



TRABAJO FIN DE GRADO

**PAPEL DE mTOR Y AMPK EN LA  
REGULACIÓN DEL PROCESO DE  
AUTOFAGIA**

Paula Navarro de Salas

Sevilla, Julio 2021





Universidad de Sevilla



Facultad de Farmacia

## Trabajo Fin de Grado

Grado en Farmacia

# PAPEL DE mTOR Y AMPK EN LA REGULACIÓN DEL PROCESO DE AUTOFAGIA

Paula Navarro de Salas

Facultad de Farmacia

Departamento de Bioquímica

Tutor: Alberto García Quintanilla

Revisión bibliográfica

## ABREVIATURAS

**A $\beta$** :  $\beta$ -amiloide

**ADP**: Adenosin difosfato

**AMBRA-1**: Regulador 1 de autofagia y Beclin1

**AMPK**: Proteína quinasa activada por AMP

**Akt (o PKB)**: Proteína kinasa B

**ATG**: Proteína relacionada con la autofagia

**ATP**: Adenosin trifosfato

**Bcl-2**: Proteína de linfoma de célula B2

**CAMKK2**: Calcio calmodulina quinasa 2

**DEPTOR**: Dominio DEP que interacciona con mTOR

**FAK**: Quinasa de adhesión local

**FIP200**: Proteína de interacción con la familia de las FAK de 200 kDa

**LAMP-2A**: Proteína de membrana asociada al lisosoma 2<sup>a</sup>

**LC3**: Cadena ligera 3 de la proteína asociada a microtúbulo

**LKB1**: Quinasa B1 del hígado

**mLST8**: Subunidad letal de mamíferos con proteína SEC 13 8

**mSIN1**: Proteína quinasa activada por estrés de mamífero que interactúa con la proteína 1

**mTOR**: Diana de rapamicina de mamíferos

**mTORC1/2**: Complejo 1/2 de mTOR

**PE**: Fosfatidiletanolamina

**PIP2/3**: Fosfatidil-Inositol- (2/3)- Fosfato

**PI3K**: Fosfatidil-inositol-3 kinasa

**PP2A:** Proteína fosfatasa 2A

**PRAS40:** Sustrato rico en prolina de Akt/PKB de 40 kDa

**RAPTOR:** Proteína asociada a la regulación de mTORC1

**Rictor:** Componente rapamicina-insensible de mTOR

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno

**S6K1:** Proteína ribosómica S6 quinasa

**ULK1:** Quinasa activadora de autofagia unc-51 tipo 1

**UPR:** Respuesta a proteína mal plegada

## RESUMEN

La autofagia juega un importante rol en el mantenimiento y la supervivencia celular, ya que es un proceso catabólico de degradación celular que permite el reciclaje de los componentes celulares para mantener la homeostasis celular. Amplios estudios han demostrado que hay una gran cantidad de genes y moléculas implicados en este proceso, y se ha visto el papel tan importante que juegan las moléculas mTOR y AMPK en la regulación de este proceso. Una desregularización en el proceso de la autofagia se relaciona con enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer (EA), entre otras. En la EA se ha demostrado que la actividad de la autofagia está disminuida, provocando la acumulación de vesículas autofágicas en neuronas.

La proteína quinasa activada por AMP (AMPK) tiene funciones críticas en la regulación del crecimiento, y recientemente se ha relacionado con procesos celulares como la autofagia. La autofagia es promovida por la AMPK, un sensor de energía clave que regula el metabolismo celular para mantener la homeostasis energética en situaciones de deficiencia de ATP. Su activación produce un aumento de la autofagia en neuronas, por lo que se ha demostrado que mejora los síntomas de la demencia. Por el contrario, la autofagia es inhibida por la diana de la rapamicina en los mamíferos (mTOR), la cual está formada por un conjunto de proteínas que se encargan de controlar procesos anabólicos del organismo como la síntesis de proteínas. Un exceso de activación de mTOR puede llevar a enfermedades como EA.

En esta revisión bibliográfica se resumen los términos generales que engloban al proceso de la autofagia, sus etapas, así como los métodos de detección más característicos y nos adentramos en la señalización y regulación que se lleva a cabo en este proceso a través de sus moléculas más destacables mTOR y AMPK.

**PALABRAS CLAVE:** autofagia, mTOR, AMPK, metabolismo, enfermedad de Alzheimer.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>8</b>
<b>2. OBJETIVOS DE LA REVISIÓN</b> .....	<b>10</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>10</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>10</b>
<b>3. METODOLOGÍA</b> .....	<b>11</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>12</b>
<b>4.1. AUTOFAGIA</b> .....	<b>12</b>
<b>4.2. TIPOS DE AUTOFAGIA</b> .....	<b>12</b>
<b>4.3. TÉCNICAS DE MONITORIZACIÓN DE AUTOFAGIA</b> .....	<b>14</b>
4.3.1. MICROSCOPÍA DE TRANSMISIÓN ELECTRÓNICA.....	14
4.3.2. LC3/ATG8 .....	15
4.3.3. MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA .....	16
4.3.4. LC3-I/LC3-II MEDIANTE INMUNOTRANSFERENCIA .....	16
4.3.5. ENSAYO DE RENOVACIÓN DE LC3 .....	16
4.3.6. DEGRADACIÓN DE SUSTRATOS SELECTIVOS PARA LA AUTOFAGIA: LC3 Y P62.....	17
4.3.7. DETECCIÓN DE FRAGMENTOS GFP .....	17
4.3.8. ENSAYO DE DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS DE LARGA DURACIÓN .....	17
<b>4.4. MECANISMOS MOLECULARES DE AUTOFAGIA</b> .....	<b>18</b>
<b>4.5. REGULACIÓN DEL PROCESO DE AUTOFAGIA</b> .....	<b>20</b>
4.5.1. MTOR .....	21
4.5.2. AMPK .....	27
<b>4.6. DESREGULARIZACIÓN DE LA VÍA MTOR/AMPK Y SU IMPLICACIÓN EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA)</b> .....	<b>29</b>
<b>5. CONCLUSIÓN</b> .....	<b>33</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>34</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

La palabra autofagia significa comer (fagia) propio (auto) y fue acuñada por primera vez en 1963 por Christian de Duve, cuando él y sus colaboradores observaron al microscopio electrónico fragmentos de orgánulos en el interior de lisosomas. Descubrieron este proceso después de que los componentes citoplasmáticos quedasen envueltos por el lisosoma, e identificaron una nueva vesícula que transporta la carga a éste: el autofagosoma (de Duve et al., 1966).

La autofagia, es un proceso beneficioso ya que permiten que los orgánulos y las macromoléculas dañadas se degraden y reciclen dentro de la célula (Lapierre et al., 2015).

Algunos hechos históricos relacionados con el descubrimiento y el proceso de la autofagia se resumen: En 1963, Christian de Duve describió por primera vez la autofagia describiéndolo como el proceso de degradación que se produce después de que los componentes citoplasmáticos queden envueltos por el lisosoma e identificó una nueva vesícula que transporta carga a éste, el autofagosoma.

En la década de los 90, la investigación de la autofagia floreció después de que el equipo del Dr. Yoshinori Ohsumi identificara los genes importantes relacionados con las mutaciones defectuosas de la autofagia en levaduras, llamados genes relacionados con la autofagia (ATG) y su proteína relacionada.

Poco después, se hicieron avances en la investigación que se centraron en los aspectos genéticos y varias proteínas ATG, lo que permitió comprender mejor la función y los mecanismos de la autofagia.

Recientemente, la autofagia ha sido ampliamente estudiada no solo en levaduras y modelos animales, si no también en procesos fisiopatológicos humanos. En 2016, Yoshinori Ohsumi recibió el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en reconocimiento a su trabajo para sentar las bases para una mejor comprensión de la capacidad de las células para controlar el hambre, el estrés y las enfermedades (Lin et al., 2019).

La autofagia es un proceso intracelular catabólico conservado evolutivamente, y finamente regulado para el reciclaje de materiales citoplasmáticos (proteínas, lípidos, carbohidratos) y para la degradación de orgánulos dañados (mitocondrias, retículos endoplasmático y peroxisomas), cuya acumulación puede ser tóxica para las células. De esta forma, se garantiza la renovación y el buen funcionamiento de los orgánulos intracelulares. En los lisosomas, la autofagia determina: el reciclaje de las porciones celulares que aún se pueden utilizar, la reducción de los desechos celulares, la protección y el mantenimiento de la energía y la adaptación celular a los desafíos ambientales, en resumen, todos los procesos que contribuyen a la supervivencia

celular. Por tanto, la autofagia es principalmente un mecanismo citoprotector y su desregulación puede ser la causa de la aparición de patologías que pueden afectar al hígado, corazón, cerebro, miopatías, diabetes, obesidad y cáncer (Maiuolo et al., 2021). Entre estas enfermedades, se encuentra la enfermedad de Alzheimer (EA). La EA es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que se caracteriza por la deposición de placas neuríticas que contienen péptido beta amiloide y ovillos neurofibrilares compuestos de proteína tau hiperfosforilada. Sin embargo, los detalles moleculares de la patogénesis de la EA necesitan ser aclarados, aunque se asocian con varias anomalías neuronales en el metabolismo energético. Por tanto, teniendo en cuenta las propiedades de AMPK y mTOR, estas anomalías podrían estar relacionadas con posibles defectos funcionales en la señalización de ambos (Salminen et al., 2011).

## **2. OBJETIVOS DE LA REVISIÓN**

### **OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general de este trabajo consiste en dar una visión general sobre el reciclaje celular, o lo que es lo mismo la autofagia, y dentro de este proceso el papel que juegan las moléculas AMPK y mTOR en su regulación.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Los objetivos específicos son los siguientes:

- Describir de forma general la autofagia y su clasificación.
- Describir las técnicas principales utilizadas para su estudio y monitorización.
- Conocer y estudiar las rutas de señalización de la autofagia.
- Comprender el control de la autofagia a través de mTOR y AMPK.
- Describir enfermedades neurodegenerativas donde la autofagia está desregulada.

### 3. METODOLOGÍA

La metodología usada para llevar a cabo esta revisión ha consistido en una búsqueda bibliográfica muy extensa de las mejores bases de datos de fuentes de información científicas como PubMed, Medline y ScienceDirect, revistas especializadas como Nature o Science, de varias tesis doctorales donde se abordan los temas a tratar y de libros de texto de la Universidad de Sevilla. A partir de esta búsqueda y del material encontrado con ello, se seleccionó la información de las revisiones y los artículos originales más relevantes en los últimos 10 años. He partido de artículos y revisiones actuales que nos han llevado en alguna ocasión a información algo más antigua.

