks Beclin 1-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by Bcl-xL.** *Cell Death & Differentiation*, 17(2), 268–277. doi:10.1038/cdd.2009.121
- 105) McGee, E. A., & Hsueh, A. J. W. (2000). **Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles1.** *Endocrine Reviews*, 21(2), 200–214. doi:10.1210/edrv.21.2.0394
- 106) Maeda, K. I., Ohkura, S. & Tsukamura, H. (2000). **Physiology of reproduction.** En: Krinke G. J. (Ed.). *The Laboratory Rat*. 1ra edición. Estados Unidos de América: Academic Press.
- 107) Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A., & Kroemer, G. (2007). **Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(9), 741–752. doi:10.1038/nrm2239
- 108) Manabe, N., Goto, Y., Matsuda-Minehata, F., Inoue, N., Maeda, A., Sakamaki, K., & Miyano, T. (2004). **Regulation Mechanism of Selective Atresia in Porcine Follicles: Regulation of Granulosa Cell Apoptosis during Atresia.** *Journal of Reproduction and Development*, 50(5), 493–514. doi:10.1262/jrd.50.493
- 109) Matsuda, F., Inoue, N., Goto, Y., Maeda, A., Cheng, Y., Sakamaki, K., & Manabe, N. (2008). **cFLIP Regulates Death Receptor-mediated Apoptosis in an Ovarian Granulosa Cell Line by Inhibiting Procaspase-8 Cleavage.** *Journal of Reproduction and Development*, 54(5), 314–320. doi:10.1262/jrd.20051
- 110) Matzuk, M. M. (2002). **Intercellular Communication in the Mammalian Ovary: Oocytes Carry the Conversation.** *Science*, 296(5576), 2178–2180. doi:10.1126/science.1071965
- 111) Merchant-Larios H, Chimal-Monroy J. (1989). **The ontogeny of primordial follicles in the mouse ovary.** *Prog Clin Biol Res*, 296:55–63.
- 112) 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. doi:10.1038/26506

- 113) Mizushima, N. (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. doi:10.1242/jcs.00381
- 114) Mizushima, N., & Klionsky, D. J. (2007). **Protein Turnover Via Autophagy: Implications for Metabolism.** *Annual Review of Nutrition*, 27(1), 19–40. doi:10.1146/annurev.nutr.27.061406.093749
- 115) Mizushima, N., & Komatsu, M. (2011). **Autophagy: Renovation of Cells and Tissues.** *Cell*, 147(4), 728–741. doi:10.1016/j.cell.2011.10.026
- 116) Morais, R. D. V. S., Thomé, R. G., Lemos, F. S., Bazzoli, N., & Rizzo, E. (2012). **Autophagy and apoptosis interplay during follicular atresia in fish ovary: a morphological and immunocytochemical study.** *Cell and Tissue Research*, 347(2), 467–478. doi:10.1007/s00441-012-1327-6
- 117) Moscat, J., & Diaz-Meco, M. T. (2009). **p62 at the Crossroads of Autophagy, Apoptosis, and Cancer.** *Cell*, 137(6), 1001–1004. doi:10.1016/j.cell.2009.05.023
- 118) Myeku, N., & Figueiredo-Pereira, M. E. (2011). **Dynamics of the Degradation of Ubiquitinated Proteins by Proteasomes and Autophagy.** *Journal of Biological Chemistry*, 286(25), 22426–22440. doi:10.1074/jbc.m110.149252
- 119) Nakahira, K., Haspel, J. A., Rathinam, V. A. K., Lee, S.-J., Dolinay, T., Lam, H. C., Englert, J. A., Rabinovitch, M., Cernadas, M., Kim, H. P., Fitzgerald, K. A., Ryter, S. W. & Choi, A. M. K. (2011). **Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome.** *Nature Immunology*, 12(3), 222–230. doi:10.1038/ni.1980
- 120) Nakagawa, I. (2004). **Autophagy Defends Cells Against Invading Group A Streptococcus.** *Science*, 306(5698), 1037–1040. doi:10.1126/science.1103966
- 121) Nezis, I. P., Simonsen, A., Sagona, A. P., Finley, K., Gaumer, S., Contamine, D., Rusten, T. E., Stenmark, H. & Brech, A. (2008). **Ref(2)P, the Drosophila melanogaster homologue of mammalian p62, is required for the formation of protein aggregates in adult brain.** *The Journal of Cell Biology*, 180(6), 1065–1071. doi:10.1083/jcb.200711108
- 122) Nicotera, P., Leist, M., & Manzo, L. (1999). **Neuronal cell death: a demise with different shapes.** *Trends in Pharmacological Sciences*, 20(2), 46–51. doi:10.1016/s0165-6147(99)01304-8
