



# La macroautofagia como mecanismo modulador del desarrollo tumoral adenohipofisario: evidencias morfológicas y moleculares

Laura Anahí Cecenarro.

Tesis (Dra. en Medicina y Cirugía) - - Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Médicas, 2021.

Aprobada: 19 de agosto de 2021

---

Este documento está disponible para su consulta y descarga en RDU (Repositorio Digital de la Universidad Nacional de Córdoba). El mismo almacena, organiza, preserva, provee acceso libre y da visibilidad a nivel nacional e internacional a la producción científica, académica y cultural en formato digital, generada por los miembros de la Universidad Nacional de Córdoba. Para más información, visite el sitio <https://rdu.unc.edu.ar/>  
Esta iniciativa está a cargo de la OCA (Oficina de Conocimiento Abierto), conjuntamente con la colaboración de la Prosecretaría de Informática de la Universidad Nacional de Córdoba y los Nodos OCA. Para más información, visite el sitio <http://oca.unc.edu.ar/>

---



La macroautofagia como mecanismo modulador del desarrollo tumoral adenohipofisario: evidencias morfológicas y moleculares por Laura Anahí Cecenarro se distribuye bajo una Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**  
**CENTRO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA**



*“LA MACROAUTOFAGIA COMO MECANISMO MODULADOR  
DEL DESARROLLO TUMORAL ADENOHIPOFISARIO:  
EVIDENCIAS MORFOLÓGICAS Y MOLECULARES”*

Trabajo de Tesis para optar al

Título de Doctor en Medicina y Cirugía

Médica Cirujana: Laura Anahi Cecenarro

E-mail: [lacecenarro@gmail.com](mailto:lacecenarro@gmail.com)

Director: Jorge Humberto Mukdsi

19 AGOSTO 2021

CÓRDOBA, REPÚBLICA ARGENTINA



Título por autor o creador se distribuye bajo una licencia Licence Creative Commons  
Atribución- NoComercial-SinDerivar- 4.0 Internacional.

## **COMISIÓN DE SEGUIMIENTO DE TESIS**

Director:

**Prof. Dr. Jorge H. Mukdsi**

Prof. Asociado del Centro de Microscopía Electrónica.

Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.

Integrantes:

**Prof. Dr. Juan P. Petiti**

Prof. Adjunto del Centro de Microscopía Electrónica.

Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.

**Prof. Dra. Carolina Fux-Otta**

Dirección del Departamento de Endocrinología y Diabetes del Hospital

Universitario de Maternidad y Neonatología de Córdoba.

Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.

**Artículo 30° del Reglamento de la Carrera de Doctorado en Medicina y Cirugía**

“LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS NO SE HACE SOLIDARIA CON LAS  
OPINIONES DE ESTA TESIS”

El presente trabajo de investigación se ha realizado en el Centro Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba, de acuerdo con la reglamentación vigente en la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba para optar al título de Doctor en Medicina y Cirugía.

Durante la ejecución, la autora fue Profesora Asistente del Centro de Microscopía Electrónica y contó con el apoyo financiero de subsidios del SECyT, CONICET, y FONCYT, otorgados al Centro de Microscopía Electrónica.

## AGRADECIMIENTOS

Recuerdo con exactitud el primer día que entré al Centro de Microscopía Electrónica, cargada de miedos y emociones, pero impulsada por una gran razón: mi pasión por la Glándula Hipófisis. Tuve la fortuna de poder cruzarme en este camino de la ciencia con personas maravillosas que hicieron de cada día de trabajo, momentos de alegría y satisfacción. Allí estaba y está siempre, mi querido director, Prof. Dr. Jorge Mukdsi, mi maestro, no sólo en lo científico, sino también mi maestro de la vida. Gracias doc por su apoyo constante, su compromiso, por acompañarme siempre con una sonrisa y por contagiar esa energía increíble que motiva a crecer y ser un poco mejor cada día. Usted es un gran ejemplo para mí y para todos los que buscamos saber más allá de lo que está escrito en los libros.

Otra de las personas maravillosas que merece todo mi agradecimiento es mi amiga y compañera Dra. Gabi Moyano Crespo, que con todo el amor y paciencia del mundo me enseñó cada una de las técnicas necesarias para llevar a cabo esta Tesis. Gracias infinitas Gabi querida, por no dejarme sola nunca, por darme aliento cada vez que las cosas no salían como esperábamos, por animarme a avanzar a pesar de las adversidades y por ser la mejor co-equiper que se puede tener.

Muchas gracias Dra. Alicia Torres, por abrirme las puertas del CME para desarrollar este proyecto y por confiar en mí como parte del grupo humano que Ud. dirige.

Agradezco también, a los profesores Dr. Juan Petiti y Dra. Carolina Fux, miembros de la Comisión de Seguimiento, por sus aportes científicos y por la corrección del manuscrito de esta Tesis de Doctorado.

A mis compañeros y amigos, Carito G., Flor, Pablo y Nahuel por su apoyo y asesoramiento oportuno, por animarme a seguir y salvarme en esas dudas metodológicas que surgían en la mesada de C7, siempre alegres y pacientes conmigo.

A mi compañera de equipo Eri y a las chicas de microtomía: Luci, Caro L., Tule y Vicky por siempre estar al pie de cañón para cada situación.

A Sofi y Nati, amigas y compañeras, gracias por el apoyo de cada día y por el soporte emocional tan necesario para el alma.

A cada uno de los tesistas, investigadores y becarios, con los pude compartir no sólo proyectos y mesada, sino también miedos y frustraciones, gracias por esa red que sostiene y ayuda a avanzar, de alguna manera todos colaboraron para que este proyecto pudiese ser una realidad.

A todos los profesores del CME, que hacen de la ciencia un motor y un modelo de vida, gracias por su ejemplo de dedicación, compromiso, por las sabias palabras y consejos que me dieron.

Muchas gracias a Oscar por su imprescindible labor en el bioterio y al equipo de ingeniería: Néstor, Marcos y Agustín que ponen toda su dedicación para el correcto funcionamiento del microscopio electrónico.

Quiero agradecer también a quien fuera mi primera instructora en el camino de la investigación científica, mi querida Dra. Ruth Fernández, quien sembró esa primera semilla allá lejos en los tiempos de ayudantía en el Departamento de Admisión de la FCM, y supo aconsejarme y motivarme a seguir en esta vía del conocimiento.

No puedo dejar de agradecer a quien me dio las primeras lecciones en neuroendocrinología y avivó mi pasión por la Hipófisis, abriéndome muchas puertas en esta área de la profesión, Dra. Paula Estario: gracias de corazón por todo lo que me enseñaste durante mis años de residencia en el Hospital Córdoba y por contactarme con quien es hoy mi director de Tesis.

A mis amigas de la vida, siempre presentes e incondicionales conmigo en cada momento, gracias por acompañarme en la magia de lo cotidiano.

Finalmente, quiero agradecer a quienes están del otro lado, en el lugar más importante de mi corazón, siempre apoyando y alentando mis sueños a pesar de los kilómetros que nos separan, mi amada familia: mamá, papá y a mis hermanos del alma, infinitamente gracias por todo siempre, los amo!!!

*“Hay una fuerza natural dentro de cada uno de nosotros  
que es nuestro mayor sanador”*

*Hipócrates*



## ÍNDICE

RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	11
ABREVIATURAS.....	12
INTRODUCCIÓN.....	16
Autofagia: definición.....	16
Tipos de Autofagia.....	17
Mecanismos moleculares del proceso autofágico.....	19
Etapas del flujo autofágico.....	20
Regulación de la macroautofagia.....	24
Macroautofagia en procesos patológicos y progresión neoplásica.....	27
-Enfermedad cardiovascular.....	28
- Enfermedades neurodegenerativas.....	28
- Cáncer.....	29
p53 y p21 en cáncer y macroautofagia.....	30
Glándula hipófisis normal y macroautofagia.....	32
Epidemiología, clasificación y patogenia de adenomas hipofisarios: rol de la macroautofagia.....	34
Autofagia y adenomas hipofisarios.....	37
HIPÓTESIS.....	41
OBJETIVOS.....	42
Objetivo General.....	42
Objetivos Específicos.....	42
MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
Diseño experimental básico .....	43
Diseño metodológico aplicado en adenomas hipofisarios humanos .....	44
Métodos de monitoreo de autofagia .....	45
Metodologías utilizadas en ambos diseños.....	46
Análisis morfológico con microscopía fotónica.....	46
Caracterización ultraestructural por microscopía electrónica de transmisión.....	47
Estudio inmunohistoquímico a nivel de microscopía fotónica en parafina.....	47

Estudio inmunocitoquímico a nivel de microscopía confocal.....	50
Inmunolocalización a nivel de microscopía electrónica de transmisión .....	51
Técnica de Western Blotting .....	52
Análisis estadístico.....	54
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>55</b>
Investigación básica .....	55
Caracterización del modelo experimental de prolactinoma experimental inducido por estrógenos.....	55
Expresión de moléculas reguladoras del ciclo celular en lesiones proliferativas adenohipofisarias inducidas por estrógenos.....	58
Evidencias ultraestructurales de macroautofagia en lesiones proliferativas adenohipofisarias inducidas por estrógeno .....	60
Expresión de Beclina 1 y LC3 en lesiones proliferativas adenohipofisarias inducidas por estrógeno.....	61
Expresión de LC3 a nivel ultraestructural en lesiones proliferativas inducidas por estrógeno.....	62
Semicuantificación de Beclina 1 mediante la técnica Western Blotting.....	63
Semicuantificación de LC3 mediante la técnica Western Blotting.....	64
Correlación de p53 y p21 con Beclina 1 y LC3 en lesiones proliferativas inducidas por estrógeno.....	65
Investigación aplicada.....	67
Datos clínicos patológicos de la cohorte de adenomas hipofisarios humanos funcionantes analizados.....	67
Análisis subcelular de adenomas hipofisarios humanos: evidencias ultraestructurales de macroautofagia.....	70
Expresión de Beclina 1 y LC3 en adenomas hipofisarios humanos.....	70
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>76</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>92</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>94</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>128</b>

## RESUMEN

La autofagia es un proceso de autodegradación celular, caracterizado por la formación de vesículas que secuestran componentes celulares que se degradan en los lisosomas. Las proteínas Beclina 1 y LC3 participan en las fases de activación y formación del autofagosoma por lo que ambas se consideran marcadoras fundamentales del proceso. Los tumores adenohipofisarios son lesiones proliferativas benignas frecuentes del SNC, aunque algunos pueden ser localmente agresivos y dar metástasis. Los reportes con relación a la macroautofagia y tumorigénesis hipofisaria son muy escasos, por tal motivo nos propusimos analizar la participación de este mecanismo durante el desarrollo proliferativo adenohipofisario experimental y su relación con reguladores del ciclo celular y evaluar si está presente en adenomas hipofisarios humanos. Se utilizó un modelo de prolactinoma experimental en ratas de la cepa F344 estimuladas con benzoato de estradiol (BE) y un grupo de adenomas funcionantes humanos.

La estimulación con BE indujo un proceso proliferativo hiperplásico/adenomatoso, en el que se apreció a nivel subcelular, elementos vesiculares compatibles con autofagosomas. Se evidenció un incremento significativo de las moléculas reguladoras del ciclo celular p53 y p21 en todos los tiempos de estimulación respecto al control. Beclina 1 demostró su máximo nivel de expresión a los 20 días de estimulación (estadio hiperplásico-adenomatoso), mientras que LC3, a los 30 días (estadio adenomatoso glandular). Beclina 1 se correlacionó directamente con p53, y el incremento significativo de p21 se correlacionó positivamente con ambas moléculas marcadoras de autofagia. El 60% de los adenomas hipofisarios humanos presentó evidencias morfológicas ultraestructurales y moleculares (Beclina 1 y LC3) del mecanismo autofágico. Se demostró una asociación significativa entre el tamaño tumoral (macroadenoma) y la expresión de Beclina 1 y LC3.

En conclusión, la macroautofagia sería un mecanismo celular y molecular que participaría en el desarrollo adenomatoso hipofisario en interrelación con las moléculas reguladoras del ciclo celular, vinculándose al mayor tamaño de las lesiones y actuando posiblemente en el control del crecimiento tumoral. Esto la convierte en un proceso de gran interés para la investigación endocrinológica y un posible blanco terapéutico.

## ABSTRACT

Autophagy is a process of cellular self-degradation, which is characterized by the formation of vesicles which sequester intracellular components to degrade in the lysosome. The Beclin 1 and LC3 proteins are involved in the activation and formation of the autophagosome phases, being both molecules considered essential markers to monitor this process. Pituitary tumours are very common and benign, although some of them can be locally aggressive and metastasize. There are few reports of the participation of macroautophagy in pituitary tumorigenesis, for this reason we decided to analyze this mechanism in an experimental model and its association with cell cycle regulators and to evaluate whether it is present in functioning human pituitary adenomas.

An experimental prolactinoma model was used stimulating with estradiol benzoate (BE) Fischer 344 rats and a group of human functioning adenomas (n: 33) was analyzed. Stimulation with BE induced a hyperplastic adenomatous proliferative process, with vesicular elements compatible with autophagosomes at the subcellular level. A significant increase compared with control was evident in regulatory molecules of the cell cycle p53 and p21 ( $p < 0.05$ ). Beclin 1 demonstrated the highest at 20 days of stimulation (hyperplastic adenomatous stage), while LC3 at 30 days (adenomatous glandular stage). Beclin 1 demonstrated a direct correlation p53, and p21 significant increase was positively correlated to both marker molecules autophagy. The 60% human pituitary adenomas evidenced ultrastructural morphological and molecular (Beclin 1 and LC3) signs of the autophagic mechanism. A significant association between tumour size (macroadenoma) and expression of Beclin 1 and LC3 was demonstrated.

In conclusion, macroautophagy is a cellular and molecular mechanism that participates in the pituitary adenomatous development associated with the regulatory molecules of the cell cycle, being linked to the macroadenomas, and acting on the control of tumour growth, being a process of great interest for clinic and endocrinological research as a possible therapeutic target.

## ABREVIATURAS

µg: Microgramo

µl: Microlitro

ADN: Acido desoxirribonucleico

ADP: Adenosina difosfato.

AMBRA 1: Activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1

AMP: Adenosina monofosfato

AMPK: Proteína quinasa activada por AMP

AKT: Serina treonina proteína quinasa

ARF: ADP-ribosylation factor

ARN: Ácido ribonucleico

ATP: Adenosina trifosfato

Atg: Proteínas relacionadas con la autofagia

Bcl2: B-cell lymphoma 2. Proteina inhibidora de Beclina 1

BECN 1: Gen que codifica la proteína Beclina 1

Bif- 1: Bax-interacting factor 1

BNIP3: Proteína 3 miembro de la familia de proteínas Bcl 2.

BRC: Bromocriptina

Brg1: Brahma-related gene-1

°C: Grado Celsius

C: Control

CAB: Cabergolina

cm: Centímetro

CMA: Autofagia mediada por chaperonas

CQ: Cloroquina

CS: Células Stem

d: Día

DAB: Diaminobencidina

DE: Desvío estándar

DKC1: Dyskerin pseudouridine synthase 1

DRD5: Receptor dopaminérgico D5

DRAM: DNA damage-regulated autophagy modulator protein 1  
E2: 17  $\beta$  estradiol  
EGF: Factor de crecimiento epidérmico.  
ERKs: Extracellular signal-regulated kinases  
ESR1 y ESR2: Receptores nucleares de estrógenos tipo 1 y 2  
FADD: Fas-associated protein with death domain  
FE: Fosfatidiletanolamina  
FGF4: Factor de crecimiento fibroblástico 4  
g: Gramos  
GDP: Guanosina difosfato  
GH: Del inglés: Growth Hormone (Hormona de crecimiento)  
GH3: Línea celular de hipófisis de rata que expresa el factor de transcripción Pit-1.  
GNAS1: Genes para codificación de proteína G  
GPER1: Receptores de membrana acoplados a proteína G  
GTP: Guanosina trifosfato  
GTPasa: Enzima guanosina trifosfatasa  
h: Hora  
H/E: Hematoxilina Eosina  
HCQ: Hidroxicloroquina  
HCT-116: Human colon cancer cell line  
HIF-1 $\alpha$ : Factor-1 $\alpha$  inducible por hypoxia  
HMGB 1: High mobility group box 1 protein  
HSP: Proteínas de choque térmico  
HSPA 8: Miembro 8 de las proteínas de choque térmico A  
ICQ: Inmunocitoquímica  
IF: Inmunofluorescencia  
IHQ: Inmunohistoquímica  
IP3: Inositol 1,4,5-trifosfato  
IP3R: Inositol trisphosphate receptor  
LAMP-2: Lysosome-associated membrane protein 2  
LC3: Proteína 3 de cadena ligera asociada a microtúbulos

LPS: Lipopolisacáridos  
MET: Microscopía electrónica de transmisión  
mg: Miligramos  
min: Minutos  
ml: Mililitro  
mTOR: Mammalian Target of Rapamycin  
mTORC1: Complejo 1 del diana de rapamicina en mamíferos  
mtESR: Receptores estrogénicos mitocondriales  
nm: Nanómetros  
NO: Óxido nítrico  
NOS3: Enzima óxido nítrico sintasa 3  
p62/ SQSTM1: Secuestoma 1  
PBS: Phosphate buffered saline  
PINK 1: PTEN-induced kinase 1  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
Palb2: Partner and localizer of BRCA2.  
PKA: Proteína quinasa A dependiente de AMPc  
PTEN:Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa  
PUMA: p53 upregulated modulator of apoptosis  
Rab7: Ras-related protein Rab-7  
RE: Retículo endoplásmico  
ROS: Especies reactivas de oxígeno  
s: Segundos  
SLAM: Signaling lymphocytic activation molecule  
SMS 201–995: Octreotide  
SRL: Análogos de somatostatina  
TGF-B: Factor de crecimiento transformante beta  
TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand  
ULK1: Unc-51-like kinase 1. Proteina del complejo iniciador de autofagia.  
UVRAG: UV Radiation Resistance Associated Gene. Gen asociado a la resistencia a la radiación UV.