En la búsqueda se ha jugado con la combinación de palabras claves y filtros que han sido vitales para obtener la bibliografía. “mTOR and AMPK regulation”, “autophagy”, “Types of autophagy”, “pathways of mTOR and AMPK”, “monitoring autophagy”. Se ha realizado casi en su totalidad en inglés, por ser el idioma en el que más información hay sobre el tema, exceptuando algunas tesis doctorales escritas en español.

Después de buscar toda esta información, vi que muchos artículos científicos relacionaban la desregularización del proceso de autofagia con la aparición de enfermedades. A partir de aquí, realicé nuevas búsquedas para introducir un último punto relacionando ambos temas. Para ello, jugué con palabras claves como “mTOR and Alzheimer’s diseases”, “Autophagy and diseases”, “dysregulation AMPK”.

Por último, hago una mención especial al profesor Diego Ruano Caballero, el cual ha participado en la elaboración de las guías para el uso y la interpretación de los ensayos de monitorización de la autofagia.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. AUTOFAGIA

La autofagia es un proceso fisiológico celular catabólico por el cual las proteínas y otros orgánulos citoplasmáticos son envueltos en vesículas lisosómicas para su degradación y posterior utilización de sus componentes y monómeros.

En general, la autofagia, puede dirigirse a la degradación de los componentes celulares a granel o de manera selectiva. Los ejemplos de este último incluyen la degradación selectiva de agregados de proteínas (agrefagia), mitocondrias (mitofagia), lisosomas (lisofagia) y ribosomas (ribofagia). Sin embargo, la forma más estudiada de la autofagia es la macroautofagia (Wong et al., 2020).

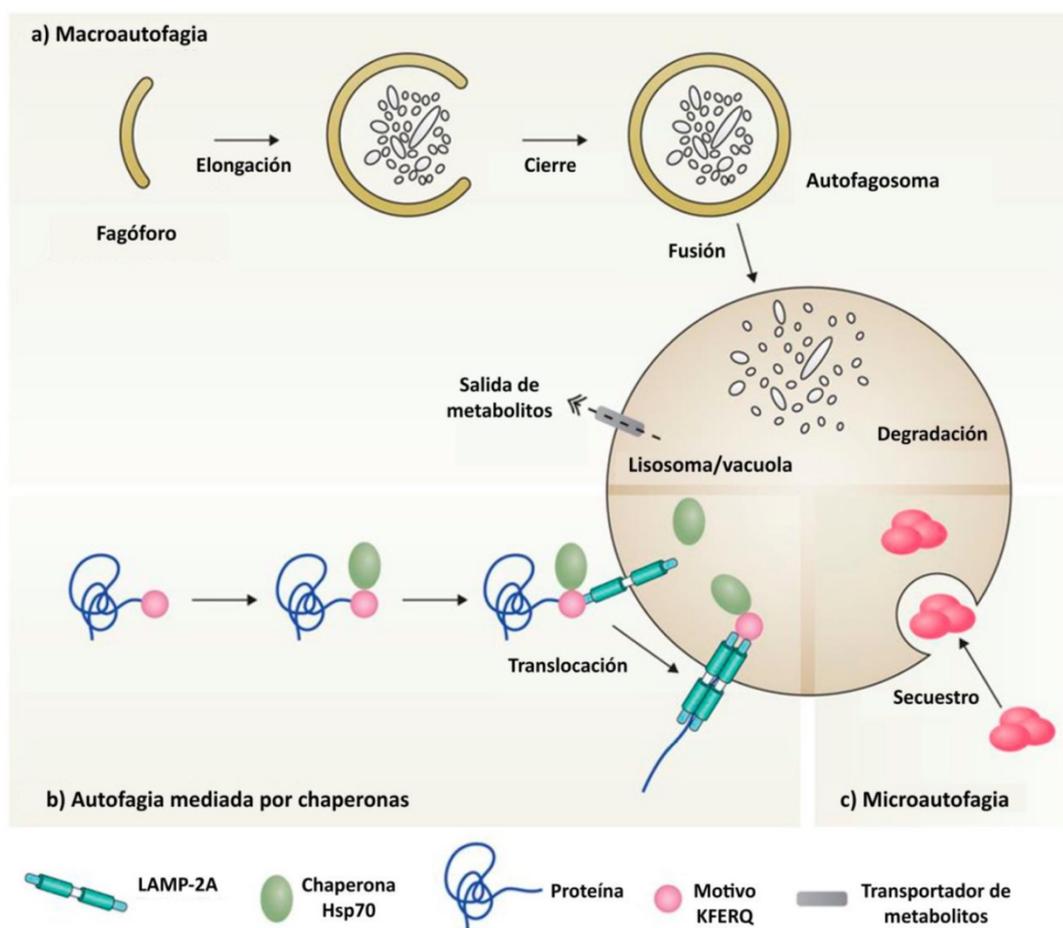
La autofagia es un proceso muy dinámico y regulado, su actividad suele ser bajo condiciones basales, pero puede aumentar notablemente por estímulos como la privación de nutrientes, hipoxia, estrés celular, infecciones y agentes farmacológicos como la rapamicina. Los defectos en la autofagia están asociados a una serie de trastornos como cáncer, neurodegeneración, enfermedades musculares e inflamación.

### 4.2. TIPOS DE AUTOFAGIA

Dependiendo del mecanismo por el cual la carga a degradar es llevada al lisosoma, podemos hablar de distintos tipos de autofagia en mamíferos, macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas (CMA):

- Macroautofagia: Este proceso comienza con la formación de novo, proveniente del RE, la membrana plasmática o el aparato de Golgi, de una estructura llamada fagoforo que va creciendo alrededor del componente celular a degradar hasta formar una vesícula de doble membrana, el autofagosoma. El autofagosoma puede recibir vesículas desde los endosomas o puede llegar a fusionarse directamente con ellos. Estos aportan proteínas lisosomales y bombas de protones, lo que provoca la acidificación del fagosoma. Al compartimento resultante se le denomina anfisoma. Como último paso, el anfisoma es transportado hasta el lisosoma donde se fusiona para formar el autofagolisosoma, que es el responsable de degradar el contenido (García, 2016).

- **Microautofagia:** En este caso, es el propio lisosoma el que, por invaginaciones de la membrana, secuestra áreas del citosol donde se encuentra el contenido, sin vesículas intermedias (Kaur et al., 2015).
- **Autofagia mediada por chaperonas (CMA):** Mediante este proceso, las proteínas pueden dirigirse desde el citosol a la membrana lisosomal, donde el receptor de membrana reconoce la secuencia KFERQ que presentan algunas proteínas solubles capaz de desplegarse y luego acceder a la luz de este orgánulo cruzando directamente la membrana, gracias a un transportador localizado en la membrana del lisosoma (LAMP-2A), para llevar a cabo su degradación (Cuervo et al., 2014).



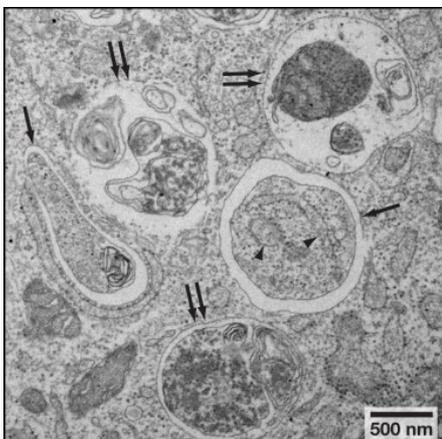
**Figura 1. Tipos de autofagia.** A) La macroautofagia se caracteriza por la formación de vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas que dirigen el contenido citoplasmático al lisosoma para su degradación. B) En la autofagia mediada por chaperonas, las proteínas se unen a unas chaperonas y se translocan al interior del lisosoma al ser reconocidas por la proteína de membrana asociada al lisosoma 2A (LAMP-2A). C) En la microautofagia, los componentes citoplasmáticos son secuestrados directamente por el lisosoma (Ortiz, 2019).

### 4.3. TÉCNICAS DE MONITORIZACIÓN DE AUTOFAGIA

Existen diversas técnicas de análisis para estudiar la activación, la inhibición o la alteración del flujo autofágico. Para ello se usan marcadores específicos como LC3-II, P62 o NBR1, ya que estos complejos pasarán a formar parte del contenido citoplasmático a eliminar del lisosoma. Se debe distinguir entre aumento o reducción del número de eventos autofágicos y el incremento o disminución del flujo autofágico. Esta distinción se efectúa usando inhibidores de fusión o degradación lisosomal. Ambos aspectos deben ser siempre comparados con el nivel basal de autofagia en el sistema estudiado, el cual debe ser previamente definido en condiciones carentes de estímulos. A continuación, se describen las principales metodologías en uso para estudiar la autofagia, recogidas en el artículo de (Klionsky et al., 2016):

#### 4.3.1. MICROSCOPIA DE TRANSMISIÓN ELECTRÓNICA

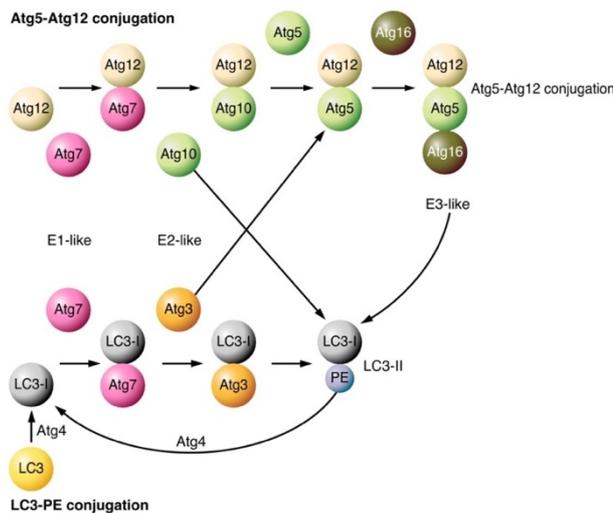
El proceso de la autofagia fue descrito por primera vez por el microscopio de transmisión electrónica (TEM) hace aproximadamente 50 años y sigue siendo una de las técnicas más utilizadas y sensibles para detectar la presencia de vesículas autofágicas. Las estructuras formadas durante la autofagia, como el fagoforo y el autofagosoma se pueden identificar mediante microscopía electrónica. TEM es un método cualitativo de identificación de compartimentos autofágicos tempranos (autofagosomas) que contienen el citosol u otros orgánulos morfológicamente intactos u orgánulos de las últimas etapas de la autofagia, que se caracterizan por contener autolisosomas con el citosol y otros orgánulos parcialmente degradados. Este método, sin embargo, requiere de un trabajador experimentado capaz de identificar y definir estas características estructurales. También cabe señalar que es muy difícil realizar mediciones cuantitativas (Barth et al., 2010) (Klionsky et al., 2016).