- 123) Orenstein, S. J., & Cuervo, A. M. (2010). **Chaperone-mediated autophagy: Molecular mechanisms and physiological relevance.** *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21(7), 719–726. doi:10.1016/j.semcd.2010.02.005

- 124) Orrenius, S., Nicotera, P., & Zhivotovsky, B. (2011). **Cell Death Mechanisms and Their Implications in Toxicology.** *Toxicological Sciences*, 119(1), 3–19. doi:10.1093/toxsci/kfq268
- 125) Ortiz, R., Echeverría, O. M., Salgado, R., Escobar, M. L., & Vázquez-Nin, G. H. (2006). **Fine structural and cytochemical analysis of the processes of cell death of oocytes in atretic follicles in new born and prepubertal rats.** *Apoptosis*, 11(1), 25–37. doi:10.1007/s10495-005-3347-0
- 126) Pallepati P. & Averill-Bates D. A. (2012). **Reactive oxygen species, cell death signaling and apoptosis.** En: Pantopoulos, K. & Schipper, H. (Eds.). *Princ Free Rad Biomed*, Nova Science Publishers, Inc., Place Published.
- 127) Panaretou, C., Domin, J., Cockcroft, S., & Waterfield, M. D. (1997). **Characterization of p150, an Adaptor Protein for the Human Phosphatidylinositol (PtdIns) 3-Kinase.** *Journal of Biological Chemistry*, 272(4), 2477–2485. doi:10.1074/jbc.272.4.2477
- 128) Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.-A., Outzen, H., Overvatn, A., Bjorkoy, G. & Johansen, T. (2007). **p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy.** *Journal of Biological Chemistry*, 282(33), 24131–24145. doi:10.1074/jbc.m702824200
- 129) Paulini, F., Silva, R. C., de Paula Rôlo, J. L. J., & Lucci, C. M. (2014). **Ultrastructural changes in oocytes during folliculogenesis in domestic mammals.** *Journal of Ovarian Research*, 7(1). doi:10.1186/s13048-014-0102-6
- 130) Parkening, T. A., Collins, T. J., & Smith, E. R. (1982). **Plasma and pituitary concentrations of LH, FSH, and Prolactin in aging C57BL/6 mice at various times of the estrous cycle.** *Neurobiology of Aging*, 3(1), 31–35. doi:10.1016/0197-4580(82)90058-6
- 131) Peters H. & McNatty K. P. (1980). **The Ovary: A Correlation of Structure and Function in Mammals.** In *Morphology of the ovary*. 1ra edición. Great Britain: Granada Publishing
- 132) Picut, C. A., Dixon, D., Simons, M. L., Stump, D. G., Parker, G. A., & Remick, A. K. (2014). **Postnatal Ovary Development in the Rat.** *Toxicologic Pathology*, 43(3), 343–353. doi:10.1177/0192623314544380
- 133) Pistrutto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., & D'Orazi, G. (2016). **Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies.** *Aging*, 8(4), 603–619. doi:10.18632/aging.100934
- 134) Price, D. L. (1998). **Genetic Neurodegenerative Diseases: The Human Illness and Transgenic Models.** *Science*, 282(5391), 1079–1083. doi:10.1126/science.282.5391.1079

- 135) Puissant A, Fenouille N, Auberger P. (2012). **When autophagy meets cancer through p62/SQSTM1**. *Am J Cancer Res*, 2(4):397-413.
- 136) Ravanan, P., Srikumar, I. F., & Talwar, P. (2017). **Autophagy: The spotlight for cellular stress responses**. *Life Sciences*, 188, 53–67. doi:10.1016/j.lfs.2017.08.029
- 137) Redza-Dutordoir, M., & Averill-Bates, D. A. (2016). **Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(12), 2977–2992. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.09.012
- 138) Richards, J. S., & Pangas, S. A. (2010). **The ovary: basic biology and clinical implications**. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(4), 963-972. doi: 10.1172 / JCI41350
- 139) Richardson, S., Senikas, V., & Nelson, J. (1988). **Follicular depletion during the menopausal transition: Evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion**. *Maturitas*, 10(3), 245–246. doi:10.1016/0378-5122(88)90034-5
- 140) Rimon-Dahari N., Yerushalmi-Heinemann L., Alyagor L. & Dekel N. (2016). **Ovarian Folliculogenesis**. Piprek, R. P. (Ed). *Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development*. 1ra edición. Estados Unidos de América: Springer.