VMP 1: Vacuole membrane protein 1

WB: Western Blotting



# INTRODUCCIÓN

## AUTOFAGIA: DEFINICIÓN

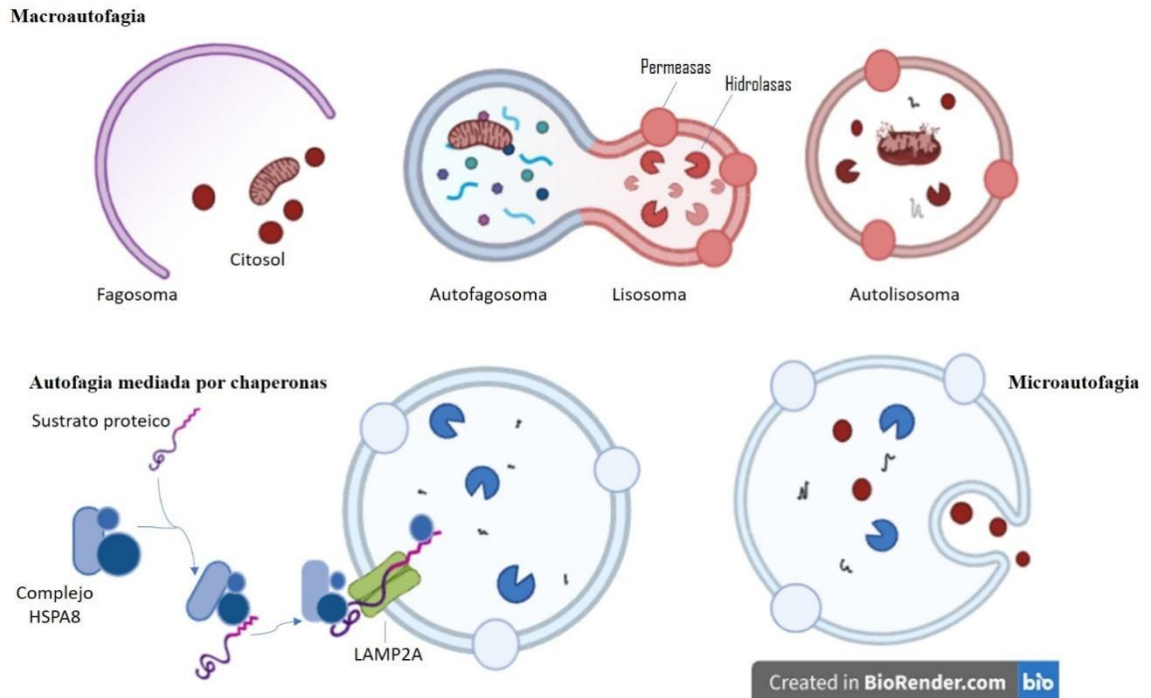
Autofagia es un término que proviene del griego antiguo “αὐτόφατος” y significa “autoalimentación”. El mismo hace referencia a los procesos por los cuales los componentes celulares disfuncionales se degradan dentro de la célula a través de la acción de las enzimas lisosomales. Los elementos del citoplasma, incluidas organelas, son secuestradas y se trasladan a la luz de los lisosomas, donde se descomponen en partículas básicas y se devuelven al citosol para su reutilización. La autofagia es una propiedad morfológica común en las células agónicas y, por lo tanto, se presumió durante mucho tiempo como una vía de muerte celular. Sin embargo, una de sus funciones principales es mantener las células vivas bajo condiciones estresantes que de otra manera podrían conducir a la muerte celular (1). La autofagia participa en situaciones fisiológicas cumpliendo una serie de funciones vitales, como la homeostasis de los aminoácidos durante la falta de nutrientes, el desarrollo embrionario previo a la implantación, el envejecimiento, la eliminación de patógenos intracelulares y regulación de la inmunidad innata y adaptativa (2). Así también, ha sido ampliamente implicada en procesos patológicos como el cáncer, trastornos metabólicos y neurodegenerativos, enfermedades cardiovasculares y pulmonares (3). La autofagia tiene la característica de regularse en forma dinámica. Su actividad suele ser baja en condiciones basales, pero hay una serie de estímulos que pueden conducir a su activación. La escasez de nutrientes es el inductor más conocido de la autofagia, pero otros estímulos de estrés biológico como la hipoxia, el agotamiento de energía, la estimulación hormonal o los agentes farmacológicos también pueden incrementar su actividad en las células (4).

Las respuestas autofágicas que caracterizan a este proceso son: (a) participación de material y maquinaria citoplasmática; y (b) dependencia estricta de la degradación lisosomal. Aunque los sustratos de la autofagia pueden ser endógenos, como mitocondrias dañadas y fragmentos nucleares, o exógenos, como virus o bacterias que escapan de los fagosomas, siempre actúa a través de estructuras membranosas de acceso libre a las proteínas citosólicas (5). Esta característica es importante para

discriminar las respuestas autofágicas de otras vías de tráfico vesicular que se originan en la membrana plasmática y que también culminan en la degradación lisosomal. Dichos procesos endocíticos (que se han denominado como "heterofagia" en el pasado), incluyen la fagocitosis (absorción de material particulado por macrófagos y células dendríticas inmaduras u otras células); la endocitosis mediada por receptores (captación de material extracelular impulsado por receptores de membrana plasmática) y la pinocitosis (captación relativamente inespecífica de fluidos extracelulares y moléculas pequeñas) (6) (7).

### TIPOS DE AUTOFAGIA

Al presente se han definido tres tipos de autofagia en células de mamíferos: microautofagia, autofagia mediada por chaperonas (CMA), y macroautofagia. Si bien cada una es morfológicamente distinta (**Figura 1**), las tres culminan en la entrega de carga al lisosoma para su degradación y reciclaje (8).



**Figura 1:** Esquema que representa los tres tipos de autofagia en células eucariotas. En la macroautofagia se origina *denovo* una vesícula de doble membrana, el autofagosoma. En la autofagia mediada por chaperonas, proteínas mal plegadas son transportadas directamente a través de la membrana del lisosoma. La microautofagia implica la captación directa de los elementos a fagocitar a través de invaginaciones de la membrana lisosomal. Adaptado de (9) Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*. 2014. 20;20(3):460-73). Diseño realizado en BioRender.com

### Microautofagia

Es una forma de autofagia descrita en plantas, así como en células de mamíferos (10) (11), donde las porciones citoplasmáticas destinadas a la degradación son directamente invaginadas a través de la membrana lisosómica. La microautofagia es importante en el mantenimiento del tamaño de las organelas, la homeostasis de la membrana y la supervivencia celular bajo restricción de nitrógeno (12).

### Autofagia mediada por chaperona

La CMA implica el traspaso directo de proteínas citosólicas al lisosoma para su degradación. Su característica distintiva es que no se requiere de vesículas ni

invaginaciones de membrana para alcanzar a los lisosomas, ya que utiliza un complejo proteico de translocación en la membrana de estos (13).

En la CMA se degradan proteínas solubles que tienen la secuencia KFERQ de 5 aminoácidos (Lys-PHe-Glu-Arg-Gln), unido a HSPA8 (14). Se ha demostrado que la CMA opera sobre una multitud de proteínas citosólicas, por lo que ejerce funciones reguladoras importantes en diferentes escenarios fisiopatológicos como el metabolismo (15) (16), la preservación de la integridad del genoma (17), envejecimiento (18) (19) (20), activación de células T (21), neurodegeneración (22) y oncogénesis (23).

### Macroautofagia

La macroautofagia (o simplemente autofagia) es distinta de la microautofagia y la CMA, porque el sitio inicial de secuestro ocurre lejos de la membrana del lisosoma e involucra la formación de vesículas citosólicas que transportan la carga a esta organela. La característica morfológica que hace que la macroautofagia sea única de otros procesos de tráfico mediados por vesículas intracelulares, es que las vesículas secuestrantes, denominadas autofagosomas, se forman *denovo*, es decir, por expansión y no en una organela preexistente, que ya contiene carga (24).

### MECANISMOS MOLECULARES DEL PROCESO AUTOFÁGICO

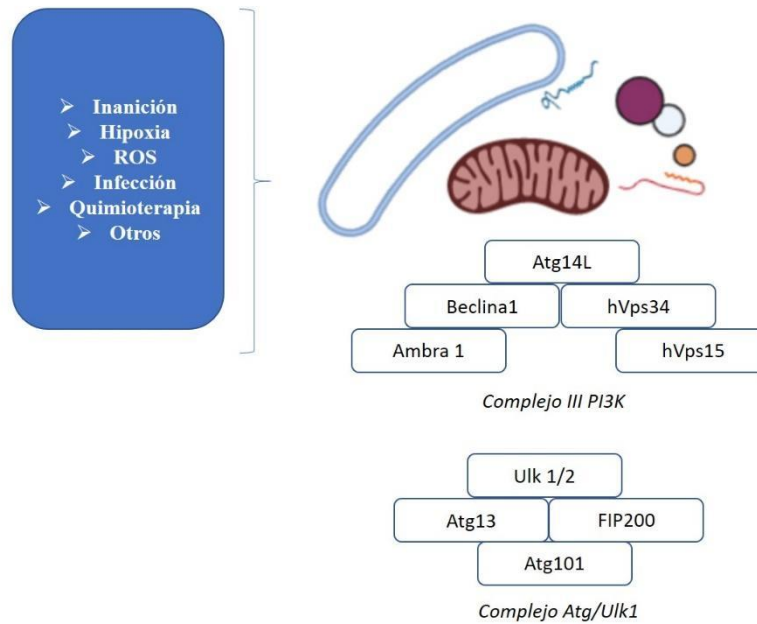
El proceso de autofagia comienza con una estructura de membrana en expansión denominada fagóforo que envuelve porciones del citoplasma. Esto conduce a la formación de una vesícula secuestrante de doble membrana, denominada autofagosoma. Estos se fusionan posteriormente con lisosomas, liberando su contenido a la luz lisosomal y conformando el autolisosoma. La parte interna de la membrana del autolisosoma, junto con la carga se degrada, y las macromoléculas resultantes se liberan al citosol a través de permeasas para su reciclaje (25).

## ETAPAS DEL FLUJO AUTOFÁGICO

### *1. Inducción y formación del fagóforo*

El mecanismo molecular de la autofagia involucra varias proteínas Atg (proteínas relacionadas con la autofagia). El fagóforo es un compartimiento secuestrador primario de doble membrana que se forma en respuesta a varios estímulos: inanición de nutrientes, hipoxia, presencia de ROS, infección, daño en el ADN entre otros (26). La fuente de membrana que constituye el fagóforo es muy debatida, pero varios estudios han implicado a la membrana plasmática (27) (28), al RE (30), al complejo de Golgi (31) y las mitocondrias (32) como posibles fuentes. A medida que el fagóforo se expande, la membrana se dobla para finalmente generar un autofagosoma esférico. En este paso de iniciación participan dos complejos de proteínas: uno contiene al PI3K clase III/ Vps34, Atg6/Beclina1, Atg14 y Vps15/p150, y el otro complejo incluye una serina-treonina quinasa Atg1/ULK1 que es un regulador positivo esencial de la formación de autofagosomas (**Figura 2**). Cuando los nutrientes son abundantes, la unión del complejo ULK1 a mTORC1 inhibe la autofagia. El mTORC1 es un regulador negativo muy importante de este mecanismo. Al fosforilar ULK1, mTOR inhibe el inicio de la autofagia. En situaciones de inanición o insuficiencia de energía, mTORC1 se disocia del complejo ULK1, liberándolo para desencadenar la nucleación y el alargamiento del autofagosoma. La actividad quinasa de Atg1 requiere la función de otras dos proteínas de autofagia, Atg13 o Atg8 y Atg17 (33). Beclina 1, homólogo de Atg6 en mamíferos, cumple un rol fundamental en la activación de la autofagia junto a PIK3 Clase III, y por ello se usan como moléculas marcadoras para monitorear este proceso. Entre las funciones de Beclina 1 se destaca su importante aporte para asegurar la estructura y función normal de los autofagosomas y para garantizar el correcto flujo de autofagia (34). En este sentido Beclina 1 interactúa con diferentes cofactores (Atg14L, UVRAG, Bif-1, Rubicon, Ambra1, HMGB1, nPIST, VMP1, SLAM, IP3R, PINK y survivin) para formar los complejos de iniciación de autofagia y también se inhibe al unirse a la proteína antiapoptótica Bcl2 (35). La autofagia se induce cuando Beclina 1 se libera de Bcl2, sin embargo, es

importante tener en cuenta que la autofagia también puede inducirse de manera independiente de Beclina 1 (36).



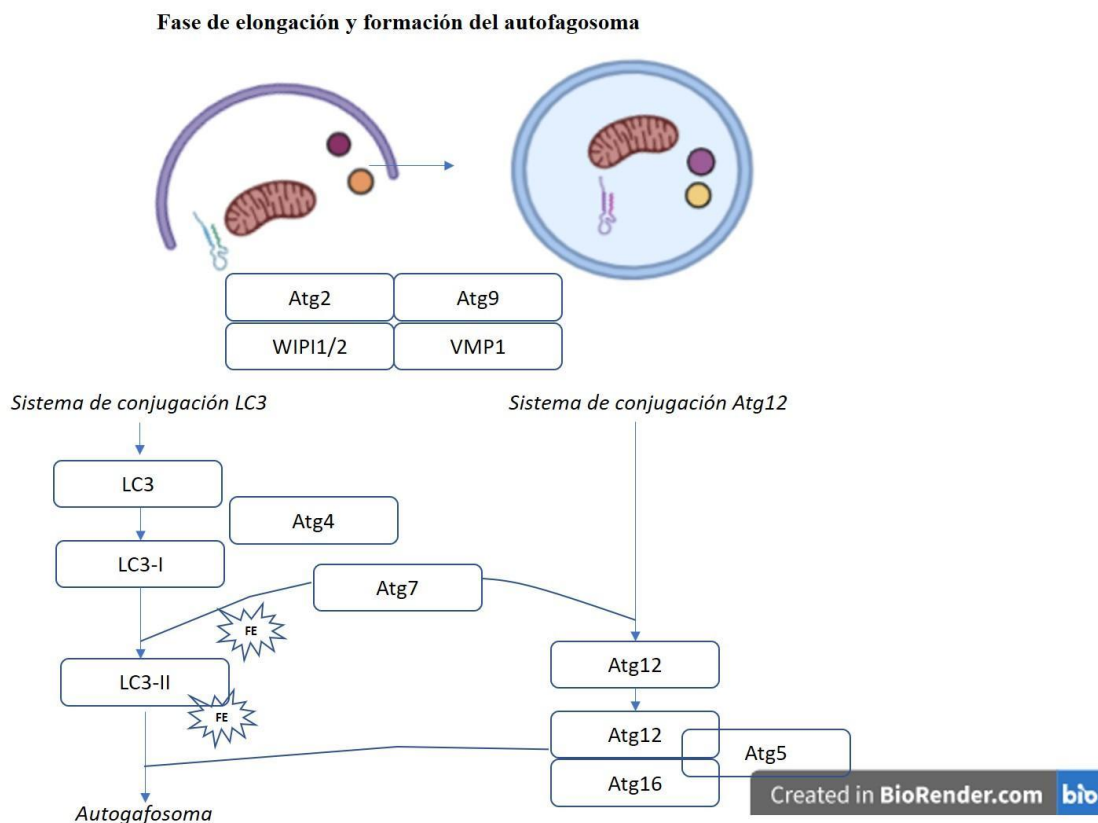
Created in BioRender.com bio

**Figura 2:** Esquema de la inducción y formación de fagóforo. En estos procesos participan diversas clases de estímulos y dos complejos multiproteicos. Diseño realizado en BioRender.com

## 2. Formación del autofagosoma

La extensión del fagóforo resulta en la formación del autofagosoma, que es también un orgánulo de doble membrana. Este es un paso de simple secuestro y no se produce degradación enzimática. Para esta etapa se requieren dos vías de conjugación de tipo ubiquitina, ambas catalizadas por Atg7 (**Figura 3**). La primera conduce a la conjugación de Atg5-Atg12 que luego forma un complejo multimérico con Atg16L que posteriormente se asocia con la membrana externa del autofagosoma (37). La conjugación Atg5-Atg12 no depende de la activación de la autofagia y una vez que se forma el autofagosoma, el complejo Atg5-Atg12-Atg16L se disocia de la membrana, por lo que se convierte en un marcador relativamente insuficiente de autofagia (38). El

segundo sistema implicado en la formación del autofagosoma da como resultado el procesamiento de la proteína 3 de cadena ligera asociada a microtúbulos (LC3) (conjugación con FE), que está codificada por su proteína homóloga en levaduras: Atg8.



**Figura 3:** Esquema de la fase de elongación y formación del autofagosoma. Participan dos sistemas de conjugación, uno de ellos requiere el procesamiento de LC3 mediado por Atg7. FE: fostatidiletanolamina. Diseño realizado en BioRender.com

Tras la inducción de la autofagia, LC3, expresada en la mayoría de los tipos celulares como una proteína citosólica, es fragmentada proteolíticamente por Atg4 para generar LC3-I (16 kDa) que será activada por Atg7 y luego transferida a Atg3 seguido de conjugación a fostatidiletanolamina(FE) para generar LC3-II (18 kDa). La LC3-II procesada se recluta en el fagóforo en crecimiento, dependiendo su integración de Atg5-Atg12. A diferencia de Atg5-Atg12-Atg16L, LC3-II se encuentra tanto en la superficie interna como en la externa del autofagosoma, donde es necesaria para la

expansión y terminación de la membrana autofágica y juega un papel importante en la selección de carga para la degradación, como así también en la fusión del autofagosoma con el lisosoma (39). Durante la autofagia se incrementa la síntesis y el procesamiento de LC3. Después del cierre del autofagosoma, el complejo Atg16-Atg5-Atg12 se disocia del mismo, mientras que una proporción de LC3-II permanece unida covalentemente a la membrana y, por lo tanto, se la considera un excelente marcador de autofagia y es la proteína más estudiada con relación a este proceso. A continuación, el autofagosoma completo está listo para fusionarse con el lisosoma y Atg4 escinde el LC3-II unido a la membrana externa del FE y lo libera nuevamente al citosol (33).

El tamaño del autofagosoma varía según el organismo y el tipo de carga. En levaduras mide aproximadamente de 0.4 a 0.9  $\mu\text{m}$  y en mamíferos de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$  (40).

### 3. *Fusión con el lisosoma*

Cuando el autofagosoma llega a su destino, su membrana externa se fusiona con la membrana lisosomal (41). El producto de esta unión en las células de mamíferos se denomina autolisosoma, requiriendo de la proteína de membrana lisosómica LAMP-2 y GTPasa Rab7 (24) (**Figura 4**).