**Figura 2. Morfología de autofagosomas y autolisosomas.** Análisis al microscopio electrónico de fibroblastos embrionarios de ratón privados de nutrientes. Las flechas indican autofagosomas y las flechas dobles indican autolisosomas. Las puntas de flecha indican fragmentos de retículos endoplasmáticos dentro del autofagosoma (Mizushima et al., 2010).

### 4.3.2. LC3/ATG8

Aunque la cuantificación de autofagosomas y autolisosomas por microscopía electrónica puede ayudar a identificar el estado del flujo autofágico, no proporciona evidencia directa sobre la degradación del sustrato autofágico en los lisosomas. Por lo tanto, la microscopía electrónica no se recomienda como método clásico para un ensayo de "flujo autofágico" (Zhang et al., 2013). Muchos ensayos moleculares permiten un enfoque más cuantitativo para monitorear la autofagia. Fundamental para estos enfoques ha sido la detección de LC3-II como lectura celular de los niveles de autofagia. En la fase de elongación del fagoforo, están involucrados dos sistemas de unión a proteínas similares a la ubiquitina: el complejo ATG12-ATG5-ATG16 y el conjugado de proteína 1 de cadena ligera (LC3) – fosfatidiletanolamina (PE) asociada a microtúbulos. Dos reacciones tipo ubiquitina están involucradas en la elongación de la estructura pre-autofagosomal. En la primera reacción la proteína ATG12 se une covalentemente a la proteína ATG5, previamente ATG12 es activada por ATG7 (similar a E1) y transferida a ATG10 (similar a E2). Finalmente, ATG12 es unida por el extremo -COOH terminal de la glicina a ATG5, dando lugar al complejo ATG12-ATG5 (Ravikumar et al., 2010). Éste complejo interacciona con ATG16, dando lugar al complejo multimérico ATG12-ATG5-ATG16 (Tanida I., 2011). En la segunda reacción tipo ubiquitina, participan las proteínas ATG3, ATG4 y ATG7 y catalizan la activación y conjugación de membrana de los modificadores de la autofagia tipo ubiquitina (ATG8). El proceso de conjugación comienza con la proteasa ATG4, ya que, LC3 es sintetizada como pro-LC3, y esta proteasa la escinde a la forma LC3-I y expone el extremo C-terminal de la glicina para la posterior reacción de conjugación. LC3-I es activada por ATG7 y transferida a ATG3 para ser conjugada con PE, formando LC3-II (Grumati et al., 2018). LC3-I se localiza en el citosol, mientras que LC3-II en el autofagosoma (Yukiko et al., 2000).



**Figura 3. Reacciones similares de ubiquitina durante la elongación (Ravikumar et al., 2010).**

Por tanto, teniendo en cuenta la importancia del procesamiento de LC3 para la formación y fusión del autofagosoma, éste es usado por distintas técnicas de monitorización, descritas a continuación, para detectar tanto el número de autofagosomas como el flujo autofágico:

#### 4.3.3. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Después de la fusión con el lisosoma, LC3 de la membrana externa (LC3-II) es escindida por ATG4 y LC3 de la membrana interna (LC3-I) es degradada por enzimas lisosomales, lo que da como resultado un contenido de LC3 muy bajo en el autolisosoma. Por lo tanto, LC3 endógena o GFP-LC3 se visualiza mediante microscopía de fluorescencia como un grupo citoplasmático difuso o como estructuras puntiformes que representan principalmente autofagosomas.

Aunque el número de estructuras puntiformes de LC3 o GFP-LC3 por célula suele ser una medida precisa del número de autofagosomas, este ensayo tiene algunas dificultades experimentales potenciales. El número de estructuras puntiformes puede contarse visualmente por un profesional experimentado o determinarse automáticamente utilizando programas de análisis de imágenes. Aunque el número de puntos aumenta notablemente después de la inducción de la autofagia, también se observan pequeñas cantidades de puntos incluso en condiciones normales.

#### 4.3.4. LC3-I/LC3-II MEDIANTE INMUNOTRANSFERENCIA

LC3-I y LC3-II se pueden distinguir fácilmente en función de su distinta movilidad electroforética en geles de poliacrilamida con docecilsulfato sódico como el gel SDS-PAGE. A pesar del mayor peso molecular de LC3-I (PM aparente es 16 kD), LC3-II (PM aparente es 14 kD) migra más rápidamente en SDS-PAGE en comparación con LC3-I, debido a una mayor hidrofobicidad asociada con el grupo PE (Barth et al., 2010).

#### 4.3.5. ENSAYO DE RENOVACIÓN DE LC3

La degradación de LC3-II dentro del autolisosoma puede detectarse en ausencia o presencia de inhibidores de degradación lisosomal. Si las células se tratan con reactivos lisosomotrópicos como cloruro de amonio, cloroquina o bafilomicina A1, que inhiben la acidificación dentro del lisosoma o la fusión autofagosoma-lisosoma, o si se tratan con inhibidores de proteasas lisosomales como E64d y pepstatina A, la degradación de LC3-II se bloquea, lo que da como resultado una acumulación de LC3-II.

En consecuencia, las diferencias en la cantidad de LC3-II entre muestras en presencia y ausencia de inhibidores lisosomales representan la cantidad de LC3 que se entrega a los lisosomas para su degradación, es decir, flujo autofágico (Ju et al., 2010) (Zhang et al., 2013). Hay que tener en cuenta que los inhibidores de lisosomas tienen mayor afinidad por LC3-II, por tanto, la relación LC3-I/LC3-II no debe usarse como indicador del flujo autofágico.

#### 4.3.6. DEGRADACIÓN DE SUSTRATOS SELECTIVOS PARA LA AUTOFAGIA: LC3 Y P62

Clásicamente, la autofagia se consideraba un sistema de degradación aleatorio, pero estudios recientes han revelado que varios sustratos específicos se degradan preferentemente mediante autofagia, de los cuales, el ejemplo mejor estudiado es p62 (también conocido como SQSTM1). p62 se incorpora selectivamente en los autofagosomas a través de la unión directa a LC3 y se degrada eficazmente por autofagia; por tanto, los niveles de expresión celular total de p62 se correlacionan inversamente con la actividad autofágica (Ramirez-Sagrado et al., 2016)

#### 4.3.7. DETECCIÓN DE FRAGMENTOS GFP

Aunque la fluorescencia de la proteína GFP se apaga por el entorno de pH ácido dentro del lisosoma, la GFP todavía es detectable por inmunotransferencia y es más estable que la proteína de fusión GFP-LC3. Por tanto, mediante este ensayo se produce la detección del fragmento de GFP libre que se genera por degradación de GFP-LC3 en el autolisosoma mediante inmunotransferencia con un anticuerpo anti-GFP.

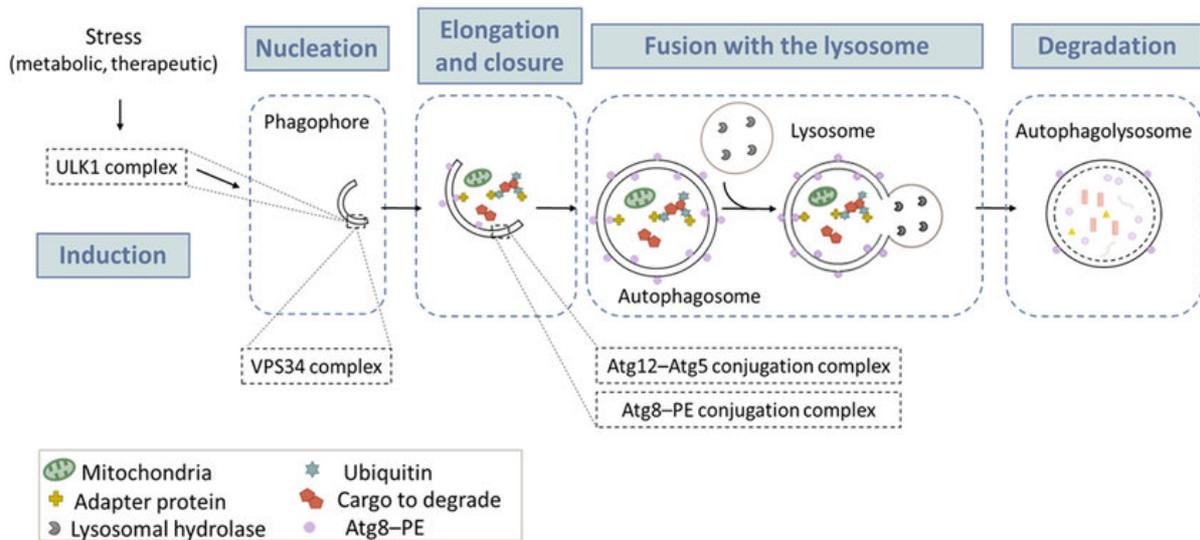
#### 4.3.8. ENSAYO DE DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS DE LARGA DURACIÓN

En este ensayo, las células se cultivan con aminoácidos marcados con isótopos (generalmente [  $^{14}\text{C}$  ] – valina, [  $^{14}\text{C}$  ] – leucina o [  $^{35}\text{S}$  ] – metionina) durante un período prolongado (de varias horas a varios días) para marcar proteínas de larga duración, seguido de un período de incubación corto sin aminoácidos marcados con isótopos para eliminar las proteínas de vida corta, que son degradadas principalmente por el proteosoma. Después del tratamiento con un estímulo inductor de autofagia, la liberación celular de proteínas degradadas (medida como radiactividad soluble en ácido tricloroacético en el sobrenadante del cultivo) se cuantifica. Para

garantizar aún más la radioactividad medida, se recomienda realizar este ensayo con o sin un inhibidor de la autofagia.

#### 4.4. MECANISMOS MOLECULARES DE AUTOFAGIA

La macroautofagia es el tipo de autofagia mejor caracterizado y se lleva a cabo por cinco pasos principales: iniciación (1), nucleación (2), expansión (3), fusión (4) y reciclaje-degradación (5).