- 141) 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. doi:10.1016/j.molcel.2013.12.014
- 142) Ross M. H. & Pawlina W. (2015). **Histología. Texto y Atlas con Biología Celular**. 7ma edición. México: Editorial Médica Panamericana.
- 143) Rubinsztein, D. C., Gestwicki, J. E., Murphy, L. O., & Klionsky, D. J. (2007). **Potential therapeutic applications of autophagy**. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(4), 304–312. doi:10.1038/nrd2272
- 144) Saha, S., Panigrahi, D. P., Patil, S., & Bhutia, S. K. (2018). **Autophagy in health and disease: A comprehensive review**. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 104, 485–495. doi: 10.1016/j.biopha.2018.05.007
- 145) Saftig, P., Beertsen, W., & Eskelinen, E.-L. (2008). **LAMP-2: A control step for phagosome and autophagosome maturation**. *Autophagy*, 4(4), 510–512. doi:10.4161/auto.5724
- 146) Saftig, P. & Klumperman, J. (2009). **Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function**. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(9), 623-635. doi:10.1038/nrm2745
- 147) Sahu, R., Kaushik, S., Clement, C. C., Cannizzo, E. S., Scharf, B., Follenzi, A., Potolicchio, I., Nieves, E., Cuervo, A. M., & Santambrogio, L.

- (2011). **Microautophagy of Cytosolic Proteins by Late Endosomes.** *Developmental Cell*, 20(1), 131–139. doi: 10.1016/j.devcel.2010.12.003
- 148) Sato, J., Nasu, M., & Tsuchitani, M. (2016). **Comparative histopathology of the estrous or menstrual cycle in laboratory animals.** *Journal of Toxicologic Pathology*, 29(3), 155–162. doi:10.1293/tox.2016-0021
- 149) Saumande, J. (1981). **Oogenesis and Folliculogenesis.** *Recl Med Vet*, 157, 29-38.
- 150) Saumande, J. (1991). **Folliculogenesis in Ruminants.** *Recl Med Vet*, 167, 205-218.
- 151) Saxton, R. A., & Sabatini, D. M. (2017). **mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease.** *Cell*, 168(6), 960–976. doi:10.1016/j.cell.2017.02.004
- 152) Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J.-C., & de Murcia, G. (2006). **Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(7), 517–528. doi:10.1038/nrm1963
- 153) Sciarretta, S., Maejima, Y., Zablocki, D., & Sadoshima, J. (2018). **The Role of Autophagy in the Heart.** *Annual Review of Physiology*, 80(1), 1–26. doi:10.1146/annurev-physiol-021317-121427
- 154) Sharp, P. E. & LaRegina, M. C. (1998). **The Laboratory Rat.** 1ra edición. Estados Unidos de Norteamérica: CRC Press.
- 155) Shin, J. (1998). **P62 and the sequestosome, a novel mechanism for protein metabolism.** *Archives of Pharmacal Research*, 21(6), 629–633. doi:10.1007/bf02976748
- 156) Shin, D.-M., Yuk, J.-M., Lee, H.-M., Lee, S.-H., Son, J. W., Harding, C. V., Kim, J.-M., Modlin, R. L. & Jo, E.-K. (2010). **Mycobacterial lipoprotein activates autophagy via TLR2/1/CD14 and a functional vitamin D receptor signalling.** *Cellular Microbiology*, 12(11), 1648–1665. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01497.x
- 157) Shrestha, S., Lee, J. M., & Hong, C.-W. (2020). **Autophagy in neutrophils.** *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 24(1), 1. doi:10.4196/kjpp.2020.24.1.1
- 158) Simonsen, A., & Tooze, S. A. (2009). **Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes.** *The Journal of Cell Biology*, 186(6), 773–782. doi:10.1083/jcb.200907014
- 159) Singh, S. B., Davis, A. S., Taylor, G. A., & Deretic, V. (2006). **Human IRGM Induces Autophagy to Eliminate Intracellular Mycobacteria.** *Science*, 313(5792), 1438–1441. doi:10.1126/science.1129577
- 160) Singh, R., Letai, A., & Sarosiek, K. (2019). **Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi:10.1038 s41580-018-0089-8 /

- 161) Suckow, M. A., Weisbroth, S. H. & Franklin, C. L. (2005). **The Laboratory Rat**. 2da edición. Inglaterra: Elsevier.