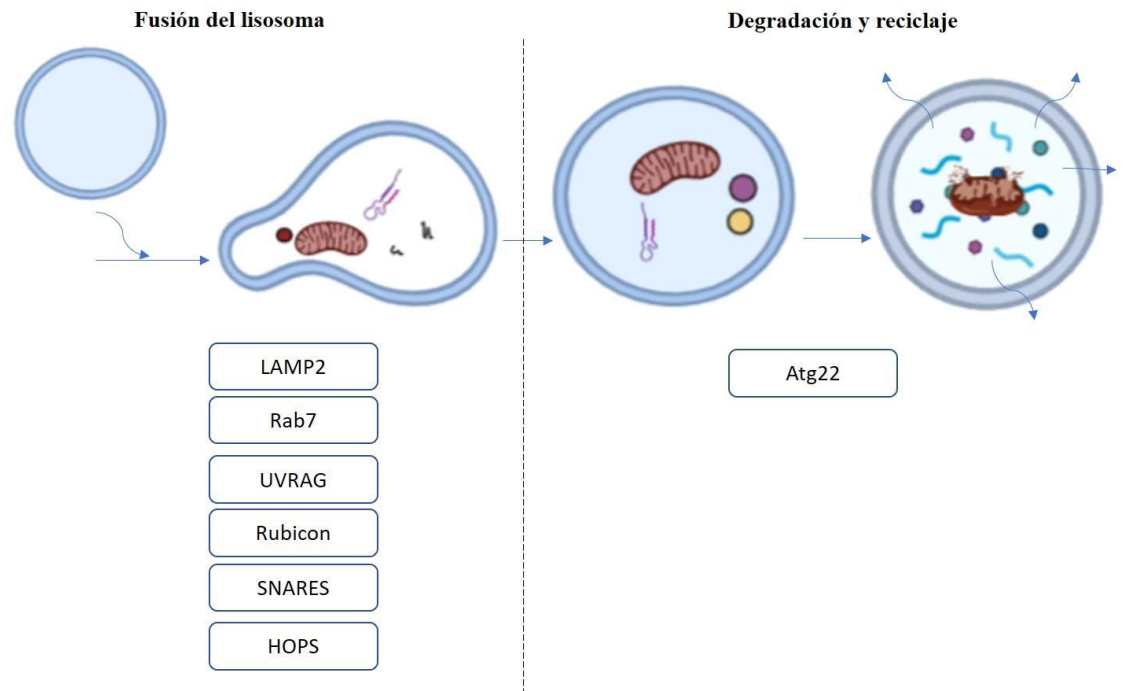
### 4. *Degradación y reciclado del material fagocitado*

Finalmente, la membrana interna del autolisosoma y la carga autofágica se exponen a la acidez y a las hidrolasas lisosomales, donde son degradadas y posteriormente los componentes resultantes se exportan de nuevo al citoplasma a través de permeasas para ser reutilizados por la célula en procesos biosintéticos o para generar energía (42).

Se identificaron a Atg22 y otras permeasas vacuolares (Avt3 y Avt4) como transportadores de aminoácidos durante el proceso de autofagia en levaduras, contribuyendo a comprender los mecanismos del reciclaje de nutrientes. Estas permeasas participan del último paso en el proceso de degradación y reciclaje (43) (**Figura 4**).



En mamíferos la autofagia a menudo converge con la vía endocítica, por lo tanto, antes de la fusión con los lisosomas, los autofagosomas también pueden fusionarse con los endosomas tempranos o tardíos para formar anfisomas, que luego se fusionan con los lisosomas para convertirse en autolisosomas (44).



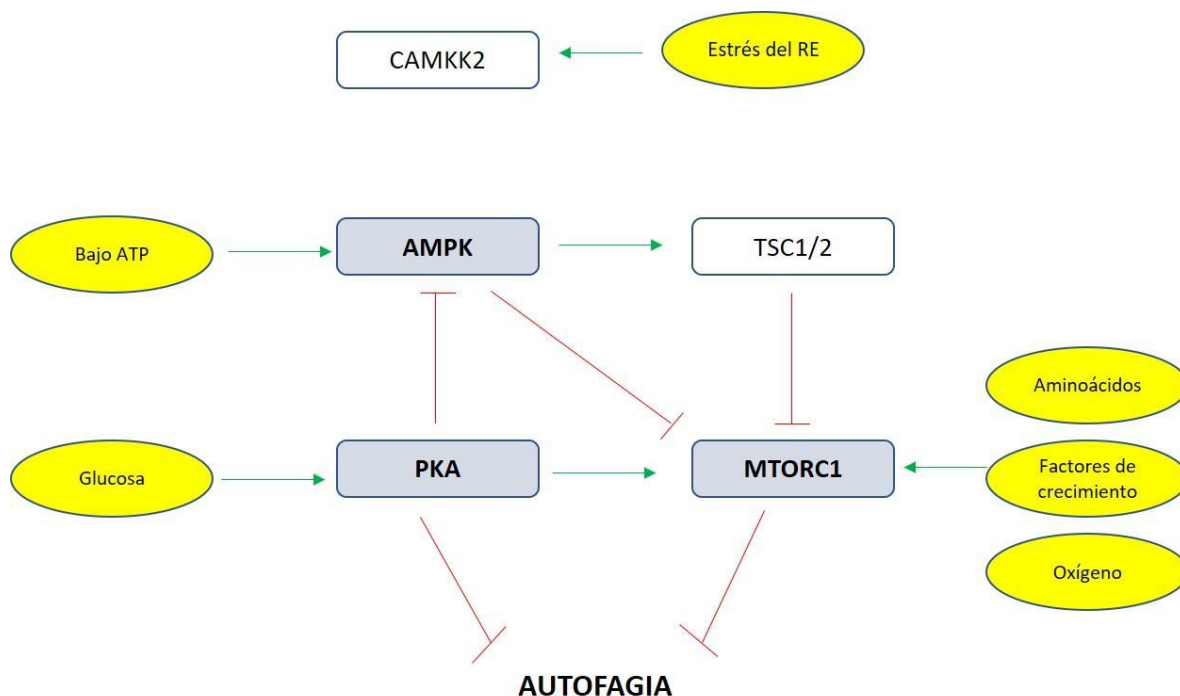
**Figura 4:** Esquema de las fases de fusión con el lisosoma y degradación del material fagocitado. Luego los componentes resultantes son devueltos al citosol para reutilizarse. Diseño realizado en BioRender.com

### REGULACIÓN DE LA MACROAUTOFAGIA

La macroautofagia ayuda a las células a responder a una amplia gama de situaciones estresoras intra y extracelulares (26) (**Figura 5**).

Para analizar la regulación molecular de este proceso tomaremos como ejemplo el estado de inanición por la falta de nutrientes a nivel celular. En esta situación fisiopatológica participan dos vías: PKA y mTOR. Estas vías detectan principalmente

carbono y nitrógeno, respectivamente (45). En mamíferos, la inhibición de la macroautofagia ocurre al menos parcialmente a través de la fosforilación de LC3 por PKA (46). Por otro lado, los aminoácidos regulan las proteínas RAG, pequeñas GTPasas relacionadas con RAS el que activa mTORC1 (47).



**Figura 5:** Regulación de la macroautofagia. En este esquema se aprecian tres de los principales reguladores de la macroautofagia: PKA, AMPK y mTORC1. Las flechas verdes y las barras rosas indican activación o inhibición de una molécula blanco, respectivamente. (Adaptado de Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*. 2014. 20; 20(3):460-73). Diseño realizado en BioRender.com

Se han descrito algunas intercomunicaciones entre las vías de detección de carbono y nitrógeno, en estudios que demostraron que PKA puede fosforilar y, por lo tanto, activar mTORC1 (48). PKA también puede activar indirectamente mTORC1 a través de la inactivación de AMPK (49). AMPK no es simplemente un sustrato de PKA, es la principal quinasa sensible a la energía celular y responde a los niveles intracelulares de AMP/ATP para regular una variedad de procesos celulares, incluida la macroautofagia (50). Bajos niveles de energía inducen a AMPK que fosforila y activa

el complejo TSC1/2, inhibiendo indirectamente la actividad de mTORC1 (51) pero, alternativamente, AMPK puede inhibir directamente mTORC1 (8). Varios estudios demuestran que AMPK fosforila y activa ULK1 para inducir macroautofagia (52)(53)(54). También se ha observado que un aumento en las concentraciones citosólicas de  $Ca^{2+}$  resultantes del estrés del RE, conducen a que la proteína quinasa 2 dependiente de calcio / calmodulina beta (CAMKK2/CaMKK $\beta$ ) active AMPK e induzca macroautofagia (55). Otra forma en que el estrés del RE puede inducir macroautofagia es a través de la señalización de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). La acumulación de estas proteínas en el RE puede ser causada por una variedad de factores estresantes celulares e inducir macroautofagia. Sin embargo, el papel de la macroautofagia en respuesta al estrés del RE no está totalmente claro, ya que algunos estudios informan que mejora la supervivencia celular, mientras que otros sugieren que puede provocar la muerte celular autofágica (56). Además de la señalización de insulina y aminoácidos, se ha informado sobre la participación de otros factores en la regulación de la autofagia. Estos incluyen Bcl2, ROS, BNIP3, p19 ARF, DRAM, calpaína, TRAIL, FADD y IP3 (40). Otros reguladores de la autofagia incluyen UVRAG (gen asociado a la resistencia a la irradiación UV), que interactúa a través de la región en espiral de Beclina 1. Se demostró que UVRAG es miembro del complejo PI3K clase III y un regulador positivo de la autofagia. Además, Ambra1, que se expresa principalmente en los tejidos neurales y es indispensable para el desarrollo normal del tubo neural, es una proteína que interactúa con Beclina 1 y demostró que regula positivamente la autofagia dependiente de esta molécula (36).

El 17  $\beta$  estradiol (E2) es el principal estrógeno endógeno en mamíferos y es una hormona que juega un papel importante no sólo en el desarrollo de las características sexuales secundarias femeninas, sino también en el desarrollo óseo, la protección del sistema cardiovascular y la homeostasis (57). Se ha demostrado que los estrógenos participan en los mecanismos de regulación de la autofagia (58) (59). El E2 puede promover este proceso en diferentes situaciones (60) (61), pero cuando el mismo ha sido estimulado por ejemplo por hipoxia, LPS, lesión de la médula espinal u ovariectomía, el E2 muestra un efecto restrictivo sobre la expresión de genes de Atg (62) (63) (64) (65).

A través de la vía clásica o genómica, los receptores estrogénicos (ESR) 1 y 2 regulan la expresión de genes diana, incluidos algunos que codifican para las Atg, por estímulos directos o indirectos de los factores de transcripción (66). Estos receptores de estrógeno se expresan de diferentes maneras en las células del organismo, cumpliendo funciones distintas según la localización y el estado fisiológico. Por ejemplo, al unirse con E2, activan la NOS3 a través de vías genómicas y no genómicas, respectivamente (67). El NO sintetizado de esta manera puede suprimir la expresión de mTOR e inducir autofagia (68).

Los mtESR se expresan en las mitocondrias de numerosas células humanas normales y tumorales (músculo cardíaco, epitelio del cristalino, osteosarcoma, hepatoma y cáncer de mama, entre otras) (69) (70) (71), e intervienen en la síntesis de proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial mediante la unión al E2 (72) (73) (74). Sin embargo, el destino de los mtESR y su papel durante la autofagia mitocondrial selectiva (mitofagia) aún no está claro. Tanto el ESR1 como GPER1 se distribuyen en los lisosomas de una manera dependiente de estrógeno, revelando la existencia para estos receptores de una vía de degradación asociada a los lisosomas (75) (76).

Por lo tanto, está comprobado que el E2 puede activar o inhibir la autofagia a través de la interacción con los ESR, genes de autofagia e incluso la regulación nuclear mediante modificaciones de histonas y que sus funciones dependen de la localización de sus receptores y el estado fisiopatológico celular (77).

### MACROAUTOFAGIA EN PROCESOS PATOLÓGICOS Y PROGRESIÓN NEOPLÁSICA

La respuesta autofágica ha sido demostrada en enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y en el cáncer. Sin embargo, su papel en estas patologías no está completamente descrito, ya que puede actuar en diferentes condiciones para favorecer la supervivencia como así también inducir la muerte celular. A continuación, se presentan algunos antecedentes en estas patologías.

### *Enfermedad cardiovascular*

Se han demostrado mecanismos de autofagia en casi todas las células diferenciadas, incluido el sistema cardiovascular. En condiciones normales, este proceso es esencial para el mantenimiento, reparación y adaptación del tejido cardíaco. El análisis de modelos de cardiopatía isquémica, ha demostrado que la autofagia funciona como un mecanismo favorecedor de supervivencia al adaptarse a las necesidades metabólicas cambiantes y eliminar las mitocondrias dañadas. Además, la inhibición de la autofagia puede exacerbar la disfunción y la remodelación cardíaca (78). Una vez que se restablecen el oxígeno y los nutrientes, la autofagia puede ser adaptativa o perjudicial para el tejido. Algunos estudios han demostrado que la reperfusión después de un evento isquémico conduce a un aumento de la autofagia lo que conduce a la muerte celular (79). Otro ejemplo es el de la hipertrofia cardíaca. En condiciones basales, la autofagia actúa como un mecanismo de defensa contra el envejecimiento de las células cardíacas y cuando se inhibe su actividad, el corazón desarrolla hipertrofia cardíaca y disfunción diastólica por un envejecimiento acelerado habiéndose evidenciado una disfunción de vías de señalización involucradas en la autofagia (80) (81). Por todo lo anterior, se entiende que el estudio de la vía autofágica conduciría a una mayor comprensión de la regulación de este proceso homeostático e identificaría nuevos blancos terapéuticos para la enfermedad cardíaca.

### *Enfermedades neurodegenerativas*

Se caracterizan por la acumulación de proteínas mutantes o tóxicas en el sistema nervioso (82) (83). La autofagia ayuda a la supervivencia celular eliminando las organelas celulares dañadas y la acumulación de proteínas alteradas. En las neuronas, las proteínas Atg están altamente expresadas, aunque los marcadores de actividad autofágica son bajos en comparación con otros tipos de células. La interrupción de genes específicos del proceso en células neurales conduce a la neurodegeneración (84) (85). También juega un papel muy importante en la regulación de la neurogénesis adulta y la plasticidad sináptica del cerebro interactuando con muchas vías que involucran este último mecanismo con los de la memoria (86). El cambio en la autofagia constitutiva de las neuronas, puede afectar el número y la

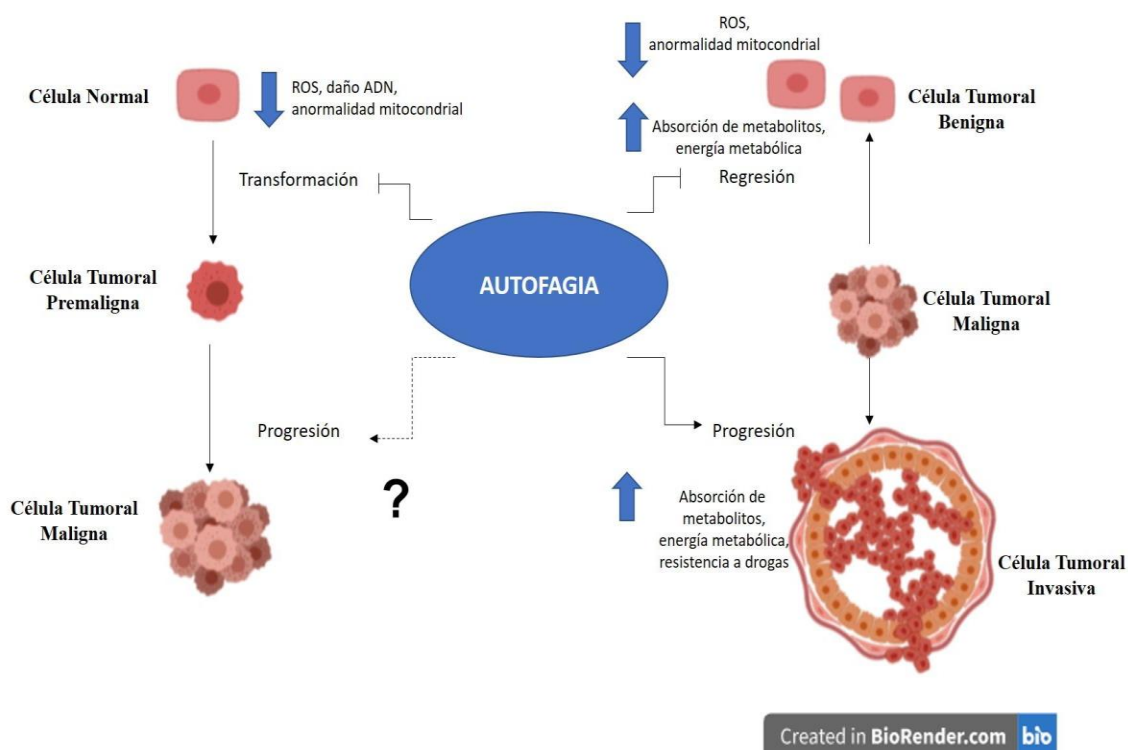
calidad de la plasticidad sináptica y la regulación de la señalización presináptica. Muchos trastornos del neurodesarrollo están asociados con la disfunción en las vías relacionadas con la autofagia (por ejemplo, mTOR). Este mecanismo también es necesario para el mantenimiento y la función de las células madre neurales adultas. La ablación de genes esenciales para la autofagia conduce a la pérdida progresiva de células madre neurales y al deterioro de la diferenciación neural (87).