**Figura 4. Proceso de macroautofagia.** (Frentzel et al., 2017)

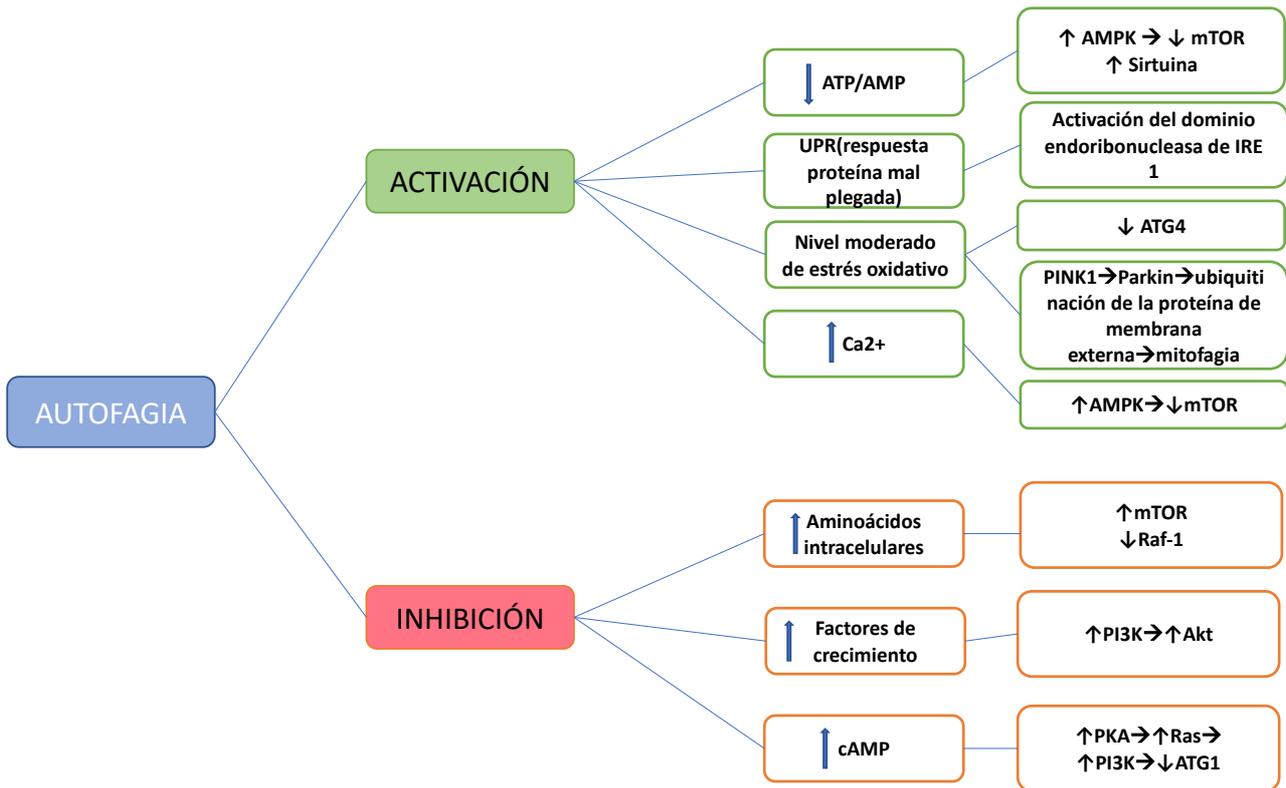
Se produce cuando las células son sometidas a estrés metabólico o terapéutico, tal como altas temperaturas, hipoxia, infección por patógenos, ayuno y estrés oxidativo. Tiene lugar en cinco pasos:

1. **Iniciación:** se produce la inducción de la autofagia debido a una respuesta de estrés metabólico o terapéutico, esto está mediado por el complejo ULK (compuesto por ULK1/2, ATG13, ATG101 y RB1CC1/FIP200). Así, cuando el complejo activo ULK1/2 recibe la señal, fosforila a ATG13 y RB1CC1, provocando su translocación a un dominio del RE (Ariosa et Klionsky., 2017). Una vez que entra en el RE, el complejo ULK inicia la nucleación. Este complejo es inactivado por fosforilación a través del complejo mTOR1 (mTORC1), por el contrario, durante la inducción de la autofagia mTORC1 es inhibido, produciéndose la interacción proteína-proteína, entre ULK y Beclin1 (Mejías, Y., 2015).

2. Nucleación: durante la nucleación se forma el fagoforo (o aislamiento de la membrana). Esta acción se desencadena principalmente por el complejo proteico VPS34, formado por ATG14, AMBRA1, VPS34 y Beclin1, con actividad quinasa 3-fosfatidil inositol fosfato (PI3K). Este complejo está activado cuando Beclin1 se une a AMBRA1 e inhibido cuando Beclin1 se une, a través de su propio dominio BH3, a Bcl-2 o Bcl-xL (García, J., 2016).
3. Expansión: la expansión de la membrana lipídica para posterior formación del autofagosoma se produce por la interacción del fagoforo con el complejo ATG12/ATG5/ATG16L, el cual se forma por la acción de ATG7 y ATG10, esto produce la multimerización y formación de un complejo que permite la inserción de la proteína LC3 (homóloga a ATG8) en la membrana del fagoforo, en su forma lipídica LC3- II (para llegar a LC3 lipídica, LC3 es sintetizada como proLC3, que se escinde por ATG4, para formar LC3-I, ésta es activada por ATG7, transferida a ATG3 y finalmente conjugada con PE (fosfatidiletanolamina) para formar LC3-II) (Tanida, I., 2011). Esta unión permite la captación de la carga citosólica y el posterior cierre de la vesícula, dando origen al autofagosoma.
4. Fusión: el autofagosoma se desprende del complejo ATG12/ATG5 y el ATG8 se libera de la membrana externa por acción de autofagina. Una vez desnudo el autofagosoma, se fusiona directamente con los lisosomas por acción de las proteínas Rab7, Lamp1 y Lamp2, o previamente se une con un endosoma tardío formando un anfisoma.
5. Degradación: por último, una vez fusionados con el lisosoma, el contenido del interior del autofagosoma es degradado por las enzimas lisosomales (Ramírez – Sagredo et al., 2016). El pH ácido del lisosoma, mantenido por la bomba de protones ATPasa vacuolar (v-ATPasa), permite la actividad óptima de las captepsinas lisosomales. Los metabolitos generados tras la proteólisis son bombeados al citosol para su reutilización por la célula (Ariosa et Klionsky., 2017) (Rubinsztein et al., 2012).

#### 4.5. REGULACIÓN DEL PROCESO DE AUTOFAGIA

Las vías primarias de la regulación de la autofagia que traducen la información sobre el estado energético de la célula y modulan el proceso son: la vía mTOR y la señalización por AMPK. Estas rutas integran señales metabólicas como disponibilidad de aminoácidos, factores tróficos (vía PIK3C1-ATk-mTORC1) o de oxígeno y glucosa (que definen los niveles energéticos vía AMP/ATP-AMPK) (Benito I., 2017).



**Figura 5. Regulación de la autofagia.** Por un lado, se produce la activación de la autofagia debido a una disminución del balance ATP/AMP que provoca una activación de AMPK, que induce la autofagia a través de la inactivación de TSC1/2 (complejo de proteínas de esclerosis tuberosa 1 y 2); UPR produce la activación de IRE1 (proteína transmembrana del RE), esta proteína presenta un dominio sensorial interno y un dominio endoribonucleótido externo. Un exceso de UPR provoca la activación de estos dominios; niveles moderados de estrés oxidativo inducen la mitofagia, el cual representa un gran mecanismo de protección frente a las ROS (especies reactivas de oxígeno), llevándose a cabo mediante PINK1, que recluta a Parkin y causa la ubiquitinación de algunas proteínas mitocondriales de membrana, por otro lado, las ROS pueden interrumpir directamente a ATG4, inhibiendo la escisión de LC3 (ATG8) de los lípidos de membrana del autofagosoma, lo que a su vez mejora la autofagia; los iones de  $Ca^{2+}$  se

encuentran almacenados en el RE y pueden ser movilizados al citoplasma por canales voltaje-dependiente. Si el  $Ca^{2+}$  es liberado al citoplasma, estimula una calmodulina quinasa dependiente de calcio activado, la cual inhibe mTORC1 a través de la activación de la vía AMPK. Por otro lado, se da la inhibición de la autofagia mediada por el aumento de la concentración de aminoácidos que es detectada por las proteínas Rag, esto causa la unión de Rag a Raptor en mTORC1, mejorando la señal de mTOR e inhibiendo la autofagia; el aumento de los factores de crecimiento activan el receptor de membrana tirosin-quinasa, aumentando la actividad de PI3K (fosfoinositol-3-quinasa) de clase I encargado de activar a su vez la producción de PIP3 (fosfatidil inositol trifosfato) que conduce a la activación de la proteína Akt, activando el complejo mTORC1 e inhibiendo la autofagia; la acumulación de cAMP activa la PKA (proteína quinasa A) la cual causa la activación de Ras y éste causa la fosforilación y desactivación de ATG1 y la activación de PI3K desencadenando la inhibición de la autofagia. Figura modificada de (Moloudizargari et al., 2017).

#### 4.5.1. mTOR

La diana de rapamicina de mamífero (mTOR: mammalian target of rapamycin). mTOR es una proteína serina/treonina quinasa de gran tamaño (2549 aminoácidos, 250 kDa) y pertenece a la familia de proteínas quinasas relacionadas con fosfoinositido-3-quinasa (PI3K). Estructuralmente, el extremo N-terminal de la proteína mTOR contiene más de 20 repeticiones HEAT prototípicas en tándem (Huntingtin, EF3A, ATM, and TOR) que forman dos alfa-solenoides seguidas de un dominio FAT (FRAP, ATM y TRRAP) y un dominio FRB (unión de FKBP12/rapamicina), que está unido al dominio catalítico quinasa (KIN) y termina con el dominio FATC en el extremo C-terminal (Luo et al., 2018). Además, mTOR también contiene un dominio regular negativo (NRD) entre el dominio catalítico y el dominio FACT, que es esencial para la regulación de la actividad de mTOR (Wang et al., 2019) (Figura 6A).

mTOR constituye la subunidad catalítica de dos complejos multiproteicos distintos: el complejo mTOR 1 (mTORC1) y el complejo mTOR 2 (mTORC2). Tanto mTORC1 como mTORC2 contienen algunas macromoléculas idénticas como la subunidad catalítica (mTOR) la subunidad letal de mamíferos con proteína SEC 13 8 (mLST8) y un componente regulador tanto de mTORC1 como de mTORC2 que contiene un dominio DEP (DEPTOR) proteína de interacción de mTOR. DEPTOR inhibe a mTORC1 y mTORC2, probablemente a través de la unión de su dominio PDZ a mTOR. Aparte, cada complejo presenta proteínas específicas. mTORC1 contiene PRAS40 (sustrato Akt

rico en prolina de 40 kDa) y la subunidad central, la proteína asociada a la regulación de mTOR (RAPTOR). Por el contrario, mTORC2 contiene la subunidad que contiene el sitio de unión al sustrato y determina la locación de mTORC2 (mSIN1), la subunidad insensible a la rapamicina (RICTOR) y las proteínas asociadas a RICTOR 1 (PROTOR1) y 2 (PROTOR2). Éstas últimas no parecen afectar la actividad intrínseca de mTORC2 (Hoeffler et al., 2010) (Tafur et al., 2020).