- 162) Sun, L., Wang, H., Wang, Z., He, S., Chen, S., Liao, D., Wang, L., Yan, J., Liu, W., Lei, X. & Wang, X. (2012). **Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein Mediates Necrosis Signaling Downstream of RIP3 Kinase**. *Cell*, 148(1-2), 213–227. doi:10.1016/j.cell.2011.11.031
- 163) Syntichaki, P. & Tavernarakis, N. (2003). **Death by necrosis: Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos?** *EMBO Reports*, 3(7), 604–609. doi:10.1093/embo-reports/kvf138
- 164) Tallóczy, Z., Virgin, IV, H., & Levine, B. (2006). **PKR-Dependent Xenophagic Degradation of Herpes Simplex Virus Type 1**. *Autophagy*, 2(1), 24–29. doi:10.4161/auto.2176
- 165) 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. doi:10.1074/jbc.c000752200
- 166) 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. doi:10.1074/jbc.m200385200
- 167) Tanida, I., Ueno, T., & Kominami, E. (2004). **Human Light Chain 3/MAP1LC3B Is Cleaved at Its Carboxyl-terminal Met121 to Expose Gly120 for Lipidation and Targeting to Autophagosomal Membranes**. *Journal of Biological Chemistry*, 279(46), 47704–47710. doi:10.1074/jbc.m407016200
- 168) Tassa, A., Roux, M. P., Attaix, D., & Bechet, D. M. (2003). **Class III phosphoinositide 3-kinase–Beclin1 complex mediates the amino acid-dependent regulation of autophagy in C2C12 myotubes**. *Biochemical Journal*, 376(3), 577–586. doi:10.1042/bj20030826
- 169) Tekirdag, K., & Cuervo, A. M. (2018). **Chaperone-mediated autophagy and endosomal microautophagy: Jointed by a chaperone**. *Journal of Biological Chemistry*, 293(15), 5414–5424. doi:10.1074/jbc.r117.818237
- 170) Thompson, H. G. R., Harris, J. W., Wold, B. J., Lin, F., & Brody, J. P. (2003). **p62 overexpression in breast tumors and regulation by prostate-derived Ets factor in breast cancer cells**. *Oncogene*, 22(15), 2322–2333. doi:10.1038/sj.onc.1206325
- 171) Thornberry, N. A. & Laxebnik, Y. (1998). **Caspases: Enemies Within**. *Science*, 281(5381), 1312–1316. doi:10.1126/science.281.5381.1312

- 172) Tilly, J. L. (2001). **Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(11), 838–848. doi:10.1038/35099086
- 173) Trump, B. F., Goldblatt, P. J., Stowell, R. E. (1965). **Studies of necrosis in vitro of mouse hepatic parenchymal cells. Ultrastructural alterations in endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, plasma membrane, and lipid droplets.** *Lab Invest.* 14(11):2000-2028.
- 174) Tsujimoto, Y., & Shimizu, S. (2006). **Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death.** *Apoptosis*, 12(5), 835–840. doi:10.1007/s10495-006-0525-7
- 175) Turek, F. W., Swann, J., & Earnest, D. J. (1984). **Role of the Circadian System in Reproductive Phenomena.** *Proceedings of the 1983 Laurentian Hormone Conference*, 143–183. doi:10.1016/b978-0-12-571140-1.50009-8
- 176) Valentich M. A., Eynard A. R. & Rovasio A. (2008). **Sistema reproductor femenino.** En: Eynard, A. R., Valentich, M. A. & Rovasio, R. A. (Eds.). *Histología del ser humano: bases celulares y moleculares.* 4ta edición. Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- 177) Vantman, D. B., & Vega, M. B. (2010). **Fisiología reproductiva y cambios evolutivos con la edad de la mujer.** *Revista Médica Clínica Las Condes*, 21(3), 348–362. doi:10.1016/s0716-8640(10)70545-9
- 178) Walker, N. I., Harmon, B. V., Gobé, G.C., Kerr, J. F. (1988). **Patterns of cell death.** *Methods Achiev Exp Pathol*, 13: 18-54.