### *Cáncer*

El papel de la macroautofagia en la neoplasia es complejo y puede variar según el tipo de tumor y sus estadios. Se vinculó este mecanismo por primera vez, a través del papel de Beclina 1, proteína que se ha asociado a la susceptibilidad tumoral (88). Se han identificado varias proteínas supresoras de tumores que participan en el control de la autofagia (p53, Bcl2, PTEN) (89) (90). Numerosos estudios sugieren que la regulación positiva de la autofagia puede ser un mecanismo de protección o un mecanismo alternativo de muerte celular debido a que en las células cancerosas la vía de apoptosis comúnmente se encuentra alterada (91) (92) (93). En las células normales, protege a las células de la transformación tumoral al eliminar las ROS, las organelas anormales y reducir el daño en el ADN. Sin embargo, una vez establecidas las células tumorales explotan el mecanismo autofágico para proporcionarles una forma de superar las condiciones limitantes de nutrientes y facilitar el crecimiento del tumor. La autofagia puede influir en el microambiente tumoral al promover la angiogénesis, suministrar nutrientes y modular la respuesta inflamatoria (94). De esta manera, las células tumorales pueden satisfacer la alta demanda metabólica del crecimiento mediante la activación autofágica favoreciendo el recambio y la absorción de metabolitos (95). La resistencia tumoral a la radio y quimioterapia también se asocian con autofagia. Varios tumores en modelos animales han confirmado que la inhibición de la autofagia tiene efectos en mejorar la quimiosensibilidad y promover la regresión tumoral. Estos hallazgos apuntan que la inhibición de la autofagia podría ser una estrategia viable para la intervención terapéutica.

De esta manera, el consenso actual es que la autofagia tiene un doble papel en el cáncer (96) (**Figura 6**). Algunos tipos de células cancerosas, por ejemplo, células

pancreáticas y de pulmón, dependen en gran medida de los beneficios del crecimiento asociados a la activación de la autofagia, por lo que se convierten en "adictas" a este mecanismo. La inhibición del proceso en estas células podría cambiar notablemente el destino celular y por lo tanto suprimir la tumorigénesis (97). Sin embargo, el límite entre la inhibición de la autofagia y su activación es muy estrecho y constituye una zona de peligro potencial. La ablación aguda de la autofagia conduce a la muerte de los animales de experimentación, a causa de infecciones, diabetes, neurodegeneración, distrofia muscular y la reducción de los depósitos de grasa (98), por lo que se debe ser muy cauteloso y evitar los posibles "efectos secundarios" de la supresión de la autofagia cuando se pretende usarla como terapia contra el cáncer (99).



**Figura 6:** En las células normales, la autofagia inhibe la transformación a células tumorales premalignas al reducir las especies reactivas de oxígeno (ROS), el daño del ADN, la agregación de proteínas y la anomalía mitocondrial, etc. En las células tumorales establecidas, la autofagia promueve su crecimiento al servir como un mecanismo de supervivencia celular. La evidencia reciente indica que la autofagia inhibe la regresión de las células tumorales malignas a tumores benignos. Aún no se ha determinado si la autofagia promueve la progresión de células tumorales premalignas a células tumorales malignas. Diseño realizado en BioRender.com

## p53 y p21 en CÁNCER Y MACROAUTOFAGIA

p53 es un potente supresor tumoral y factor de transcripción sensible al estrés, que puede inducir la muerte de células neoplásicas o inhibir su crecimiento al estimular la expresión de genes que promueven la apoptosis (por ejemplo, PUMA, Noxa, Bax) o el arresto del ciclo celular a través de p21 (100) (101) (102) (103).

Las funciones canónicas de p53 incluyen la inducción de apoptosis, detención del crecimiento y senescencia, en tanto que las no canónicas incluyen su capacidad de promover o inhibir la autofagia y regular el metabolismo. Una amplia gama de factores estresores activan a p53 que responde regulando la transcripción de genes, o actuando por mecanismos no transcripcionales, ya sea para ayudar en la adaptación al estrés (por ejemplo, detención del ciclo celular) o para eliminar las células que están más allá de la reparación por apoptosis o senescencia (50). Un componente de esta respuesta transcripcional mediada por p53 es la activación de la autofagia, la que a su vez, puede inhibir los niveles y la función de p53. Por lo tanto, las vías de p53 y autofagia se entrelazan funcionalmente (104). En un modelo murino de cáncer de mama hereditario generado por la deficiencia de Palb2 (gen supresor tumoral) y de Atg6/Beclina1, se observó que, el daño en el ADN y el estrés oxidativo resultantes de estos déficits, activaron las vías de p53, para limitar la tumorigénesis (105). Guo y col. (106), demostraron en un modelo experimental básico de cáncer de pulmón inducido por K-rasG12D oncogénico, que la deficiencia de Atg7 en las células tumorales activó p53, reduciendo la proliferación y la carga tumoral en ausencia de autofagia (106). Asimismo, en un modelo de cáncer de pulmón de células no pequeñas, la falta de Atg7 promovió la progresión desde el adenocarcinoma a un oncocitoma. Esto comprobó la hipótesis de que los defectos en la autofagia pueden ser la base subyacente de la naturaleza benigna de estos tumores humanos, planteando que la inactivación de la autofagia limita la progresión del cáncer humano. Sin embargo, la supervivencia de estos animales no mejora ya que los ratones mueren de neumonía (107).

Por otra parte, es conocido que la autofagia puede suprimir a p53 ya que disminuye el estrés oxidativo al eliminar la producción de ROS, proporcionando



sustratos metabólicos necesarios para la defensa antioxidante. Además, p53 puede degradarse por autofagia mediada por chaperona (108).

Se puede concluir entonces que la supresión de p53 por autofagia, sería un mecanismo importante de promoción de tumores (109), y que el control de autofagia inhibe la progresión tumoral en determinados modelos de cáncer experimental. Sin embargo, hacen falta más estudios en otros tipos de neoplasias tanto en la investigación básica como aplicada para aclarar la relación entre p53 y autofagia.

La proteína p21 es otra de las moléculas que participa en el ciclo celular y contribuye a la regulación de la proliferación celular. Uno de los mecanismos más conocidos es la inhibición del complejo CDK-ciclina específicamente en las fases G1 y G2 (110). Este efecto inhibitorio de p21 en la progresión del ciclo celular, es tanto dependiente como independiente de p53, se correlaciona con su localización nuclear y le permite a la célula reparar el ADN dañado antes de replicarse (111). Otras de las funciones atribuidas a p21 están relacionadas con los mecanismos de senescencia, diferenciación, apoptosis, citoquinesis, adhesión y crecimiento celular. Sin embargo, p21 también juega un papel importante en la regulación de la autofagia, y esto se puso en evidencia en diferentes estudios (112). Un ejemplo de esta relación es el efecto de 5-metoxiflazona sobre células HCT-116. Este agente produce daño al ADN e induce apoptosis y autofagia a través de una vía dependiente de p21 (113). De igual manera el antipalúdico quinacrina, induce autofagia y apoptosis de las células neoplásicas mamarias mediante la regulación de p21, logrando así un efecto de antitumoral (114).

En relación con los tumores hipofisarios Matoušek y col. (115), evidenciaron que el crecimiento de los subtipos no funcionantes, se asocia con niveles altos de expresión de p21, p53 y Ki-67 (115). En adenomas de células lactotropas invasores, Dong y col. (116), han demostrado, una correlación negativa entre p21 y p27 con respecto a la invasividad tumoral. De este manera, se comprueba que p53 y una de sus principales proteínas diana p21, participan en los mecanismos de regulación del ciclo celular, pero sus funciones en relación a la senescencia, apoptosis y autofagia dependen del tipo y estadio celular, por lo cual se necesitan más estudios para teminar de aclarar sus participaciones en estos mecanismos.

## GLÁNDULA HIPOFISIS NORMAL Y MACROAUTOFAGIA

La hipófisis es una glándula intracraneal que se ubica en una pequeña depresión del hueso esfenoides llamada *silla turca*. Esta glándula se subdivide en: la adenohipófisis compuesta por los lóbulos anterior e intermedio y la neurohipófisis del lóbulo posterior. Se describe además una cavidad residual de la bolsa de Rathke, el *cleft* que se encuentra en estrecho contacto con la llamada zona marginal (ZM). Esta zona contiene CS/progenitoras y se mantiene desde el estadio embrionario hasta la vida adulta (117).

En el lóbulo anterior se encuentran cinco tipos de células endocrinas: somatotropas, que producen la hormona del crecimiento (GH), lactotropas, que producen la prolactina (PRL), tirotropas, que producen la hormona estimulante de la tiroides (TSH), gonadotropas, que producen la hormona luteinizante (LH) y la foliculo estimulante (FSH), junto con corticotropas, que producen hormona adrenocorticotrofina (ACTH). Además, se ha descrito una población de células stem. Las mismas tienen dos localizaciones bien definidas en la glándula adulta, por un lado, se encuentran en “el nicho” localizado en la zona marginal y, por otro lado, en el parénquima del lóbulo anterior (118).

La crinofagia es un tipo de autofagia dirigida a los gránulos secretorios de los órganos endócrinos y en la glándula pituitaria anterior, comenzó a investigarse por primera vez en las células secretoras de PRL (119). La crinofagia funciona tanto como un mecanismo fisiológico normal para regular la circulación del material secretor y como medio para tratar la producción excesiva de material secretor. Durante el ciclo estral natural de la rata, si no se produce el embarazo, los gránulos de PRL en exceso se fusionan con los lisosomas para degradar y reciclar sus aminoácidos componentes (120). Durante la lactancia, las lactotropas aumentan la síntesis y secreción de PRL para disminuir después del destete, siendo los cuerpos autofágicos los responsables de degradar el exceso de gránulos secretorios (121). Aunque la investigación sobre la crinofagia en la glándula pituitaria se ha centrado principalmente en lactotropas, este proceso también se ha confirmado en otros tipos de células pituitarias de rata, tales como las células corticotropas, somatotropas, gonadotropas y tirotropas (122). En

células secretoras de ACTH, la crinofagia aumenta durante estados de hipersecreción tanto por adrenalectomía como por hiposecreción inducida por la administración de dexametasona (123). Por lo tanto, en la hipófisis, la crinofagia actúa de acuerdo con las fluctuaciones naturales y/o inducidas en la actividad secretora glandular para regular y mantener los niveles intracelulares apropiados de proteínas y hormonas (124).

## EPIDEMIOLOGÍA, CLASIFICACIÓN Y PATOGENIA DE ADENOMAS

### HIPOFISARIOS: ROL DE LA MACROAUTOFAGIA

Los adenomas hipofisarios son uno de los tumores intracraneales más frecuentes representando aproximadamente el 15% de los mismos y el 90% de las lesiones intraselares, con una prevalencia de 1/1500 (125). Son lesiones proliferativas benignas, aunque pueden crecer y ser agresivas localmente, llegando a presentar un comportamiento metastásico intracraneal (126). De los adenomas pituitarios, los prolactinomas constituyen un tercio de todos ellos, siendo las neoplasias pituitarias funcionantes más comunes (127).

Tal como lo presenta Miermeister y col. (128) los primeros sistemas de clasificación se basaron en el tamaño tumoral (microadenomas <10 mm vs macroadenomas >10 mm) y características tintoriales con colorantes clásicos (acidófilos, basófilos y cromóforos). Luego, el análisis de la expresión hormonal permitió diferenciar los distintos subtipos y variantes (128).

La clasificación de 2017 revisada por la OMS, no sólo tuvo en cuenta el contenido hormonal del tumor, sino que reconoció también el rol de los factores de transcripción en la diferenciación neoplásica acorde al linaje celular, la regulación de la producción de hormonas y la posible tumorigénesis del adenoma (**Tabla 1**), dejando de lado la utilización rutinaria de la microscopía electrónica de transmisión (MET), ya que la gran mayoría de estos tumores son clasificados mediante inmunohistoquímica (IHQ) (129).

En 2017, Asa y col. (130) propusieron una nueva terminología para los adenomas hipofisarios. La nueva denominación de tumores neuroendocrinos hipofisarios (PitNETs, sigla en inglés) que se basó en que la clásica diferenciación

entre adenomas y carcinomas por la ausencia o presencia de metástasis y la pobre reproducibilidad del diagnóstico de adenomas atípicos basada en la detección de mitosis o expresión de p53 y Ki-67, era según estos autores un tanto simplista y hasta errónea. Sin embargo, la terminología propuesta por Asa y col. (130), aún no ha sido definitivamente adoptada, pudiéndose encontrar esta definición o no, en los diferentes reportes bibliográficos.

La patofisiología de los adenomas hipofisarios es compleja y varía entre los diferentes tipos de tumores. Mediante el análisis de la inactivación del cromosoma X, se ha demostrado que estas neoplasias, resultan de la expansión clonal de células adenohipofisarias (131), mediante la participación de eventos genéticos y epigenéticos, estimulación hormonal, sobreproducción de factores de crecimiento, desregulación de miARNs y participación de células madre (**Figura 7**), que promoverían el desarrollo y crecimiento tumoral (132).

A continuación, se realizará un análisis de los mecanismos patogénicos que Zatelli (132) revisa en relación para las diversas variantes de adenomas pituitarios:

➤ Adenomas lactotropos: en ratones transgénicos se ha demostrado la importancia de TGF- $\alpha$  como estimulador de múltiples hormonas hipofisarias. En adenomas agresivos el EGF induce la secreción de PRL además de estimular la expresión de su receptor. También la expresión de FGF4 ha sido implicada en el desarrollo del prolactinoma.

➤ Adenomas Somatotropos: en estos adenomas se han demostrado mutaciones de activación del gen GNAS1, con la consiguiente activación constitutiva de la subunidad Gs<sub>a</sub>, incrementando la secreción de la GH.

➤ Adenomas Corticotropos: mutaciones de DKC1 se han asociado con expresión disminuida y disfunción de p27. En estas neoplasias también se han demostrado disminución de la expresión de Brg1. Finalmente se ha evidenciado alteraciones en los niveles de ciertos tipos de miARNs.

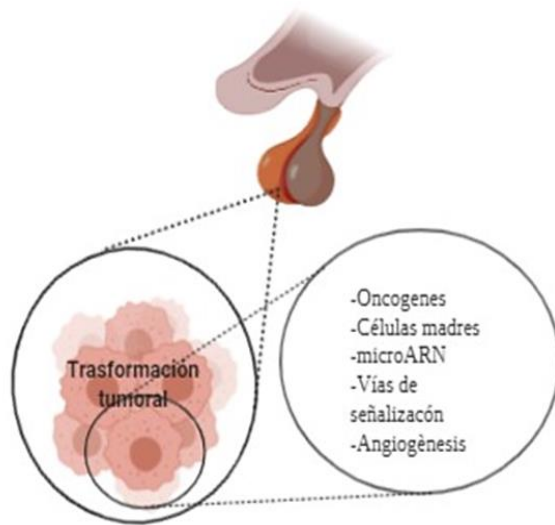
➤ Adenomas Gonadotropos: estos adenomas exhiben altos niveles del receptor de activina, lo que conduce a la tumorigénesis. Además, un receptor truncado de activina (ActRIB), el cual no frena el crecimiento, ha sido puesto en evidencia en esta variante de tumor hipofisario.

➤ Adenomas Tirotropos: se suelen presentar en estados de hipotiroidismo crónico con la consecuente hipersecreción de TRH, lo que conduce a la hiperplasia de células tirotropas y posterior transformación neoplásica. También se han demostrado mutaciones en el receptor de TRH con la consiguiente disminución de la unión del ligando.

**Tabla 1:** Clasificación de adenomas hipofisarios según OMS-2017

<i>Tipo de adenoma</i>	<i>Variante morfológica</i>	<i>Hormona</i>	<i>Factor de transcripción</i>
<b><i>Adenoma Somatotropo</i></b>			
	Densamente granulado	GH	Pit-1
	Escasamente granulado	GH	Pit-1
	Mamosomatotrofo	GH+PRL	Pit-1; ESR1
	Mixto	GH+ PRL	Pit-1, ESR1
<b><i>Adenoma Lactotropo</i></b>			
	Densamente granulado	PRL	Pit-1; ESR1
	Escasamente granulado	PRL	Pit-1, ESR1
	Adenoma de células stem	PRL, GH	Pit-1, ESR1
<b><i>Adenoma Tirotropo</i></b>		b-TSH	Pit-1, GATA2
<b><i>Adenoma Corticotropo</i></b>	Densamente granulado	ACTH	Tpit
	Escasamente granulado	ACTH	Tpit
	Adenoma de células de Crooke	ACTH	Tpit
<b><i>Adenoma Gonadotropo</i></b>		b-FSH, b-LH subunidad a	SF-1, GATA-2, ESR1
<b><i>Adenoma de células nulas</i></b>		Ninguna	Ningún
<b><i>Adenomas plurihormonales</i></b>	Adenoma Pit-1 positivo	GH+PRL+b-TSH	Pit-1
	Adenomas con combinaciones inmunohistoquímicas inusuales	Varias combinaciones	

GH: hormona de crecimiento; PRL: prolactina; b-TSH: beta tirotrófina; ACTH: hormona adrenocorticotrofina; b-FSH: beta hormona folículoestimulante; b-LH: beta hormona luteotrófica; ESR1: receptor estrogénico tipo 1.



Created in BioRender.com 

**Figura 7:** Esquema de la actual hipótesis de la patogénesis de los adenomas hipofisarios. Se destaca el interjuego de múltiples mecanismos que participarían del origen tumoral. (Modificado de Zatelli. Pituitary 21:130-137. 2018). Diseño realizado en BioRender.com

A partir de lo expuesto precedentemente, es evidente que cada tipo de adenoma presenta particularidades en sus mecanismos de origen, lo que da complejidad a la obtención de marcadores únicos para este grupo de adenomas tan disímil.

Los tumores pituitarios a lo largo de los años han sido objeto de diferentes estudios y revisiones, buscando características propias y/o marcadores biológicos, que permitan predecir su comportamiento ayudando de esta manera al tratamiento y seguimiento del paciente.

#### *Autofagia y adenomas hipofisarios*

De igual manera que en la glándula normal, hay pocos estudios de este proceso celular en adenomas hipofisarios. En 1977, Kovacs y col.(133), demostraron en

adenomas experimentales de rata y mediante MET que la autofagia, de una manera constante, degrada gránulos secretorios para formar gránulos con pigmentos (133). En un estudio de Horvath y col. (134), se demostró que, de diecisiete casos de adenoma de células corticotropas silentes, sólo dos tenían evidencias de este mecanismo.

Una de las formas de macroautofagia analizada ha sido la mitofagia. Este es un proceso biológico complejo por el cual, se eliminan las mitocondrias dañadas o que sufren estrés mediante autofagia. Sin embargo, la aparición de mitofagia no se restringe a mitocondrias defectuosas, sino que, en mitocondrias normales esto también puede observarse (135).