El regulador mejor caracterizado de la autofagia es el complejo mTOR 1 (mTORC1). Esta quinasa regula negativamente la autofagia inhibiendo directamente la actividad del complejo ULK1 por fosforilación. En células mamíferas, ULK1 es fosforilado directamente por AMPK en respuesta a falta de energía. Por lo tanto, AMPK desencadena la autofagia regulando positivamente el complejo ULK1 e inhibiendo a mTOR (Boya P et al., 2013).

#### - **mTORC1**

##### Regulación “upstream” de mTORC1

La activación de mTORC1 está controlada por una serie de señales como factores de crecimiento, nutrientes, niveles de energía y estrés.

La señal de factores de crecimiento es regulada por el complejo de esclerosis tuberosa (TSC). El complejo TSC lo comprenden: Hamartin (TSC1), tuberina (TSC2) y Tre2-Bub2-cdc16 (TBC). TSC inhibe a Rheb a través de su actividad de proteína activadora de GTPasa (GAP), convirtiendo GTP en GDP. Cuando TSC es inhibido, Rheb se une a GTP, esto permite la unión y activación alostérica de mTORC1 a través de un cambio conformacional. Existen muchas señales “upstream” que convergen en TSC para regular la actividad de mTORC1. Las vías de activación más importantes son la vía PI3K/Akt/mTORC1 y la vía Ras/Raf/MEK/ERK/mTORC1. Por ejemplo, Akt es capaz de fosforilar e inhibir TSC2, activando así a mTORC1. Esto se da cuando las señales de factores de crecimiento activan PI3K a través de la unión a las proteínas IRS. Luego, PI3K fosforila PIP2 a PIP3 que luego activan a PDK1/2. Akt se activa mediante la fosforilación de PDK1. Por tanto, promueve la actividad de mTORC1 a través de la fosforilación de TSC, activando posteriormente Rheb. mTORC2 también fosforila directamente a Akt.

Niveles bajos en energía debido a la privación de glucosa activan la AMPK a través de la fosforilación de la quinasa hepática B1 (LKB1). AMPK es activa en respuesta a niveles bajos de energía celular (balance alto AMP/ATP). AMPK fosforila directamente a TSC2, incrementando la función GAP de TSC2. Además, AMPK fosforila el componente Raptor de mTORC1, aumentando la unión de Raptor 14-3-3 e inhibiendo a mTORC1. Durante la privación de glucosa, las vías de

respuesta al daño en el ADN conducen a la inhibición de mTORC1 mediante la inducción de la proteína supresora de tumores (p53).

Las células responden a condiciones de estrés, como hipoxia, inhibiendo mTORC1 mediante el regulador en el desarrollo al daño al ADN (REDD1), independientemente al AMPK (Melick et al., 2020).

En condiciones suficientes de aminoácidos, se ha demostrado que el complejo activo RAGA/B-GTP-RAGC/D-GDP se une directamente al componente RAPTOR de mTORC1 y redistribuye a mTORC1 al lisosoma. Por otro lado, en condiciones de privación de aminoácidos, especialmente la abstinencia de leucina, mTORC1 se dispara por toda la célula, pero se redistribuye en las vesículas que contienen proteínas de membrana asociada a lisosomas 2 (LAMP2) y RAB7 (que son marcadores de lisosomas y endosomas tardíos, respectivamente) en respuesta a la estimulación de aminoácidos. Esto sugiere que RAG GTPasa juega un papel en la transducción de señales de aminoácidos al mTORC1. La sobreexpresión de RAGA/B-GTP es suficiente para activar mTORC1, éste se une a RAG y se recluta en el lisosoma a través de un mecanismo desconocido. La leucil-ARNtasa sintetasa (LeuRS) puede actuar como un sensor directo del aminoácido Leu en el citoplasma y podría estar involucrado en la activación de mTORC1 (Jewell et al., 2013) (Figura 6B)

La rapamicina y sus análogos inhiben la actividad de mTORC1 alostéricamente, mientras que mTORC2 demuestra insensibilidad a la rapamicina a corto plazo. El complejo rapamicina-FKBP12 se une al dominio que presenta mTOR reduciendo la disponibilidad de la hendidura catalítica, lo que hace que algunos sustratos no puedan acceder al sitio activo. Se ha estudiado que el tratamiento prolongado de rapamicina inhibe a mTORC2 a través del secuestro de mTOR en algunos tipos de células.

### Regulación “downstream” de mTORC1

mTORC1 interviene en la regulación de multitud de procesos celulares relacionados con el crecimiento, entre ellos, se encuentra la autofagia. La falta de nutrientes en las células provoca la degradación del contenido citoplasmático en su interior, incluido los orgánulos, y por tanto reciclan las macromoléculas para garantizar la supervivencia. Este proceso catabólico se denomina macroautofagia, definido anteriormente. mTORC1 regula la autofagia a través del control directo de ULK1/2 (ATG1 en levaduras), proteína quinasa encargada de la regulación del inicio de la formación del autofagosoma (Takahara et al., 2020). El principal complejo autofágico ULK1, consta de ULK1, ULK2, ATG13 y RB1CC1 necesario para mediar la señal de la quinasa

mTORC1 sensible a nutrientes (Wong et al., 2013). Por otra parte, hay otra quinasa muy importante en la regulación y también sensible a la concentración de nutrientes, la proteína quinasa, AMPK, que fosforila directamente a ULK1/2 durante los momentos de inanición de glucosa. Esta proteína interviene en la regulación celular de muchos procesos del organismo. AMPK activa ULK1 fosforilando las serinas 317 y 777 de ULK1 mayoritariamente (Kim, J. et al., 2011).

Aparte, una de las funciones clave de mTORC1 es la regulación de la traducción de proteínas, a través de la síntesis de proteínas mediante fosforilación directa de las proteínas relacionadas con la traducción, como la proteína ribosómica S6 quinasa 1 (S6K1) y la actividad de las fosfatasa como la proteína fosfatasa 2A (PP2A), que pueden regular los sustratos de mTOR, generando así bucles de retroalimentación dependientes de mTOR que controlan las tasas de iniciación (Hoeffler et al., 2010). Además, mTORC1 promueve la síntesis de lípidos al fosforilar la lipina 1, lo que aumenta la actividad de la proteína de unión al elemento regulador de esteroides 1 (SREBP1) (Peterson et al., 2010) y promueve la síntesis de purinas al estimular el ciclo del tetrahidrofolato mitocondrial (mTHF) mediante el incremento de la enzima metilentetrahidrofolato deshidrogenasa 2 (MTHFD2) (Ben-Sahra et al., 2016).

## - **mTORC2**

### Regulación “upstream” de mTORC2

Hay menos información funcional y estructural disponible para la señalización de mTORC2. Se demostró por primera vez que mTORC2 regula la organización del citoesqueleto a través de la vía PKC $\alpha$ . mTORC2 también se encarga de inhibir la apoptosis y regular la homeostasis de la glucosa y el metabolismo anabólico. Los reguladores de mTORC2 no están muy bien definidos. La regulación por la vía PI3K es quizás la señal “upstream” mejor comprendida de mTORC2, con la unión de fosfatidilinositol (3, 4, 5) – trifosfato (PIP3), encargado de reclutar mTORC2 a la membrana y de estimular su actividad quinasa. Al igual que otras proteínas reguladoras PI3K, mTORC2 tiene una subunidad mSin1, proteína quinasa activada por estrés de mamíferos que interactúa con la proteína quinasa 1 (SGK1), que contiene un dominio homólogo de pleckstrina (PH). Este dominio es vital para la regulación de la actividad de mTORC2 insulina-dependiente o factores de crecimiento ya que inhibe la actividad catalítica de mTORC2 en ausencia de insulina. Por otro lado, AMPK activa mTORC2 directamente en respuesta al estrés energético. Los agonistas que activan la AMPK promueven la señalización de mTORC2 independientemente de la retroalimentación negativa mediada por mTORC1. AMPK fosforila mTOR y RICTOR, y esto es

suficiente para aumentar la actividad de la cinasa mTORC2. Los mecanismos por los que esta fosforilación regula la actividad de mTORC2, así como los sitios exactos de fosforilación, aún no se han definido completamente. La entrada directa de AMPK a mTORC2 sugiere una nueva estrategia para la supervivencia celular para hacer frente al estrés energético agudo (Fu and Hall, 2020) (Liu et al., 2015).

mTORC1 regula negativamente a mTORC2 a través de S6K1, debido a la existencia de bucles de control de retroalimentación entre mTORC1 y mTORC2. mTORC1 fosforila y activa a Grb10, un regulador negativo de la señalización del receptor de insulina/IGF-1 de la vía “upstream” de Akt y mTORC2, mientras que la proteína ribosómica S6 quinasa (S6K1) participa en la regulación “downstream” de mTORC1, ésta suprime la activación de mTORC2 a través de la degradación dependiente de la fosforilación del sustrato 1 del receptor de insulina (IRS1). Esta regulación negativa de la señalización PI3K y mTORC2 por mTORC1 tiene numerosas implicaciones para la orientación farmacológica de mTOR en la enfermedad (Saxton and Sabatini, 2017).

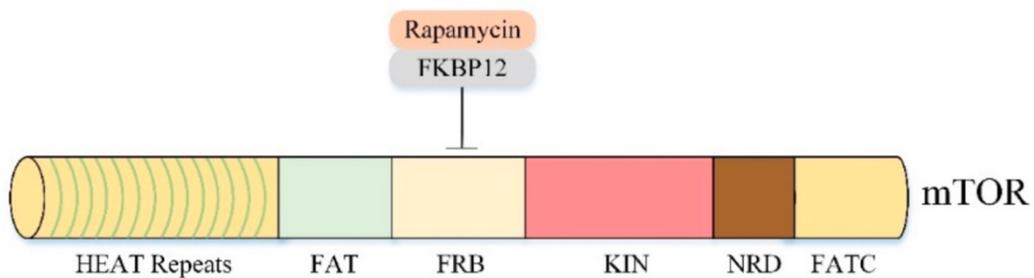
Al contrario que mTORC1, mTORC2 es insensible al tratamiento agudo con rapamicina. Sin embargo, estudios indican que la exposición prolongada a la rapamicina bloquea la función de mTORC2 en ciertas líneas celulares (Tsukumo et al., 2014).