- 179) Walmer, D. K. (1992). **Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: correlation with circulating estradiol and progesterone.** *Endocrinology*, 131(3), 1458–1466. doi:10.1210/en.131.3.1458
- 180) Wang, L., Du, F., & Wang, X. (2008). **TNF- α Induces Two Distinct Caspase-8 Activation Pathways.** *Cell*, 133(4), 693–703. doi:10.1016/j.cell.2008.03.036
- 181) Wang, T., Jin, Y., Yang, W., Zhang, L., Jin, X., Liu, X., He, Y. & Li, X. (2017). **Necroptosis in cancer: An angel or a demon?** *Tumor Biology*, 39(6), 101042831771153. doi:10.1177/1010428317711539
- 182) Welsch, U. & Sobotta, J. (2008). **Histología.** 2da edición. España: Editorial Médica Panamericana.
- 183) White, E. (2012). **Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer.** *Nature Reviews Cancer*, 12(6), 401–410. doi:10.1038/nrc3262
- 184) Wong, A. S. L., Cheung, Z. H., & Ip, N. Y. (2011). **Molecular machinery of macroautophagy and its deregulation in diseases.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1812(11), 1490–1497. doi:10.1016/j.bbadis.2011.07.005

- 185) Wong, R. S. (2011). **Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment.** *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30(1), 87. doi:10.1186/1756-9966-30-87
- 186) Xie, Z., Nair, U., & Klionsky, D. J. (2008). **Atg8 Controls Phagophore Expansion during Autophagosome Formation.** *Molecular Biology of the Cell*, 19(8), 3290–3298. doi:10.1091/mbc.e07-12-1292
- 187) Xu, G., & Shi, Y. (2007). **Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis.** *Cell Research*, 17(9), 759–771. doi:10.1038/cr.2007.52
- 188) 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). doi:10.1186/s12929-018-0438-0
- 189) Yang, L., Li, P., Fu, S., Calay, E. S., & Hotamisligil, G. S. (2010). **Defective Hepatic Autophagy in Obesity Promotes ER Stress and Causes Insulin Resistance.** *Cell Metabolism*, 11(6), 467–478. doi:10.1016/j.cmet.2010.04.005
- 190) Yang, Z., Wilkie-Grantham, R. P., Yanagi, T., Shu, C.-W., Matsuzawa, S., & Reed, J. C. (2015). **ATG4B (Autophagin-1) Phosphorylation Modulates Autophagy.** *Journal of Biological Chemistry*, 290(44), 26549–26561. doi:10.1074/jbc.m115.658088
- 191) Yip, C. K., Murata, K., Walz, T., Sabatini, D. M., & Kang, S. A. (2010). **Structure of the Human mTOR Complex I and Its Implications for Rapamycin Inhibition.** *Molecular Cell*, 38(5), 768–774. doi:10.1016/j.molcel.2010.05.017
- 192) Yu, L., Chen, Y., & Tooze, S. A. (2018). **Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms.** *Autophagy*, 14(2), 207–215. doi:10.1080/15548627.2017.1378838
- 193) Zaffagnini, G., & Martens, S. (2016). **Mechanisms of Selective Autophagy.** *Journal of Molecular Biology*, 428(9), 1714–1724. doi:10.1016/j.jmb.2016.02.004
- 194) Zhang, X., Chen, S., Huang, K., & Le, W. (2013). **Why should autophagic flux be assessed?** *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(5), 595–599. doi:10.1038/aps.2012.184
- 195) Zhang, J. (2015). **Teaching the basics of autophagy and mitophagy to redox biologists—Mechanisms and experimental approaches.** *Redox Biology*, 4, 242–259. doi:10.1016/j.redox.2015.01.003
- 196) 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. doi:10.3390/ani9121111

- 197) Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P., & Tschopp, J. (2011). **A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation.** *Nature*, 469(7329), 221–225. doi:10.1038/nature09663
- 198) Zhou, J., Peng, X., & Mei, S. (2019). **Autophagy in Ovarian Follicular Development and Atresia.** *International Journal of Biological Sciences*, 15(4), 726–737. doi:10.7150/ijbs.30369
- 199) Zimmermann, K. C., & Green, D. R. (2001). **How cells die: Apoptosis pathways.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108(4), S99–S103. doi:10.1067/mai.2001.117819
- 200) Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., & Wang, X. (1997). **Apaf-1, a Human Protein Homologous to C. elegans CED-4, Participates in Cytochrome c-Dependent Activation of Caspase-3.** *Cell*, 90(3), 405–413. doi:10.1016/s0092-8674(00)80501-2
- 201) Zou, H., Li, Y., Liu, X., & Wang, X. (1999). **An APAF-1-Cytochrome c Multimeric Complex Is a Functional Apoptosome That Activates Procaspase-9.** *Journal of Biological Chemistry*, 274(17), 11549–11556. doi:10.1074/jbc.274.17.11549