Es bien conocido que la disfunción mitocondrial y la autofagia están relacionadas con los adenomas hipofisarios. Investigaciones básicas sobre toxicidad mitocondrial y celular de la toxina T-2 muestran que la misma aumenta significativamente la actividad mitofágica, los niveles de ROS y el daño al ADN en células pituitarias de rata GH3. La T-2 activa la vía señalización de la proteína quinasa A, y consecuentemente, la vía Nrf2/PINK1/Parkin para mediar la mitofagia. Estos hallazgos han conducido a considerar que el aumento de la mitofagia y la disfunción mitocondrial podrían incrementar la resistencia a la quimioterapia en células pituitarias GH3 (136).

Otro aspecto es la vinculación entre autofagia y apoptosis, ya que ambos procesos pueden coexistir. Cada vez son más los estudios que demuestran la importancia de la autofagia en el tratamiento de los adenomas hipofisarios. Por un lado, puede inducir la muerte de las células tumorales y desempeñar un papel terapéutico, pero también, puede promover la supervivencia celular y colaborar en los mecanismos de insensibilidad al tratamiento.

Los agonistas de la dopamina como BRC y CAB, son los tratamientos de primera línea para los prolactinomas. La activación del DRD5 aumenta la producción de ROS, inhibe el mTOR, induce macroautofagia/apoptosis, y conduce a la muerte celular autofágica en células tumorales pituitarias humanas (137). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que las vías de acción para BRC y CAB, son diferentes. BRC indujo la apoptosis de las células de prolactinoma a través de la vía de

señalización ERK/EGR1, mientras que CAB produjo la muerte celular autofágica por inhibición de la vía de señalización AKT / mTOR (138).

Para el resto de los adenomas hipofisarios, el tratamiento de elección es la exéresis quirúrgica del tumor y el tratamiento farmacológico es complementario en aquellos pacientes que no logran remisión con la cirugía o cuando la misma está contraindicada. Los fármacos indicados son los análogos de la somatostatina (SRL), como octreotide, lanreotide o pasireotide. Gadelha y col. (139), expusieron varios adenomas de células somatotropas funcionantes a SRL, SMS 201–995y demostraron que se producía autofagia en células tumorales y se inhibió la secreción de GH. Este hallazgo sugiere que el SMS 201–995 regula la degradación intracelular de los gránulos secretores de GH mediante la autofagia, modificando el nivel sérico de la hormona y logrando un efecto terapéutico. Dagistanli y col. (140), realizaron un estudio retrospectivo sobre muestras de once pacientes con adenomas tratados con SRL y nueve sin este tratamiento, demostrando que los niveles de caspasa-3 y ATG5 aumentaron significativamente después del tratamiento con SRL, mientras que Beclina 1 y Ki-67 disminuyeron significativamente. Este hallazgo sugirió que los SRL podrían inducir apoptosis de células tumorales, aumentar la autofagia y reducir la proliferación celular.

Temozolamida es un agente alquilante y fue propuesto como opción de tratamiento para adenomas hipofisarios invasivos y carcinomas pituitarios, siendo efectivo en el 60% de estos tumores (141). Kun y col. (142), demostraron que el tratamiento de la línea GH3 con este fármaco, aumentó la proporción LC3-II/LC3-I, con un descenso de p62. Además, pudieron comprobar en la misma línea celular, que la disminución en los niveles de HIF-1 $\alpha$  inhibió la autofagia inducida por esta droga bloqueando el flujo autofágico por neutralización del pH lisosómico en ratas, aumentando así la eficacia antitumoral del medicamento.

Por otro lado, un número creciente de estudios han demostrado que la autofagia es un factor importante relacionado con la resistencia a los fármacos en diferentes tumores (143). Es por esto que, la combinación de fármacos quimioterapéuticos e inhibidores de la autofagia, podrían aumentar la sensibilidad de las células tumorales a la quimioterapia (144). La CQ y la HCQ son dos fármacos que se utilizan actualmente



en tratamiento clínico para inhibir la autofagia. La última etapa de este proceso es dependiente de la degradación lisosomal. Estos fármacos inhiben principalmente la acción de la  $H^+$ -ATPasa de los lisosomas aumentando el pH lisosómico e inhibiendo la actividad enzimática y la fusión con los autofagosomas (145). Lin y col. (146), demostraron que el uso combinado de CQ y CAB aumenta significativamente la sensibilidad de las células de los adenomas hipofisarios a CAB incluso en aquellos tumores resistentes a CAB. Además, CQ exacerbó la acumulación de p62 y LC3-II mediada por CAB y reclutó la caspasa 8 para formar un complejo y finalmente inducir la muerte celular.

Por todo lo expuesto anteriormente, podemos decir que, en la actualidad, los roles de autofagia en la aparición y el desarrollo de adenomas hipofisarios no son totalmente claros, y los reportes de casos aislados son insuficientes para revelar la importancia que tiene este mecanismo.

## HIPÓTESIS

La macroautofagia en lesiones proliferativas adenohipofisarias sería un mecanismo involucrado en el desarrollo y crecimiento tumoral.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Examinar si existe interrelación entre marcadores de macroautofagia y reguladores del ciclo celular en lesiones tumorales adenohipofisarias.

### Objetivos Específicos

- ✓ Describir las características ultraestructurales del proceso macroautofágico tanto en estados hiperplásicos-adenomatosos inducidos por estrógenos como en una cohorte de adenomas hipofisarios funcionantes humanos.
- ✓ Evaluar y comparar la presencia de marcadores de macroautofagia durante el desarrollo hiperplásico/adenomatoso experimental.
- ✓ Correlacionar la expresión de marcadores de macroautofagia con p53 y p21 como mediadores de muerte y proliferación celular, en lesiones proliferativas adenohipofisarias inducidas por estrógeno.
- ✓ Relacionar la existencia de macroautofagia con datos clínico-patológicos de adenomas hipofisarios humanos funcionantes con particular atención en la tasa de proliferación y tamaño tumoral.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Diseño experimental básico*

Se utilizaron ratas macho adultas (200-250 g) de la cepa Fisher 344 (F344), las que se dividieron en cuatro grupos experimentales de acuerdo con el tiempo de estimulación estrogénica, utilizando un n: 36 de animales (**Figura 1**)



**Figura 1:** Esquema de los grupos experimentales básicos. Ratas Fisher (F344) estimuladas con benzoato de estradiol (BE) por 10, 20 y 30 días.

A los fines de inducir tumores adenohipofisarios, animales intactos fueron tratados con benzoato de estradiol (BE) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) durante 10, 20 y 30 d. El estrógeno se implantó en la región dorsal subcutánea, mediante pastillas preparadas a mano mezclando FASTIX adhesivo y 30 mg de BE. Los animales controles fueron implantados con pastillas de FASTIX sin BE. Todas las ratas fueron criadas y alojadas en el bioterio del INICSA-FCM-UNC, bajo un fotoperiodo controlado, con acceso libre a agua y comida comercial para roedores.

Los animales se manejaron en conformidad con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio publicado por el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (147), contando el protocolo con la aprobación del CICUAL-FCM-UNC.

Cumplidos los tiempos de estimulación hormonal las ratas fueron decapitadas después de los 10 s de ser retiradas de sus cajas, a los fines de minimizar el estrés o

estímulos externos. Luego se extrajeron las glándulas hipofisarias, separándose cuidadosamente adenohipófisis de neurohipófisis, siendo estudiadas las primeras con diferentes metodologías.

*Diseño metodológico aplicado en adenomas hipofisarios humanos*

Se diseñó un estudio retrospectivo/prospectivo, transversal, observacional, descriptivo y analítico, en el que se incluyeron macroadenomas y microadenomas funcionantes (n:33) obtenidas durante los años 2005 al 2018.

En la **Tabla 1** se indican los criterios de inclusión y exclusión utilizados en el presente trabajo de investigación.

**Tabla 1:** Criterios de inclusión y exclusión de los pacientes.

<b>Criterios de inclusión</b>
- Pacientes de sexo masculino y femenino mayores de 18 años.
- Adenomas funcionantes.
- Disponibilidad de datos clínicos (tratamiento médico previo, tamaño tumoral, invasión tumoral).
- Disponibilidad del informe de IHQ para hormonas y Ki-67.
<b>Criterios de exclusión</b>
- Lesiones selares no adenomatosas (tumores neuronales, mesenquimales, de células germinales, hematológicos y secundarios).

Los pacientes se agruparon teniendo en cuenta su distribución por diagnóstico histopatológico, tamaño (macroadenomas y microadenomas), sexo (hombres y mujeres) y clínica.

El protocolo contó con la aprobación del Comité de Ética del Hospital Privado Centro Médico de Córdoba SA (Registro Provincial de Investigaciones en Salud RePIS N° 3390).

Ver anexo.

## MÉTODOS DE MONITOREO DE AUTOFAGIA

Hasta el momento se expuso el mecanismo de autofagia, las moléculas involucradas en el mismo y su regulación. Además, se comentaron antecedentes en glándula hipofisaria normal y tumoral, respecto a este proceso. Sin embargo, es importante conocer cuáles son las metodologías que permiten monitorear la autofagia.

La detección y el monitoreo adecuados de la autofagia constituyen un gran desafío teniendo en cuenta de que se trata de un proceso altamente dinámico (148) (149).

Debe hacerse una distinción importante entre la medición del número y el volumen de componentes autofágicos en un determinado punto del proceso, frente a la medición del flujo autofágico. El primero representa una cuantificación estática de un proceso dinámico, donde la cantidad de autofagosomas a menudo se usa como una cuantificación directa de la actividad autofágica. Sin embargo, es posible que una acumulación de autofagosomas, en lugar de representar un aumento en la actividad autofágica, corresponda a un bloqueo de su fusión con los lisosomas y, por lo tanto, una inhibición de la actividad autofágica en su conjunto (150).

El método más antiguo y utilizado para detectar la autofagia es la MET, ya que permite identificar ultraestructuralmente la presencia de vesículas autofágicas (149).

La microscopía de fluorescencia es otro enfoque que a menudo se aplica para evaluar este proceso. La proteína LC3 es un marcador esencial de autofagosomas en mamíferos (148) y se encuentra dentro de la célula en forma citosólica (LC3-I), como así también unido a la membrana autofagosomal (LC3-II) tras la inducción de la autofagia, pudiendo ser detectada mediante IF, técnica común para cuantificar los autofagosomas *in vivo* (151) (149).

Un tercer método para medir la activación autofágica implica la separación y semicuantificación de los niveles de LC3-I y LC3-II a través de Western Blotting (WB). La inmunodetección de otras proteínas Atg (por ejemplo, Beclina 1) también se han utilizado como un indicador general de autofagia (148). En general, la cuantificación estática de LC3 se ha considerado un marcador útil para la autofagia; sin

embargo, estos métodos no son perfectos y cada uno tiene advertencias específicas necesarias para maximizar la precisión y la fiabilidad del proceso.

Debe enfatizarse que cada técnica tiene sus limitaciones y los enfoques experimentales más fuertes y confiables son los que utilizan varias técnicas para crear una evaluación multifacética de la autofagia (152).

## METODOLOGÍAS UTILIZADAS EN AMBOS DISEÑOS DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

### Análisis morfológico con microscopía fotónica

Cumplidos los tiempos de exposición al BE los animales (n:4) de los diferentes grupos experimentales fueron anestesiados con isoflurano al 5% (Forane, Baxter). Se corroboró la pérdida de la respuesta a reflejos doloroso (plantar y cola) y se procedió a decapitarlas para obtener las adenohipófisis. Los fragmentos correspondientes se colocaron en una solución de formol al 4% para su posterior inclusión en parafina. Las muestras incluidas en parafina fueron cortadas (micrótomo tipo Minot) con un espesor de 3  $\mu\text{m}$ , desparafinadas, hidratadas y coloreadas con la técnica de H/E.

Otra de las metodologías utilizada en el modelo experimental básico y a los fines de demostrar la transformación adenomatosa, fue la técnica de reticulina de Gordon-Sweet (153).

Las muestras de adenomas hipofisarios humanos de diferentes estirpes celulares fueron incluidas en parafina, coloreadas con H/E y diagnosticadas mediante las determinaciones inmunohistoquímicas de las diversas hormonas adenohipofisarias.

### Caracterización ultraestructural por microscopía electrónica de transmisión (MET)

Con el objetivo de analizar la morfología subcelular, pequeños fragmentos tanto de ratas C (n:4) y tratadas con BE (n:12) y adenomas humanos (n:13) se fijaron por inmersión en solución de Karnovsky al 4% (formol 8% y glutaraldehído 4%), procesando el material por la siguiente técnica:

-Lavado: tres lavados con agua bidestilada, de 10 min cada uno.

-Postfijación con tetróxido de osmio al 1%, a temperatura ambiente por 2 h, en rotor.

-Lavado con agua bidestilada.

-Deshidratación con acetonas de graduación creciente 50%, 75% durante 5 min en cada una; 90% por 10 min y 100% destilada y deshidratada sobre tamiz molecular N° 3 (Merk) durante 15 min. Este paso se realizó a temperatura ambiente y en rotor.

-Inclusión en una mezcla de resinas epóxicas (medio de inclusión) compuesta de: Araldita 506, Epon, DDSA, DBP y BDMA.

La inclusión fue realizada de acuerdo con la siguiente metodología:

1-Infiltración en una mezcla de partes iguales del medio de inclusión y acetona 100% durante 3 h como mínimo.

2-Pre-inclusión en una mezcla completa de Epon/Araldita a temperatura ambiente durante 6-8 h.

3-Inclusión final: en Epon/Araldita a 60 °C durante 24 h.

Con posterioridad las muestras fueron cortadas con ultramicrotomo a un espesor de 80 nm y recolectadas en grillas de cobre para luego ser contrastadas con una solución de acetato de uranilo alcohólico a saturación (1 min), lavadas con agua bidestilada y expuestas finalmente a una solución de citrato de plomo por un lapso de 2 min, para ser observadas y fotografiadas en un microscopio electrónico Zeiss Leo 906.

#### *Estudio inmunohistoquímico a nivel de microscopía fotónica de secciones en parafina*

Con el material incluido en parafina tanto del modelo experimental básico (n:12) como los adenomas humanos (n: 33), se realizaron inmunomarcaciones empleándose anticuerpos mono o policlonales para las proteínas Beclina 1; LC3 y Ki-67. Los anticuerpos primarios se diluyeron en PBS-BSA 1% empleándose las siguientes concentraciones:

-anti Beclina 1 (E8): sc-48341, Santa Cruz Biotechnology, INC. 1/300.

-anti MAP LC3  $\beta$  (G-2): sc-271625, Santa Cruz Biotechnology, INC. 1/300



-anti Ki-67 (CONFIRMTM anti-ki-67, Ventana Medical System, Tucson, Arizona, USA): 2 µg/ml, usado en adenomas humanos.

-anti Ki-67 (anti-human ki-67, BD Pharmingen, USA) dilución 1/50, usado en ratas.

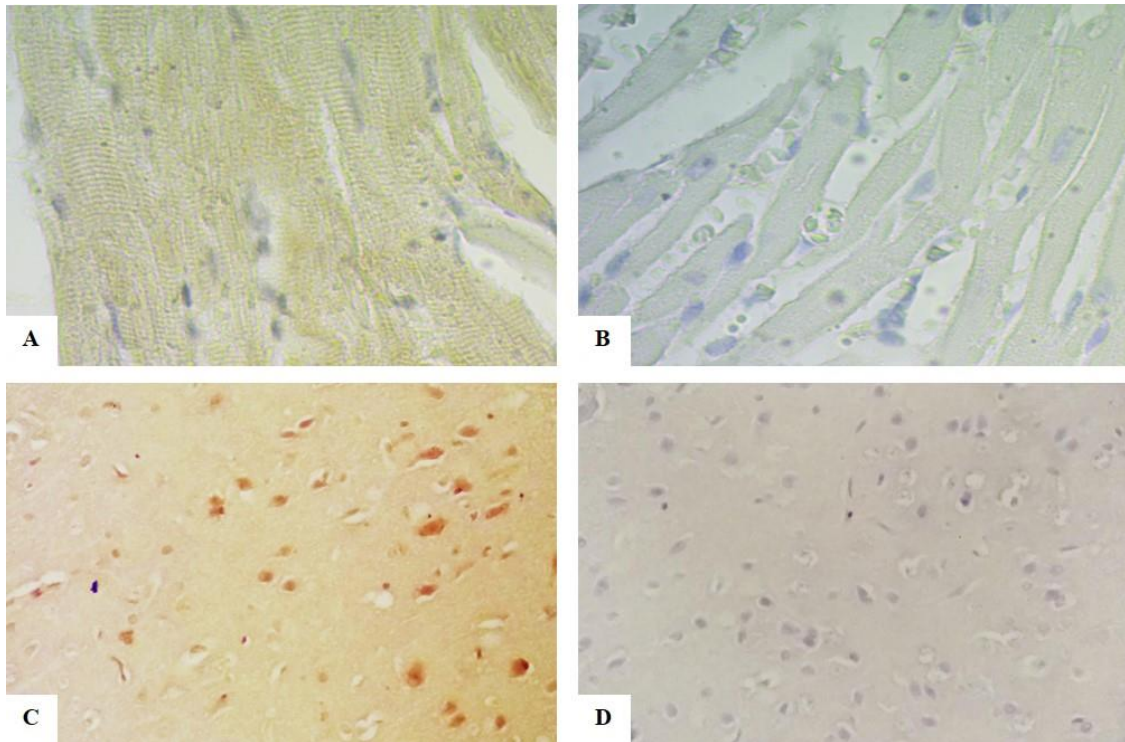
Se utilizaron como anticuerpos secundarios anti-conejo y anti-ratón biotinilado (dilución 1/130) (Vectastain ABC Kit-Vector Laboratories USA).

El amplificador de señal empleado fue el Ab64261-Rabbit Specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC Kit.

Para demostrar la especificidad de las reacciones inmunohistoquímicas, las secciones fueron incubadas con PBS-BSA 1%, en ausencia de los anticuerpos primarios (control negativo) y se emplearon los siguientes controles de positividad:

Para Beclina 1: tejido muscular cardíaco (**Figura 2 A-B**).

Para LC3: tejido cerebral (**Figura 2 C-D**).



**Figura 2:** A-C: Inmunomarcación citoplasmática para Beclina 1 y LC3 respectivamente. B-D: La omisión y reemplazo del antisuero primario por PBS-BSA 1% demuestra la especificidad de los anticuerpos. (Magnificaciones originales A y B: 400X, C y D: 250X).