### Regulación “downstream” de mTORC2

En comparación como mTORC1, las funciones de mTORC2 están mucho menos caracterizadas. mTORC2 fosforila miembros de la familia de quinasas AGC, como Akt, la proteína quinasa C (PKC) y la quinasa 1 (SGK1), regulando así la proliferación celular, la supervivencia y la organización del citoesqueleto de actina en respuesta a factores de crecimiento (Luo et al., 2018). mTORC2 fosforila y activa a Akt/PKC. El papel de Akt incluye la regulación de la proliferación celular, supervivencia, metabolismo, y transcripción. A través de su dominio PH, Akt se une a PIP3 y genera PI3K tras la estimulación por insulina o factores de crecimiento. De manera similar a otras AGC quinasas, la Akt unida a la membrana se activa mediante fosforilación en dos sitios, un sitio en el bucle de activación de la quinasa (Thr308) y un sitio en la zona hidrófoba (Ser473). Por tanto, mTORC2 es la responsable de la fosforilación en el sitio hidrófobo, jugando un papel positivo en la activación de Akt. Por lo tanto, mTORC2 quizás pueda inhibir la autofagia indirectamente activando mTORC1 a través de la fosforilación en el dominio hidrófobo de Akt (Figura 6B).

Aunque hay evidencia que muestra que los aminoácidos activan mTORC2, es ampliamente aceptado que mTORC1 es sensible tanto a los nutrientes como a los factores de crecimiento, mientras que mTORC2 está regulado principalmente por factores de crecimiento. Sin embargo, estudios recientes apoyan un papel de mTORC2 en la reprogramación metabólica y muestran cómo mTORC2 responde a los nutrientes. Una disminución de los catabolitos de glutamina debido a la privación de nutrientes puede activar mTORC2 para aumentar la expresión de la glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa 1 (GFAT1). mTORC2 modula así una vía biosintética que requiere glutamina para mediar la homeostasis metabólica (Fu and Hall, 2020).

A



B

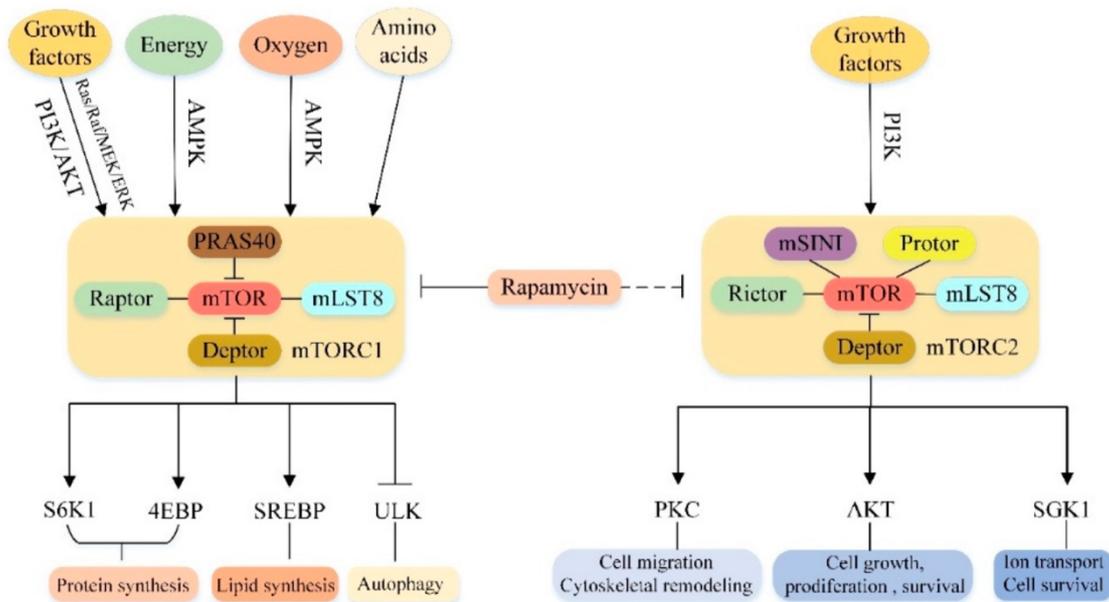


Figura 6. A: Estructura de mTOR; B: mTORC1 y mTORC2. (Wang et al., 2019).

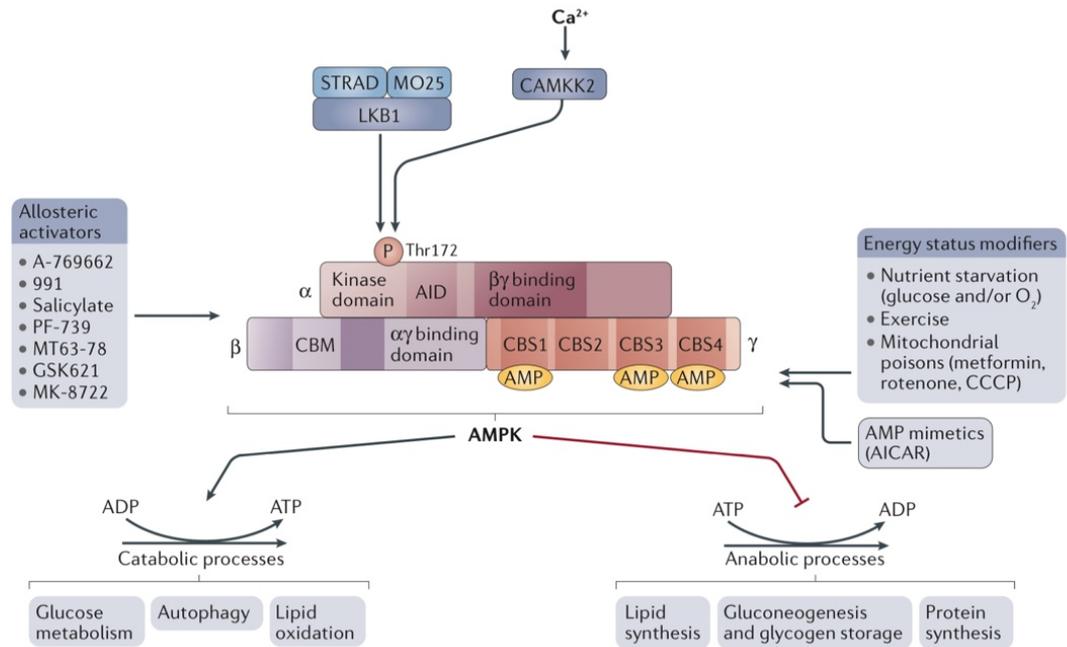
#### 4.5.2. AMPK

Otro gran candidato en la regulación de la autofagia es AMPK ya que detecta el estado de energía celular para mantener la homeostasis energética de nuestras células. La AMPK de mamíferos corresponde a un compuesto heterotrimérico, es decir, está constituido por tres subunidades polipeptídicas diferentes, una subunidad catalizadora  $\alpha$  y dos subunidades reguladoras  $\beta$  y  $\gamma$  (Rojas et al., 2010). En el extremo C-terminal posee una región autoinhibitoria (AID), que es capaz de regular la propia actividad quinasa, mientras que el extremo N-terminal presenta una región quinasa con el residuo Thr172, que es clave para la activación (Herzig et al., 2018).

##### Regulación "upstream" de AMPK

En los principales mecanismos de regulación por encima de AMPK (upstream), están implicadas las subunidades alfa y gamma. Las quinasas "upstream" LKB1 y CAMKK2 son activadas por estrés metabólico y calcio intracelular, respectivamente. En respuesta al estrés energético, AMP estimula la interacción con la axina provocando la activación de LKB1 y CAMKK2 provocan la activación de AMPK por fosforilación de Thr172 en la subunidad alfa (Wang et al., 2019). Curiosamente, LKB1 es un gen supresor de tumores, se ha visto que éste se encuentra mutado en el trastorno hereditario del Síndrome e Peutz-Jeghers y en una fracción significativa de cánceres de pulmón y cuello uterino, lo que sugiere que la AMPK podría desempeñar un papel en la supresión tumoral (Mihaylova et al., 2011). Por otro lado, AMPK se considera un sensor directo del cociente ADP/ATP, ya que la unión alostérica de ADP a la subunidad gamma compiten con el ATP, impidiendo la activación por este mecanismo.

Varios factores conducen a la activación de AMPK como la falta de oxígeno y de glucosa, los venenos mitocondriales y la presencia de algunos fármacos como miméticos de AMP (AICAR) o activadores alostéricos (enumerados a la izquierda) (Figura 7).



**Figura 7. Estructura y vías de activación de AMPK. (Herzig et al., 2018).**

### Regulación “downstream” de AMPK

Las vías “downstream” moduladas por AMPK se agrupan en cuatro categorías generales: metabolismo de lípidos, metabolismo de proteínas, metabolismo de glucosa y autofagia y homeostasis mitocondrial.

Se ha demostrado que AMPK regula la autofagia tanto en levaduras como en células de mamíferos. La caracterización molecular de esta regulación ha revelado que AMPK controla la autofagia en diferentes pasos. Primero, AMPK fosforila directamente el regulador “upstream” TSC2 de mTOR en Thr-1227 y Ser-1345 y a la subunidad RAPTOR de mTOR en Ser-722 y Ser-792. Ambas fosforilaciones provocan la disminución de la actividad de mTOR en condiciones de estrés energético. Esta reducción de la actividad de mTOR alivia la fosforilación inhibitoria en Ulk1 para activar la autofagia.

Sin embargo, se estableció un vínculo directo entre AMPK y la vía central de la autofagia cuando se demostró que, en condiciones de inanición de glucosa, AMPK promueve la autofagia activando directamente Ulk1 mediante la fosforilación de las Ser-317 y Ser-777. Por el contrario, en concentraciones ricas de nutrientes, la actividad de mTOR evita la activación de Ulk1 al

fosforilar Ser-757 e interrumpir la interacción Ulk1 y AMPK. Esta fosforilación coordinada es importante para Ulk1 en la inducción de la autofagia (Kim et al., 2011) (Heirzg et al., 2018).

Por otro lado, AMPK fosforila PIK3C3/Vps34 inhibiendo la constitución de complejos “no autofágicos”, y por lo tanto disminuyendo los niveles de PI3P totales en la célula. No obstante, la unión de ATG14 o UVRAG a PIK3C3/Vps34 y Beclin-1, formando el complejo PI3KCIII, genera un cambio conformacional de los mismos que previene la fosforilación inhibitoria de PIK3C3/Vps34 y favorece la fosforilación pro-autofágica de Beclin-1 por AMPK en dicho complejo (Kim et al., 2013).

## **4.6. DESREGULARIZACIÓN DE LA VÍA MTOR/AMPK Y SU IMPLICACIÓN EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA)**

### **4.6.1. EA y Autofagia**

La enfermedad de Alzheimer (EA), es la forma más común de demencia senil. La EA se caracteriza por la acumulación patógena de placas amiloides que consisten en péptidos  $\beta$ -amiloides ( $A\beta$ ), que se generan por la escisión secuencial de la proteína precursora amiloide (APP) a través de la  $\beta$ -secretasa y la  $\gamma$ -secretasa, y por la acumulación intracelular de ovillos neurofibrilares que contienen tau hiperfosforilada (Son et al., 2012). Un análisis ultramicroscópico del tejido cerebral degenerado en pacientes con EA reveló la acumulación prominente de vesículas autofágicas no degradadas, lo que indica que se detuvo el flujo autofágico. Modelos celulares para la EA también mostraron un flujo autofágico defectuoso y la acumulación de vesículas autolisosomales. Por ejemplo, se sabe que la mutación de presenilina 1 (PS1), que es la causa más frecuente de EA familiar de inicio temprano, causa parada autofágica tanto en ratones como en modelos de cultivo celular. La expresión de la proteína precursora amiloide (APP) con mutaciones también desencadena patologías autofágicas similares. Esto sugiere que la enfermedad de Alzheimer podría estar relacionado con una regulación defectuosa de la autofagia a nivel de la degradación autofagosomal (Kim et al., 2017).

Por otro lado, se ha visto que la expresión de la proteína Beclin1 disminuye en el cerebro humano envejecido, lo que conduce a una reducción de la autofagia con el envejecimiento. Se ha demostrado que Beclin 1 está disminuida en los cerebros con EA leve. Esto da como resultado un aumento de la acumulación de  $A\beta$ . Además, también se ha demostrado que la deficiencia de

beclin1 interrumpe la autofagia celular y la degradación autofagosómica-lisosómica y altera el metabolismo de la APP. Estos estudios sugieren que la reducción de la autofagia a través de la deficiencia de beclin1 podría reducir el aclaramiento de A $\beta$ ; por lo tanto, el aumento de los niveles de Beclin 1 puede tener un potencial terapéutico en la EA (Son et al., 2012).

#### - **mTOR**

En general, los estudios muestran que la señalización de mTOR aumenta en los cerebros con EA. En una neurona sana, la actividad de mTOR está estrictamente regulada y los niveles de autofagia basal son suficientes para eliminar A $\beta$  y tau. Durante las primeras etapas de la EA, un aumento en los niveles de A $\beta$  soluble conduce a la hiperactividad de mTOR, que a su vez reducirá la inducción de autofagia (representada en la Figura 8, en el centro, por una reducción de los autofagosomas). La función de autofagia más baja eventualmente conducirá a un aumento en los niveles de estado estacionario de A $\beta$  y tau. En particular, los niveles altos de A $\beta$  aumentarán aún más la actividad de mTOR, creando así un círculo vicioso que, en última instancia, promoverá niveles más altos de A $\beta$ . El aumento de la inducción de la autofagia en la EA temprana puede representar un enfoque terapéutico válido, ya que facilitará la formación de autofagosomas y, por lo tanto, eliminará A $\beta$  y tau. Durante las últimas etapas de la EA, existe evidencia de que los autofagosomas no se fusionan con los lisosomas. Se prevé que el aumento de la inducción de autofagia en las etapas tardías de la EA puede obstruir aún más las células al generar más autofagosomas que no se eliminarán, aunque esto no se ha probado directamente (Oddo, 2012) (Figura 10). En resumen, un aumento de la señalización de mTOR eleva los niveles y la fosforilación de tau endógena, por el contrario, la reducción de mTOR mejora los niveles de tau sobreexpresada. Esta reducción de mTOR se puede inducir farmacológicamente mediante inhibidores como la rapamicina (Caccamo et al, 2010). Esto, junto con otros efectos neuroprotectores y el hecho de que esté aprobada para uso humano desde 1999, hace de la rapamicina un interesante candidato para el tratamiento de la EA (Richardson et al., 2015).

No obstante, otros grupos sugieren que oligómeros de A $\beta$ 42 desencadenan una inhibición de mTORC1, a través de la activación de AMPK, generando un bloqueo traduccional en el retículo endoplasmático que activa JNK3 (c-Jun N-terminal Kinase), y éste a su vez fosforila APP en T688 facilitando su endocitosis y procesamiento amiloidogénico (Benito, 2017).

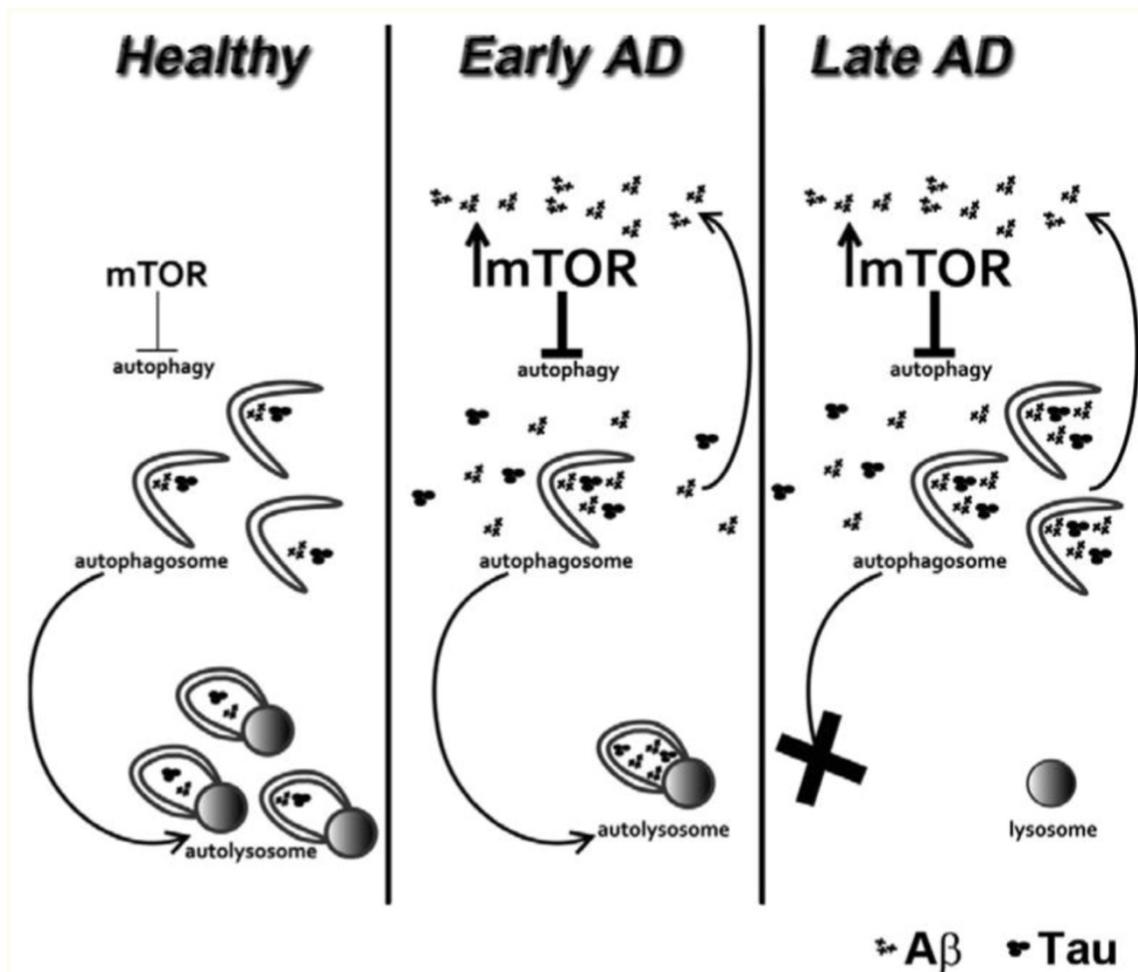


Figura 8. Representación esquemática del papel de mTOR en EA. (Oddo, 2012).

#### - AMPK

Como hemos visto antes, la EA es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que se caracteriza por la formación de depósitos de neuríticas que contienen péptido  $\beta$ -amiloide y ovillos neurofibrilares compuestos de proteína tau hiperfosforilada (Querfurth and Laferla, 2010).

Las distintas subunidades de AMPK se expresan ampliamente en diferentes regiones del cerebro tanto en el cerebro de roedores como en el de humanos. Al expresarse constantemente en la mayoría de las subunidades de AMPK en las neuronas, pueden ser activadas funcionalmente, como, por ejemplo, en la EA (Vingtdeux et al, 2011). El aumento de los niveles citoplasmáticos de AMP y  $Ca^{2+}$  son los principales activadores de la señalización neuronal de

AMPK. Curiosamente, la EA está asociada con varias anomalías en el metabolismo energético neuronal, por ejemplo, disminución de la captación de glucosa, disfunciones mitocondriales y defectos en el metabolismo del colesterol y, además, con problemas para mantener la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ . Una de las quinasas “upstream” que activan AMPK, la  $\text{Ca}^{2+}$ /Proteína quinasa  $\beta$  dependiente de calmodulina (CAMKK $\beta$ ) se expresa abundantemente en las neuronas y es activada por un aumento de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Por tanto, disfunciones en el equilibrio de  $\text{Ca}^{2+}$  puede desencadenar la señalización de AMPK, sobretodo en neuronas (Salminen et al., 2011). Resumiendo, la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  neuronal se encuentra desregulada en la EA, siendo el  $\text{Ca}^{2+}$  un potente activador de AMPK a través de la activación de CAMKK $\beta$ . La activación crónica de AMPK puede desencadenar la muerte de células neuronales, ya sea a través de vías apoptóticas o autofágicas.

Por otro lado, se sabe que durante la EA se produce una hiperfosforilación de tau y depósitos de A $\beta$ . La AMPK, no solo puede afectar a la deposición de A $\beta$ , sino también reducir la hiperfosforilación de tau, mejorando así los síntomas de la demencia. En primer lugar, la AMPK actúa regulando la expresión de secretasa  $\beta$  y  $\gamma$ , para reducir el depósito de A $\beta$ . En segundo lugar, la AMPK mejora la desacetilación y reduce la hiperfosforilación de tau a través de la activación de SIRT1 y PP2A. En general, la AMPK no solo desempeña un papel útil en la producción y eliminación de A $\beta$ , sino que también mejora en gran medida las características patológicas de la EA (Chen et al., 2021).