A continuación, se detalla la técnica de IHQ aplicada:

- Desparafinización en tres xiloles y en etanoles de graduación decreciente (50%, 70%, 90% y 100%) e hidratación en agua destilada.
- Recuperación antigénica:
  - Microondas (potencia 800 W) en buffer citrato (pH 6), durante 30 s al 100% de potencia y posteriormente al 20% de potencia por 15 min.
  - Lavado con PBS 1% y aspirar exceso de líquido.
- Bloqueo de la actividad de la peroxidasa endógena:
  - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (incluido en el Ab64261- Rabbit Specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC Kit.) por 45 min.
  - Lavado en PBS 1%: 2 lavados de 5 min cada uno.

- Bloqueo de uniones no específicas:
    - Con PBS-BSA 5%, temperatura ambiente por 60 min.
  - Incubación con anticuerpo primario:
    - Toda la noche a 4 °C.
    - Lavados con PBS 1%, 3 veces por 5 min cada uno.
  - Sistema de revelado:
    - Anticuerpo secundario anti-cabra biotinilado polivalente durante 60 min.
    - PBS 1%: 3 lavados de 5 min cada uno.
    - Aplicación de estreptavidina peroxidasa e incubación durante 20 min a temperatura ambiente.
    - Lavados con PBS 1% por 5 min.
    - Colocación de 30 µl (1 gota) de DAB cromógeno a 1,5 ml (50 gotas) de sustrato DAB, sobre el tejido. Incubación durante 1-10 minutos. Enjuague 4 veces en PBS 1%.
  - Contracoloración:
    - Hematoxilina durante 30 s.
  - Deshidratación y montaje:
    - Inmersión de los cortes en etanol de graduación creciente durante 2 min y dos pasajes en xilol de 2 min cada uno. Montaje con bálsamo sintético (DPX mountant for histology, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y cubre objeto.
- En las secciones adenohipofisarias incluidas en parafina sometidas a inmunomarcación para las proteínas de interés, las células inmunoreactivas fueron observadas y analizadas en un microscopio Zeiss Axioskop 20. Se utilizó como criterio de positividad en los adenomas humanos, la siguiente gradación: 1 (1-25%), 2 (26-50%), 3 (51-75%), 4 (>76%).

#### *Estudio inmunocitoquímico a nivel de microscopía confocal*

Muestras de adenohipófisis de los cuatro grupos experimentales (n: 4) fueron incluidas en medio de montaje para congelación (CRYOPLAT, Biopack, Buenos Aires, Argentina) y congeladas a -20 °C. Luego se obtuvieron cortes en crióstato, los cuales fueron sumergidos en metanol frío por 5 min, seguido de lavados en PBS 1% frío para luego bloquear las uniones inespecíficas mediante PBS-BSA 5% 30 min a 37 °C en cámara húmeda. Posteriormente se incubaron las secciones con el anticuerpo

primario anti Beclina 1 [Beclin-1 (D40C5) Rabbit mAb, Cell Signaling Technology] diluida en 1/100 en PBS-BSA 1% durante toda la noche y anti LC3 [Anti- LC3 (L8918) Rabbit mAB, Sigma], diluida en 1/100 durante toda la noche. Luego de los lavados con PBS 1% y protegido de la luz, se procedió a incubar las secciones con el anticuerpo secundario, cabra anti-conejo IgG (H+L) conjugado Alexa Fluor ® 594 (Thermo SCIENTIFIC, USA) y cabra anti-ratón IgG (H+L) conjugado Alexa Fluor ® 488 (Thermo SCIENTIFIC, USA). Para ambos se usaron diluciones de 1/2000, durante 30 min en estufa a 37 °C y luego 30 min a temperatura ambiente. Para visualizar los núcleos celulares y luego de lavar las secciones con PBS 1%, estas se incubaron con DAPI (4',6-Diamino-2-phenylindole D9542, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) en una dilución de 1mg/1ml y finalmente se montaron los cortes con Fluoromount™ (F4680, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dejándose secar por 24 h.

Las células inmunoreactivas fueron visualizadas con microscopio confocal de exploración láser FluoView FV1200 (Olympus, Tokio, Japón). Las imágenes obtenidas fueron analizadas con software FV10-ASW 1.6 Viewer.

### *Inmunolocalización a nivel de microscopía electrónica de transmisión*

Fragmentos de adenohipófisis de rata (n:4) y adenomas humanos (n:4) fueron destinados a inmunomarcación para MET.

#### A-Procesamiento del material

La fijación para la inmunolocalización se realizó por inmersión con Karnovsky al 1,5 % en buffer cacodilato y la inclusión de los fragmentos adenohipofisarios fue llevada a cabo de acuerdo con el siguiente procedimiento:

-Deshidratación: etanol 50°, 70°, 90°; durante 15 min en cada uno a temperatura ambiente.

La preinclusión e inclusión se realizó en resina acrílica LR White (The London Resin Co. Ltd) de acuerdo con el siguiente procedimiento.

-Preinclusión:

LR White-alcohol 90°: por 2 h.

LR White: por 30 min. Luego se realizó un cambio para dejarlo toda la noche.

Inclusión en LR White, en anaerobiosis a 49 °C +/- 2 durante 48 h, en cápsulas de gelatina.

#### B-Técnica inmunocitoquímica ultraestructural

Los fragmentos incluidos en LRW fueron seccionados en cortes semifinos (de 200 nm) que luego fueron teñidos con azul de toluidina, para seleccionar la zona de interés. Posteriormente se obtuvieron cortes finos de 80 nm (color de interferencia dorado) con cuchilla de diamante en un ultramicrotomo Jeol JUM-7. Los cortes se montaron en grillas de níquel.

El protocolo de las reacciones inmunocitoquímicas comprendió la siguiente secuencia:

-Bloqueo con PBS-BSA al 1%, por 15 min a temperatura ambiente.

-Incubación con anticuerpo primario anti- LC3 (L8918) Rabbit mAB Sigma, diluida en 1/100 en PBS-BSA 1%, durante la noche.

-Lavado con PBS.

-Incubación con anticuerpo secundario según corresponda, IgG-Goat-anticonejo, IgG-Goat-anti-ratón; conjugados con partículas de oro 15 nm (Aurion conventional gold reagents), dilución 1/30, a 37 °C 1 h.

-Lavado con agua bidestilada.

-Coloración con solución acuosa saturada de acetato de uranilo por 30 s. Los cortes fueron examinados y fotografiados en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss Leo 906.

#### Técnica de Western Blotting (WB)

*A-Separación electroforética de proteínas en base al peso molecular en condiciones desnaturalizantes de homogenatos hipofisarios.*

A partir de las glándulas adenohipofisarias de los 4 grupos del modelo animal experimental por triplicado (n:36) se determinaron los niveles de expresión de **Beclin 1** [(Beclin-1 (D40C5) Rabbit mAb, Cell Signaling Technology)]; **LC3** [(L8918) Rabbit mAB, Sigma]; **p53** (anti-p53 sc-6243, Santa Cruz) **yp21** (anti-p21 ab80633, Abcam, USA), por la técnica de WB. Para la cual se obtuvieron extractos de proteínas mediante homogenización fría en buffer de lisis celular RIPA (con un cóctel de inhibidores enzimáticos PMSF 2mM 16µg/ml, leupeptina 10µg/ml y aprotinina 10µg/ml), los lisados celulares fueron centrifugados a 15000 g durante 20 minutos a 4 °C para sedimentar el material insoluble y el sobrenadante se retiró, almacenándose en alícuotas congeladas a -20 o -80 °C para su posterior utilización. La concentración de proteínas se determinó mediante cuantificación, utilizando ensayo de Bradford y BSA como estándar. Seguido los extractos fueron calentados por 5 minutos a 95 °C en presencia de buffer muestra Leammli (SDS, Glicerol y β-mercapto-etanol) y las proteínas solubles separadas por electroforesis en geles de SDS-PAGE al 12%. Donde se sembraron 100µg de proteína para la determinación de las moléculas de interés. Para verificar el peso molecular de las proteínas de interés se utilizó un marcador de pesos moleculares All Blue (Precisión Plus Protein™ Standards, #161-0373–BIO-RAD Laboratories, INC).

#### *B- Transferencia e inmovilización a un soporte sólido*

Completada la electroforesis se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Amershan International) con una dimensión similar al gel 8.2 cm x 5 cm x 1 mm.

#### *C- Formación y detección del complejo antígeno-anticuerpo*

-Bloqueo de sitios de uniones inespecífica con BSA al 5% TBS-Tween al 0,1% 1h en agitación a temperatura ambiente.

-Incubación con anticuerpo primario correspondiente diluido en TBS-Tween al 0,1%, toda la noche a 4°C en agitación.

BCN1: 1/1000

LC3: 1/1000

p53: 1/150

p21: 1/1000

-Lavados con TBS-Tween al 0,1% por 15 min en agitación a temperatura ambiente.

-Incubación con anticuerpo secundario conjugados con peroxidasa (HRP) (Jackson, West Grove, PA, USA) anti-conejo dilución 1:2000 y anti-ratón dilución 1:4000 en TBS-Tween al 0,1%, según corresponda, por 1 h en agitación a temperatura ambiente.

-Lavado con TBS-Tween al 0,1%, por 15 min en agitación.

-Incubación con reactivos de detección de WB ECL (Amersham, Buks, Reino Unido).

-Exposición de la membrana a una placa fotográfica (Kodak) para la detección de las señales quimioluminiscentes procedentes de los blots de las proteínas (Hyperfilm ECL Amersham).

-Revelado del anticuerpo secundario acoplado a HRP y fijación de la placa fotográfica (Kodak). Para confirmar la carga equivalente de proteína total en cada carril y como control interno de la expresión proteica se utilizó  $\beta$ -actina (A1978, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dilución 1/2000.

Las densidades de las bandas correspondientes a los resultados del WB fueron analizados con el programa Image J 1.47 software (National Institute of Health, USA).

### Análisis estadístico

Para el análisis de la expresión de las proteínas de interés en el modelo experimental básico se realizó el test ANOVA-Fisher y el de correlación, usando el coeficiente de Pearson, para establecer relación entre las proteínas: Beclina 1, LC3, p21, p53, considerándose p significativa <0.05.

En los adenomas humanos se estudiaron las siguientes variables: distribución por género, edad, tipo histológico, expresión de Ki-67 y de moléculas marcadoras de autofagia Beclina 1 y LC3. Los resultados obtenidos, fueron presentados como promedios (DS) para datos continuos o por frecuencia y porcentajes para datos categóricos. Para analizar la asociación entre las variables se utilizó test de  $X^2$  y Test-T, considerándose en todos los casos p significativa <0,05. El análisis fue llevado a cabo usando el software Infostat (154).

## RESULTADOS

### INVESTIGACIÓN BÁSICA

#### Caracterización del modelo de prolactinoma experimental inducido por estrógenos

Las secciones coloreadas con H/E, evidenciaron en los diferentes tiempos de exposición hormonal, células epiteliales predominantemente acidófilas, con amplios citoplasmas (**Figura 1**). Se destaca la presencia, en los grupos tratados con BE, de una extensa red de capilares dilatados y congestivos.

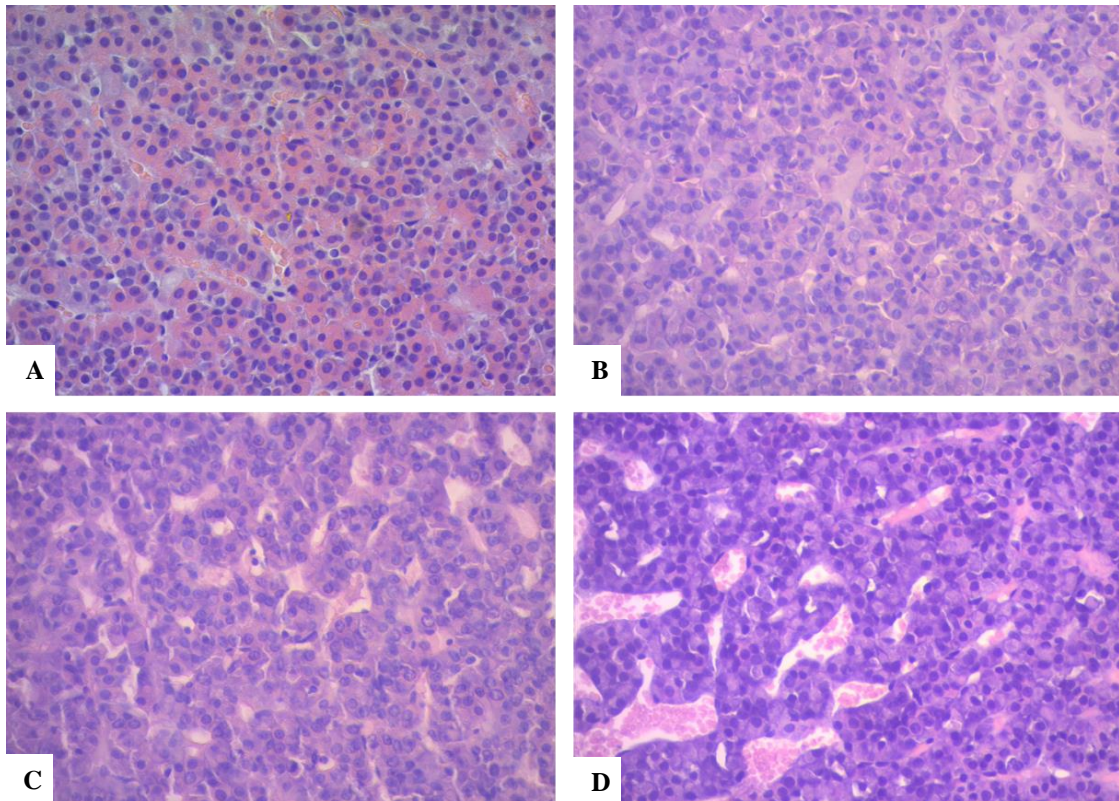
El análisis de la trama de reticulina, puso en evidencia marcados cambios de la misma en los diferentes tiempos de estímulo hormonal respecto del grupo C. A los 10d BE se observó distensión de la trama con un incremento del tamaño acinar a expensas de la hipertrofia e hiperplasia celular (estadio hiperplásico). En las ratas tratadas por 20d se destacó la disrupción incompleta del sostén de fibras conectivas, coincidente con lo que se caracterizó como un estado hiperplásico/adenomatoso. En el tiempo final analizado (30d BE) se apreciaron sectores glandulares con desaparición completa de las fibras de reticulina (**Figura 2**) vinculable a la presencia de transformación adenomatosa.

El análisis del índice de proliferación celular en los tumores adenohipofisarios fue realizado mediante la determinación del porcentaje de células marcadas para Ki-67 (**Figura 3**). Se identificó un aumento del número de células Ki-67 positivas a partir de los 10d de acción estrogénica, destacándose el pico proliferativo a los 20d del efecto hormonal ( $p < 0,05$  20d BE vs C y 10d BE) tiempo en el que se inició el estado hiperplásico/adenomatoso. Cabe remarcar que de manera significativa la tasa proliferativa media descendió a valores similares al C a los 30d de efecto estrogénico ( $p < 0,05$  vs C), momento en el que se advierte la desaparición de la trama de sostén.

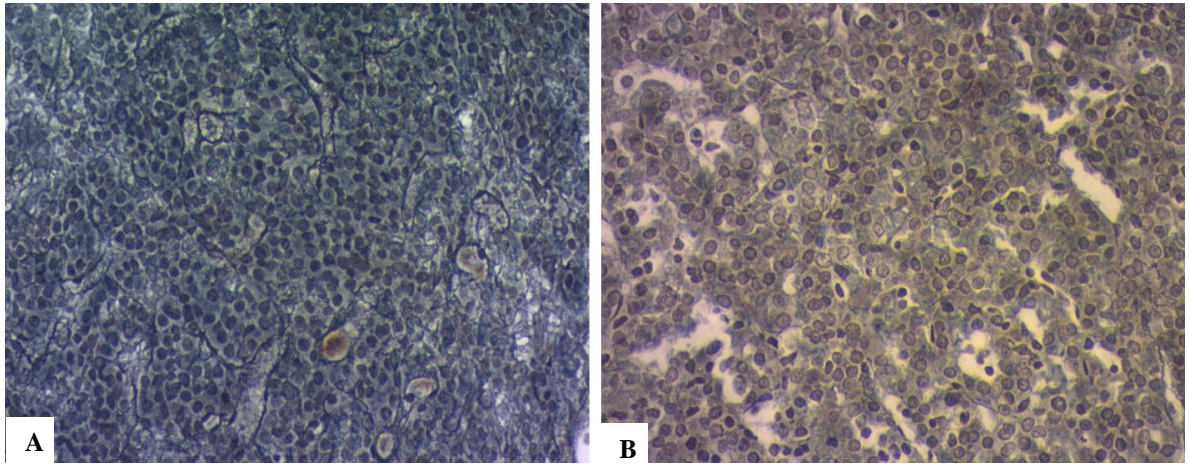
La evaluación ultraestructural de las glándulas tumorales demostró un predominio de células lactotropas las que exhibieron hiperplasia de las organelas proteinopoyéticas, hallazgo más relevante cuanto mayor fue el tiempo de acción del BE (**Figura 4**). A los 30d BE se destacaron los citoplasmas distendidos con abundantes membranas de RER en disposición concéntrica. El efecto estrogénico indujo un



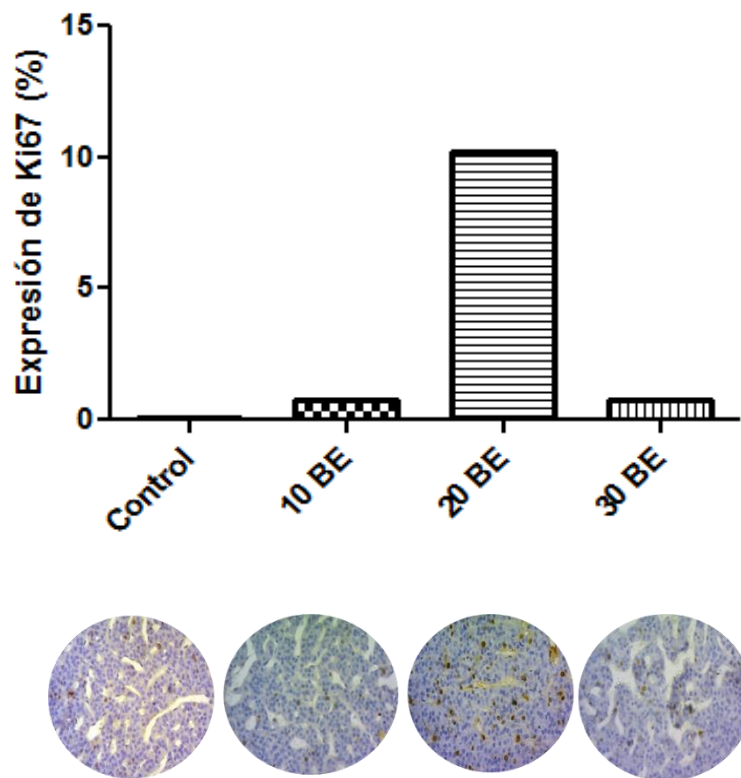
progresivo fenómeno de degranulación, comparado a la clásica morfología de las células lactotropas observadas en ratas macho controles. Otra particularidad observada a nivel subcelular fue la presencia a partir de los 20d de efecto hormonal, de células involutivas que mostraron marcada electrodensidad nuclear y citoplasmática.