## 5. CONCLUSIÓN

La autofagia es el proceso por el cual nuestras células descomponen y destruyen orgánulos viejos, anormales o dañados. Los productos de descomposición se reciclan para funciones celulares importantes como el ayuno o estrés. Este proceso evita la acumulación de proteínas mal plegadas u orgánulos defectuosos y también ayuda a destruir virus y bacterias, impidiendo quizás que las células normales se vuelvan cancerosas.

La macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas son los tres principales tipos de autofagia.

Hay muchas técnicas de monitorización del proceso de la autofagia, tanto cualitativas, como la TEM, como cuantitativas para determinar el flujo autofágico.

Las rutas metabólicas mTOR y AMPK son de suma importancia para comprender el control del metabolismo mediante sus dos fases, el anabolismo y el catabolismo, pero también para el desarrollo de patologías. mTOR regula negativamente la autofagia mediante la fosforilación de ULK1. ULK1 es fosforilado directamente por AMPK en respuesta a falta de energía. Por lo tanto, AMPK desencadena la autofagia regulando positivamente el complejo ULK1 e inhibiendo a mTOR.

Conocer estas dos vías de señalización puede darnos armas terapéuticas para luchar contra enfermedades como el cáncer o las enfermedades neurodegenerativas, en concreto, en la EA:

- Una activación constante de la vía mTOR, provoca una inhibición permanente de la autofagia, disminuyendo su actividad y aumentando la acumulación de vesículas autofágicas, que en neuronas provocan una hiperfosforilación de tau y la acumulación de A $\beta$ .
- La actividad de AMPK puede mejorar los síntomas de demencia en la EA, ya que disminuye las concentraciones de tau hiperfosforilada y reduce las deposiciones de A $\beta$ .

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Ariosa AR, Klionsky DJ. Autophagy core machinery: overcoming spatial barriers in neurons. *J Mol Med (Berl)*. 2016;94(11):1217-1227
- Barth S, Glick D, Macleod KF. Autophagy: assays and artifacts. *J Pathol*. 2010;221(2): 117-124.
- Ben-Sahra I, Hoxhaj G, Ricoult SJH, Asara JM, Manning BD. mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle. *Science*. 2016;351(6274):728-733.
- Benito I. *Ánisis de las vías de inducción de autofagia en neuronas, y su papel neuroprotector en un modelo transgénico de la enfermedad de Alzheimer*. [Tesis Doctoral]. Madrid: Departamento de Biología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid; 2017.
- Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature cell biology*. 2013;15(7):713-720.
- Caccamo A, Magrì A, Medina DX, Wisely EV, López-Aranda MF, Silva AJ, Oddo S. mTOR regulates tau phosphorylation and degradation: implications for Alzheimer's disease and other tauopathies. *Aging Cell*. 2013;12(3):370-80.
- Chen M, Huang N, Liu J, Huang J, Shi J, Jin F. AMPK: A bridge between diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *Behav Brain Res*. 2021; 400:113043.
- Cuervo AM, Wong E. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res*. 2014;24(1):92-104.
- De Duve C, Wattiaux R. "Functions of Lysosomes". *Annual Review of Physiology*. 1966; 28:435-92.
- Frentzel J, Sorrentino D, Giuriato S. Targeting Autophagy in ALK-Associated Cancers. *Cancers (Basel)*. 2017;9(12):161.
- Fu W, Hall M. Regulation of mTORC2 Signaling. *Genes*. 2020;11(9), 1045

- García A. Mecanismos moleculares de regulación de la vía mTORC1/p70S6K, autofagia y mitofagia: papel de TSC2. [Tesis Doctoral]. Madrid: Departamento de Bioquímica y Biología molecular II. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense Madrid; 2016.
- García J. Bases moleculares de la resistencia al cisplatino en cáncer no microcítico de pulmón: la autofagia como nuevo abordaje terapéutico. [Tesis Doctoral]. Castilla-La Mancha: Centro Regional de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Castilla-La Mancha; 2016.
- Grumati P, Dikic I. Ubiquitin signaling and autophagy. *J Biol Chem.* 2018;293(15):5404-5413
- Herzig S, Shaw RJ. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(2): 121-135.
- Hoeffler CA, Klann E. mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends Neurosci.* 2010;33(2):67-75.
- Jewell JL, Russell RC, Guan KL. Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(3):133-9.
- Ju J, Varadhachary A, Miller S, Weihl C. Quantitation of "autophagic flux" in mature skeletal muscle. *Autophagy.* 2010;6(7):929-35.
- Kaur J, Debnath J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015; 16:461–472
- Kim J, Kim YC, Fang C, Russell RC, Kim JH, Fan W, Liu R, Zhong Q, Guan KL Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. *Cell.* 2013;152:290-303.
- Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* 2011;13(2):132-41.
- Kim M, Ho A, Lee JH. Autophagy and Human Neurodegenerative Diseases – A Fly's Perspective. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(7):1596.
- Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy.* 2016;12(1):1-222.

- Lapierre LR, Kumsta C, Sandri M, Ballabio A, Hansen M. Transcriptional and epigenetic regulation of autophagy in aging. *Autophagy*. 2015;11(6):867-80.
- Lin TA, Wu VC, Wang CY. Autophagy in Chronic Kidney Diseases. *Cells*. 2019 Jan 16;8(1):61.
- Liu P, Gan W, Chin R, Ogura K, Guo J, Zhang J, Wang B, Bleins J, Cantley L, Toker A, Su B, Wei W. PtdIns(3,4,5)P3-Dependent Activation of the mTORC2 Kinase Complex. *Cancer Discovery*. 2015;5(11):1194-1209
- Luo Y, Xu W, Li G, Cui W. Weighing In on mTOR Complex 2 Signaling: The Expanding Role in Cell Metabolism. *Oxid Med Cell Longev*. 2018; (2018):7838647.
- Maiuolo J, Gliozzi M, Musolino V, Carresi C, Scarano F, Nucera S, Scicchitano M, Bosco F, Ruga S, Zito MC, Macri R, Bulotta R, Muscoli C, Mollace V. From Metabolic Syndrome to Neurological Diseases: Role of Autophagy. *Front Cell Dev Biol*. 2021;(9):651021.
- Mejías Y. Mecanismos moleculares implicados en la regulación de la autofagia tras la realización de programas de entrenamiento físico en personas mayores. [Tesis Doctoral]. León: Departamento de Ciencias Biomédicas, Universidad de León; 2015.
- Melick C, Jewell J. Regulation of mTORC1 by Upstream Stimuli. *Genes (Basel)*. 2020;11(9):989.
- Mihaylova M, Shaw R. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol*. 2011;13(9):1016-23.
- Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell*. 2010;140(3):313-326
- Moloudizargari M, Asghari MH, Ghobadi E, Fallah M, Rasouli S, Abdollahi M. Autophagy, its mechanisms and regulation: Implications in neurodegenerative diseases. *Ageing Res Rev*. 2017; 40: 64-74
- Oddo S. The role of mTOR signaling in Alzheimer disease. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2012;4:941-52.

- Ortiz A. Regulación de la autofagia ante estímulos metabólicos en astrocitos. [Tesis Doctoral] Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid; 2019.
- Peterson T, Sengupta S, Harris T, Carmack A, Kang S, Balderas E, et al. mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell*. 2011;146(3):408-20.
- Querfurth H, LaFerla F. Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2010;362(4):329-44.
- Ramírez-Sagredo A, Aleman L, Villa M, Chávez M, García L, Lavandero S. Autofagia en el sistema cardiovascular: pasado, presente y futuro. *Rev Chil Cardiol*. 2016;35:228-241
- Ravikumar B, Sarkar S, Davies J, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2010;90(4):1383-435.
- Rojas M, Yuing F, Ruiz-Tagle I, González F, Zelada V. AMPK: estructura, rol fisiológico, regulación y acción en alteraciones metabólicas. *Mot. Hum*. 2010; 11(2): 67-74.
- Rubinsztein D, Shpilka T, Elazar Z. Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Current biology*. 2012; 22(1):29-34.
- Richardson A, Galvan V, Lin AL, Oddo S. How longevity research can lead to therapies for Alzheimer's disease: The rapamycin story. *Exp Gerontol*. 2015; 68:51-8
- Salminen A, Kaarniranta K, Haapasalo A, Soininen H, Hiltunen M. AMP-activated protein kinase: a potential player in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2011;118(4):460-74.
- Saxton R, Sabatini D. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. 2017;168(6):960-976.
- Son J, Shim J, Kim K, Ha J, Han J. Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. *Exp Mol Med*. 2012;44(2):89-98.
- Tafur L, Kefauver J, Loewith R. Structural Insights into TOR Signaling. *Genes*. 2020; 11(8):885
- Takahara T, Amemiya Y, Sugiyama R, Maki M, Shibata H. Amino acid-dependent control of mTORC1 signaling: a variety of regulatory modes. *J Biomed Sci*. 2020;27(1):87.

- Tanida I. Autophagy basics. *Microbiol Immunol*. 2011;55(1):1-11.
- Tsukumo Y, Laplante M, Parsyan A, Ruggero D, Fonseca B. mTOR and Regulation of Translation. 2014; 15:308-323.
- Vingtdeux V, Chandakkar P, Zhao H, d'Abramo C, Davies P, Marambaud P. Novel synthetic small-molecule activators of AMPK as enhancers of autophagy and amyloid- $\beta$  peptide degradation. *FASEB J*. 2011;25(1):219-31.
- Wang H, Liu Y, Wang D, Xu Y, Dong R, Yang Y, Lv Q, et al. The upstream pathway of mTOR-mediated autophagy in liver diseases. *Cells*. 2019;8(12):1597
- Wong PM, Puente C, Ganley IG, Jiang X. The ULK1 complex: sensing nutrient signals for autophagy activation. *Autophagy*. 2013;9(2):124-37.
- Wong SQ, Kumar AV, Mills J, Lapierre LR. Autophagy in aging and longevity. *Hum Genet*. 2020;139(3):277-290.
- Zhang XJ, Chen S, Huang KX, Le WD. Why should autophagic flux be assessed? *Acta Pharmacol Sin*. 2013;34(5):595-9
- Zhang Z, Singh R, Aschner M. Methods for the Detection of Autophagy in Mammalian Cells. *Curr Protoc Toxicol*. 2016; 69:20.12.1-20.12.26.
- Zhu Z, Yang C, Iyaswamy A, Krishnamoorthi S, Sreenivasmurthy SG, Liu J, et al. Balancing mTOR Signaling and Autophagy in the Treatment of Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci*. 2019;20(3):728.