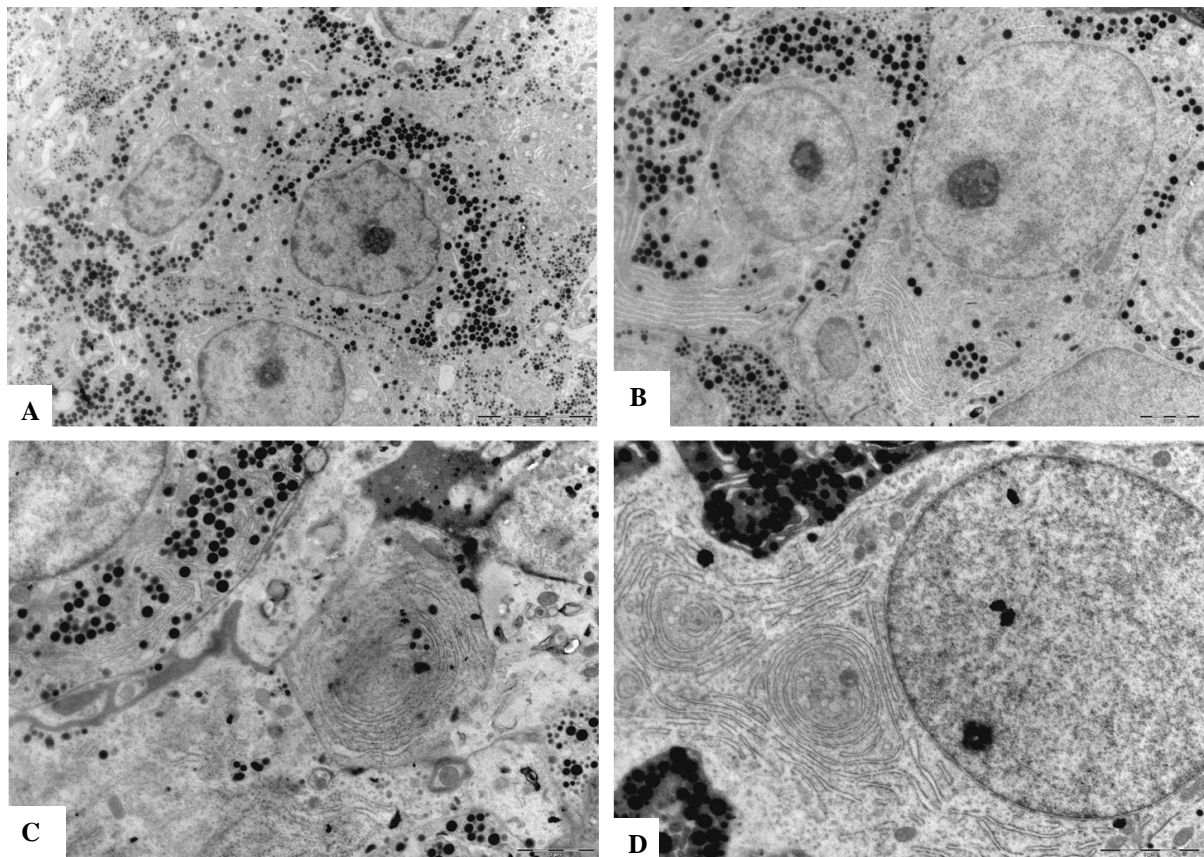
**Figura 1:** Microscopía fotónica de adenohipófisis control (A) y estimulada con BE por 10 (B), 20 (C) y 30 (D) días. Se destaca un progresivo incremento de la trama vascular, la que a los 30d se aprecia congestiva y marcadamente dilatada. H/E. 400X.



**Figura 2:** Microfotografías fotónicas de la trama de reticulina de sección de adenohipófisis control (A) y estimulada con BE por 30d (B). Se destaca la pérdida de la trama de sostén a los 30d BE compatible con un adenoma hipofisario. 400X.



**Figura 3:** Índice de proliferación de células adenohipofisarias marcadas con Ki-67. En las fotografías de inmunomarcación se aprecia el pico proliferativo a los 20d BE respecto a los otros tiempos de estimulación hormonal y al grupo control. Las imágenes microscópicas ponen en evidencia la inmunolocalización nuclear para la proteína de interés (Magnificación original 40X).

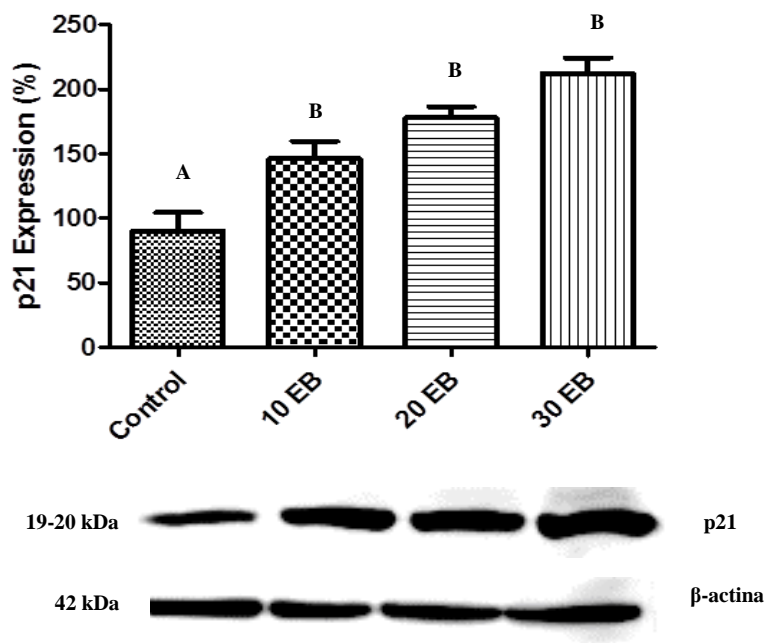


**Figura 4:** Microfotografías electrónicas de glándula adenohipófisis control (A) y estimuladas con BE por 10 (B), 20 (C) y 30 (D) días. Se identifica un progresivo fenómeno de degranulación de citoplasmas de células lactotropas en los tiempos de estímulo hormonal acompañado de hiperplasia de RER y aparato de Golgi. RER: retículo endoplásmico rugoso.

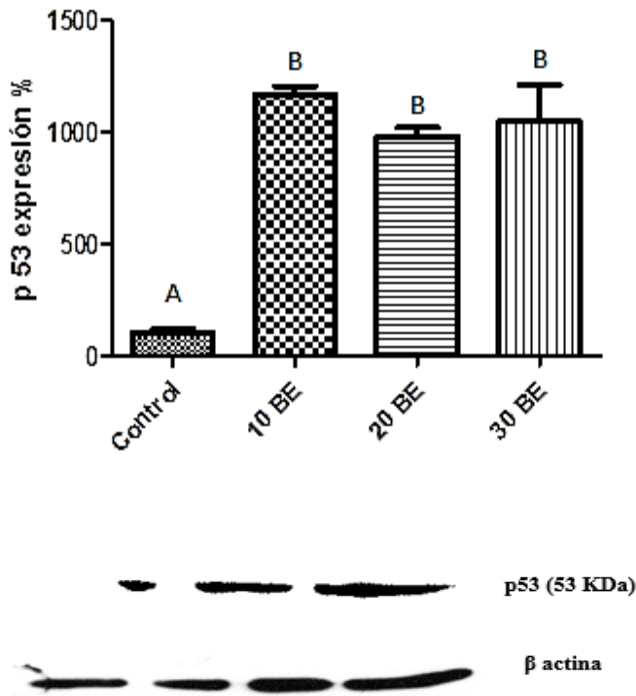
*Expresión de moléculas reguladoras del ciclo celular en lesiones proliferativas adenohipofisarias inducidas por estrógenos*

En el modelo experimental se analizó, mediante la técnica de WB, la expresión de las proteínas reguladoras del ciclo celular: p21 y p53. Con relación a p21, luego del estímulo estrogénico, hubo un incremento progresivo lineal de la proteína comparado con el grupo C, alcanzando los máximos niveles a los 30d BE (estado adenomatoso) ( $p < 0,05$  vs C), sin observarse diferencias significativas entre los diferentes tiempos de acción hormonal (**Figura 5**).

Un comportamiento similar se observó en la proteína p53, la que exhibió un marcado y significativo aumento de su expresión a los 10, 20 y 30 d de efecto estrogénico comparada con el grupo C ( $p < 0,05$ ). Asimismo, se evidenció una leve disminución de su expresión a los 20d de estimulación con BE, sin perder la significancia estadística respecto al control (**Figura 6**).



**Figura 5:** p21 en lesiones proliferativas adenohipofisarias inducidas por estrógenos. El pico de expresión se aprecia a los 30d BE. Medias con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

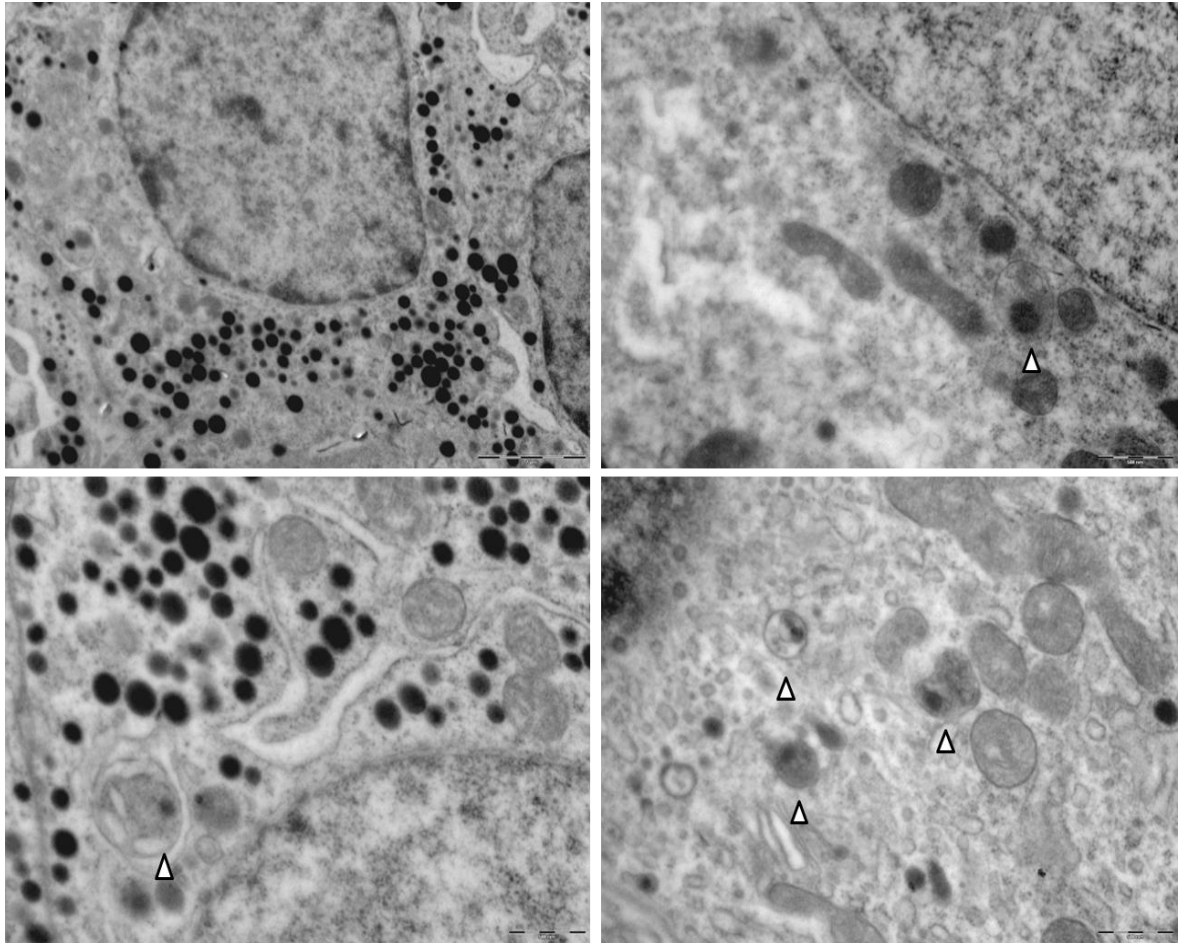


**Figura 6:** Análisis de la expresión de p53. Se destaca un incremento sostenido y significativo a lo largo del desarrollo hiperplásico/adenomatoso con relación al grupo control. Medias con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

*Evidencias ultraestructurales de macroautofagia en lesiones proliferativas adenohipofisarias inducidas por estrógeno*

Mediante la utilización de la MET, se demostró que la estimulación con BE indujo un proceso proliferativo hiperplásico/adenomatoso, con la presencia a nivel subcelular de elementos vesiculares de doble membrana compatibles con autofagosomas, con material en su interior y en diversos estadios de degradación. Estas estructuras se observaron en todos los tiempos de estimulación hormonal, siendo más evidentes a los 20d y 30d (**Figura 7**).

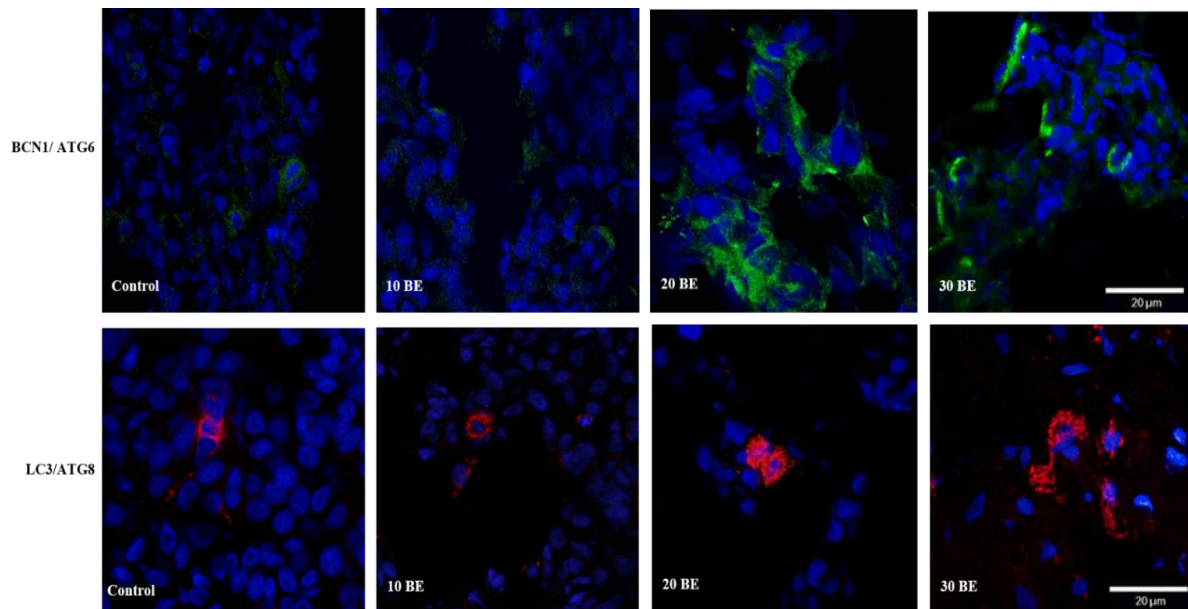




**Figura 7:** Vesículas autofágicas en el modelo de adenoma lactotrofo experimental. Se aprecian estructuras vesiculares de doble membrana a nivel subcelular las que resultan compatibles con vesículas autofágicas (cabezas de flecha).

*Expresión de Beclina 1 y LC3 en lesiones proliferativas adenohipofisarias inducidas por estrógeno*

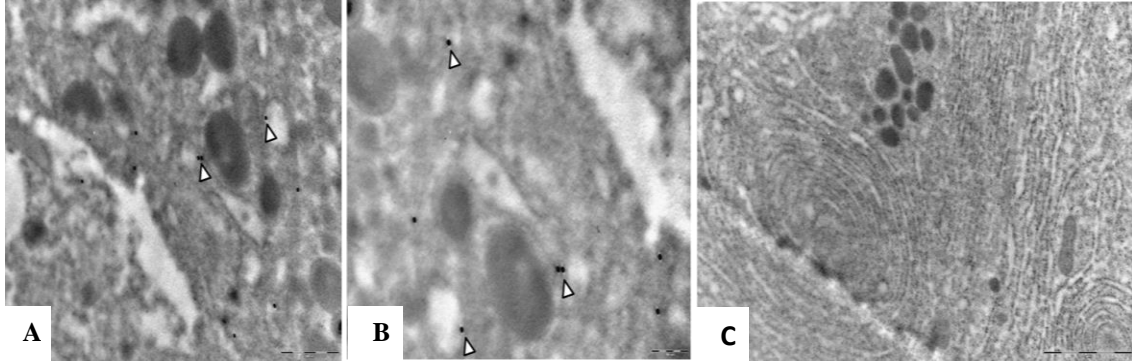
Beclina 1 y LC3 se expresaron en células del adenoparénquima en todos los tiempos de estimulación hormonal, siendo mayor a los 20d y 30d BE respecto al grupo C y 10d BE. (**Figura 8**). Ambas moléculas evidenciaron inmunolocalización citoplasmática en células aisladas o agrupadas.



**Figura 8:** Expresión de Beclina 1 y LC3 por inmunofluorescencia en lesiones proliferativas adenohipofisarias inducidas por estrógeno.

*Expresión de LC3 a nivel ultraestructural en lesiones proliferativas inducidas por estrógeno*

A los fines de analizar el compartimiento subcelular donde se localizan las proteínas marcadoras de la macroautofagia Beclina 1 y LC3 se procedió a inmunolocalizarlas mediante la técnica de ICQ ultraestructural. Mediante dicha metodología no pudo inmunomarcarse la primera de ellas. Sin embargo, se demostró LC3 a nivel subcelular en todos los tiempos de estimulación hormonal, siendo mayor su expresión a los 20 y 30 BE (**Figura 9**).

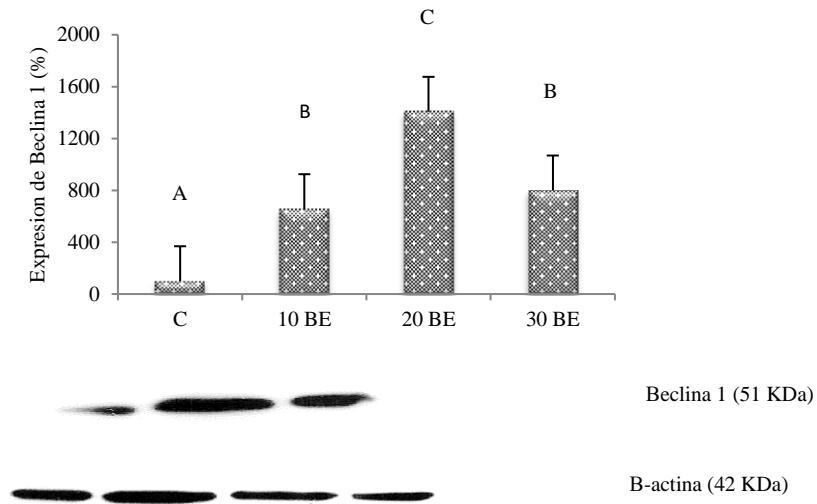


**Figura 9:** Inmunolocalización ultraestructural de LC3. A y B: El oro coloidal (15nm) marca la presencia de LC3 en citoplasma de células adenohipofisarias de ratas expuestas a BE, como así también en ambas caras de estructuras membranosas vesiculares compatibles con autofagosomas (flecha). C: control negativo.

*Semicuantificación de Beclina 1 mediante la técnica Western Blotting*

Beclina 1 evidenció un incremento significativo de su expresión respecto al C en todos los grupos que recibieron estimulación hormonal. Sin embargo, a los 20d BE, tiempo que correspondió al estado hiperplásico/adenomatoso hipofisario, Beclina 1 alcanzó los máximos niveles de expresión ( $p < 0.05$  vsC, 10d y 30d). A los 30d de estimulación con BE, la expresión disminuyó alcanzando los valores apreciados a los 10d BE ( $p < 0.05$  vsC y 20d BE) (**Figura 10**).

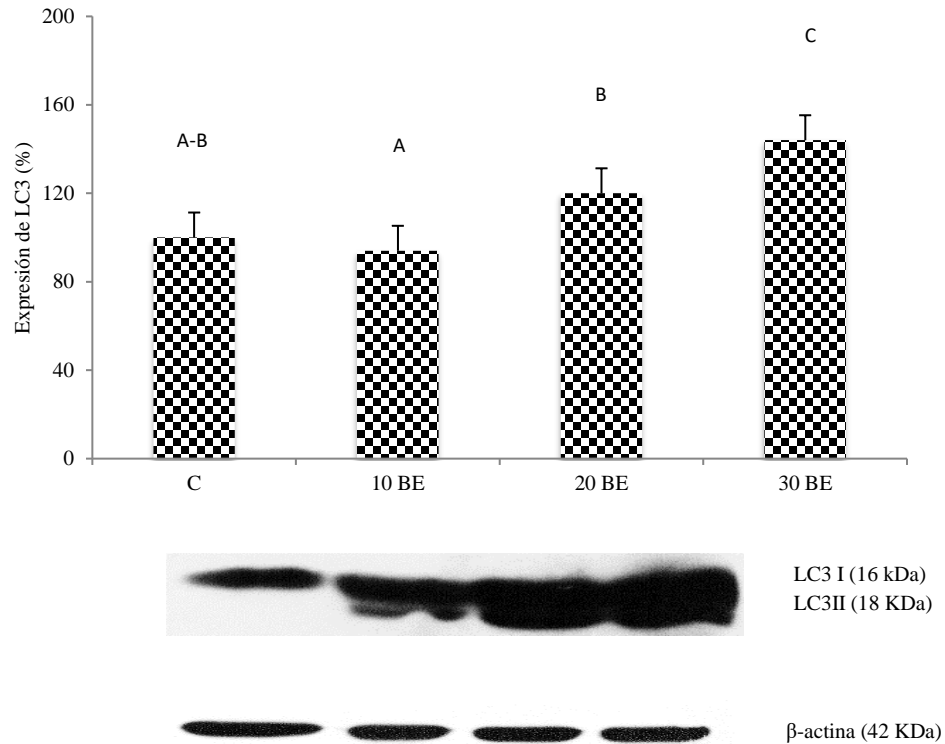




**Figura 10:** Expresión de Beclina 1 en lesiones adenohipofisarias inducidas por estrógeno, según tiempo de exposición hormonal: Control, 10, 20 y 30 días. Medias con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Semicuantificación de LC3 mediante la técnica Western Blotting

La semicuantificación de LC3 permitió evidenciar un incremento significativo de la expresión de esta molécula a los 10d, 20d y 30d de efecto hormonal, alcanzando los máximos niveles de expresión a los 30d BE ( $p < 0.05$  vs C, 10d y 20d) (**Figura 11**).

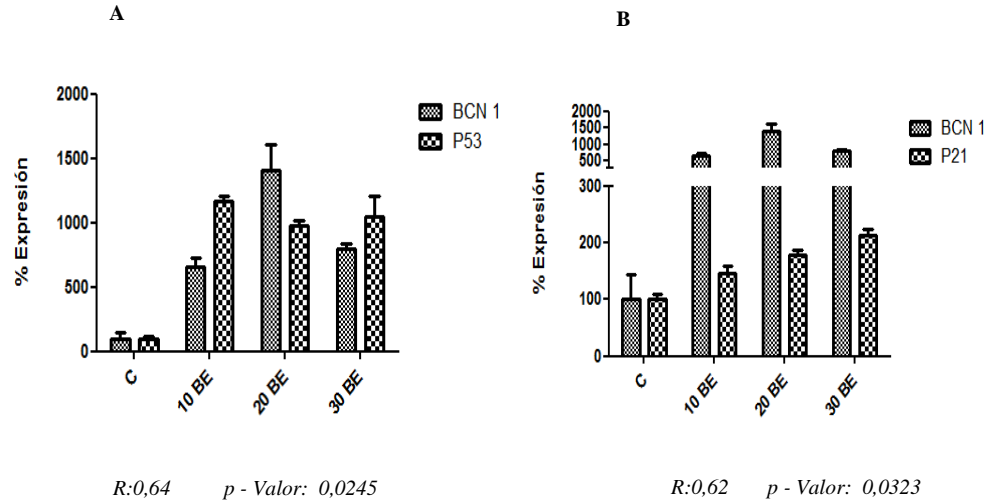


**Figura 11:** Expresión de LC3 en lesiones adenohipofisarias inducidas por estrógeno, según tiempo de exposición hormonal: Control, 10, 20 y 30 días. Medias con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

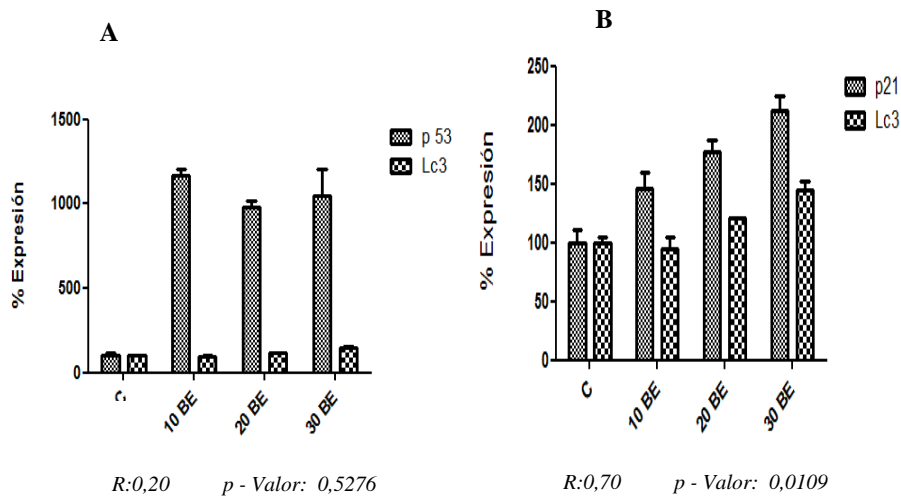
Correlación de p53 y p21 con Beclina 1 y LC3 en lesiones proliferativas inducidas por estrógeno

Al relacionar la expresión de marcadores de macroautofagia con p53 y p21 como mediadores de muerte y arresto celular, en el modelo experimental, se observó que Beclina 1 mantiene una correlación directa con ambas proteínas reguladoras del ciclo celular (*Beclina 1* y *p53*: Coeficiente de Pearson = 0.64; *Beclina 1* y *p21*: Coeficiente de Pearson = 0.62) en todos los tiempos de estimulación hormonal, presentando significación estadística en ambos casos (**Figura 12**).

Por su parte, LC3 evidenció una correlación directa y estadísticamente significativa con p21 (Coeficiente de Pearson = 0.7), mientras que para p53 se objetivó una tendencia inversamente proporcional, sin alcanzar la significación estadística (Coeficiente de Pearson = 0.20) (**Figura 13**).



**Figura 12:** Expresión porcentual de Beclina 1 y las proteínas reguladoras del ciclo p53 (A) y p21 (B) en todos los tiempos de estimulación hormonal del modelo de prolactinoma experimental. (R: Correlación de Pearson).



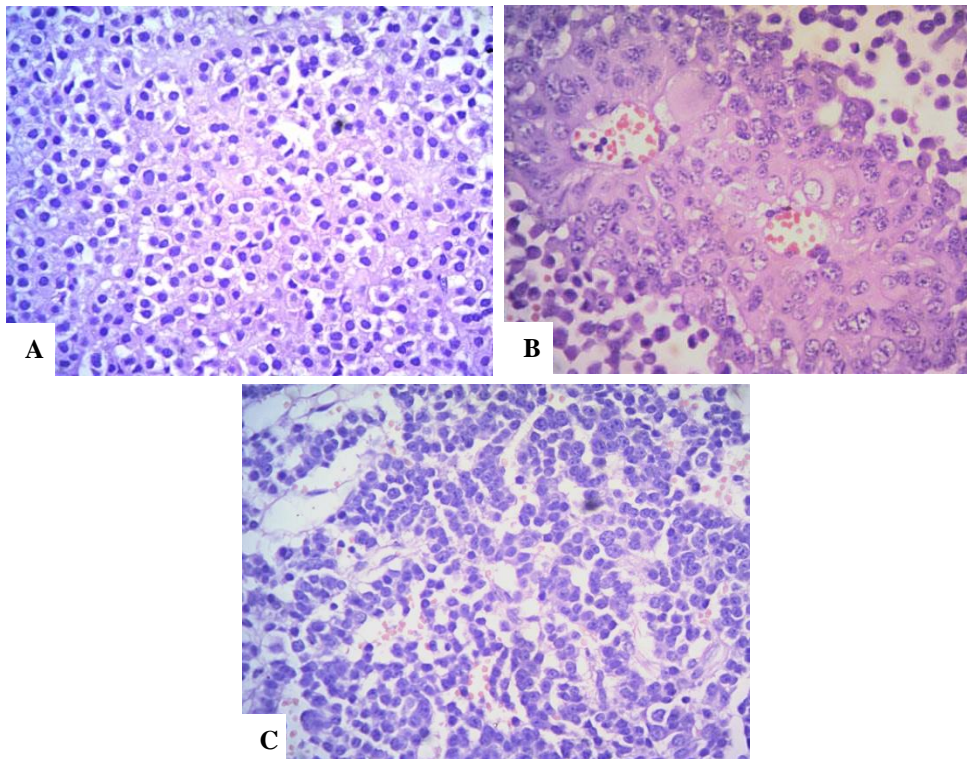
**Figura 13:** Expresión porcentual de LC3 y las proteínas reguladoras del ciclo p53 (A) y p21 (B) en los todos los tiempos de estimulación hormonal del modelo de prolactinoma experimental. (R: Correlación de Pearson).

## INVESTIGACIÓN APLICADA

### Datos clínicos patológicos de la cohorte de adenomas hipofisarios humanos funcionantes analizados

Los adenomas hipofisarios se caracterizaron con la tinción H/E, la determinación inmunohistoquímica de las hormonas sintetizadas y los hallazgos ultraestructurales. En esta cohorte (n:33), el 59% de los pacientes fueron mujeres, con una edad media de 39 (DE 12,96) años. Del total de adenomas hipofisarios analizados 27% fueron adenomas de células lactotropas, 33% de adenomas de células somatotropas/mamosomatotropas y 36% de células corticotropas.

Histológicamente se apreciaron células con amplios citoplasmas y núcleos regulares en las secciones coloreadas con H/E adoptando diversos patrones morfológicos: sólido, papilar y trabecular (**Figura 14**).



**Figura 14:** Patrones histomorfológicos de adenomas hipofisarios. Las células tumorales pueden adoptar diversos patrones de crecimiento, en planchas monomorfas conformando un patrón sólido (A); estructuras papilares (B) y cordones anastomosados conformando un aspecto trabecular (C). Magnificación original 400X.

Del total de adenomas hipofisarios el 58% fueron macroadenomas y el 42% microadenomas. La media del índice Ki67 fue 2,68 (DE: 0,39); IC del 95% 11,88 a 3,48. Setenta y tres por ciento de los adenomas revelaron un índice Ki67  $\leq 3\%$ . El índice Ki67 fue independiente de tamaño del tumor ( $p > 0,05$ ). Desafortunadamente, datos de la presencia o ausencia de invasión, sólo se pudo recabar en 9 de 33 adenomas hipofisarios.

La **Tabla 1** muestra las características clínicopatológicas de la cohorte de tumores analizada.

**Tabla 1:** Características clínico-patológicas de la cohorte de adenomas hipofisarios funcionantes

CASO	SEJO	EDAD	HISTOPATOLOGIA	IHQ-HORMONAS	TAMAÑO	INVASION	TRATAMIENTO MEDICO PREVIO	KI67%
1	M	59	LACTOTROPO escasamente granulado	PRL	M	SI	Dato no disponible	8
2	M	51	LACTOTROPO escasamente granulado	PRL	M	SI	Dato no disponible	1
3	F	30	LACTOTROPO escasamente granulado	PRL	M	Dato no disponible	Dato no disponible	1
4	M	27	LACTOTROPO escasamente granulado	PRL	M	Dato no disponible	Dato no disponible	10
5	M	35	LACTOTROPO escasamente granulado	PRL	M	SI	Resistente	5
6	M	60	LACTOTROPO escasamente granulado	PRL	M	Dato no disponible	Resistente	5
7	F	20	LACTOTROPO escasamente granulado	PRL	m	Dato no disponible	Resistente	1
8	F	38	LACTOTROPO escasamente granulado	PRL	m	Dato no disponible	Resistente	1
9	F	31	LACTOTROPO escasamente granulado	PRL	m	Dato no disponible	Resistente	1
10	F	26	LACTOTROPO escasamente granulado	PRL	m	Dato no disponible	Resistente	1
11	M	57	SOMATOTROPO densamente granulado	STH	M	Dato no disponible	Sin tratamiento previo	2
12	F	33	SOMATOTROPO densamente granulado	STH	M	SI	Sin tratamiento previo	1
13	F	64	SOMATOTROPO escasamente granulado	STH	M	Dato no disponible	Sin tratamiento previo	0
14	F	49	SOMATOTROPO escasamente granulado	STH	M	Dato no disponible	Sin tratamiento previo	1
15	M	29	SOMATOTROPO escasamente granulado	STH	M	Dato no disponible	Sin tratamiento previo	3
16	F	58	SOMATOTROPO densamente granulado	STH	m	Dato no disponible	Dato no disponible	3
17	M	37	SOMATOTROPO escasamente granulado	STH	m	Dato no disponible	Sin tratamiento previo	2
18	F	35	IMMUNOSOMATOTROPO	STHPRL	M	Dato no disponible	Sin tratamiento previo	4
19	M	28	IMMUNOSOMATOTROPO	STHPRL	M	Dato no disponible	Sin tratamiento previo	2
20	M	53	IMMUNOSOMATOTROPO	STHPRL	m	Dato no disponible	Sin tratamiento previo	5
21	F	41	IMMUNOSOMATOTROPO	STHPRL	m	Dato no disponible	Sin tratamiento previo	1
22	M	35	CORTICOTROPO densamente granulado	ACTH	M	SI	Sin tratamiento previo	1
23	F	32	CORTICOTROPO densamente granulado	ACTH	M	Dato no disponible	Sin tratamiento previo	5
23	F	62	CORTICOTROPO densamente granulado	ACTH	M	NO	Sin tratamiento previo	2
25	F	51	CORTICOTROPO densamente granulado	ACTH	M	Dato no disponible	Sin tratamiento previo	3
26	F	31	CORTICOTROPO densamente granulado	ACTH	M	Dato no disponible	Sin tratamiento previo	2
27	F	41	CORTICOTROPO densamente granulado	ACTH	M	Dato no disponible	Sin tratamiento previo	2
28	F	55	CORTICOTROPO densamente granulado	ACTH	m	NO	Sin tratamiento previo	0
29	F	23	CORTICOTROPO densamente granulado	ACTH	m	NO	Sin tratamiento previo	3
30	M	30	CORTICOTROPO densamente granulado	ACTH	m	NO	Sin tratamiento previo	3
31	F	21	CORTICOTROPO densamente granulado	ACTH	m	Dato no disponible	Sin tratamiento previo	1
32	F	25	CORTICOTROPO densamente granulado	ACTH	m	Dato no disponible	Sin tratamiento previo	7
33	F	38	CORTICOTROPO densamente granulado	ACTH	m	Dato no disponible	Sin tratamiento previo	1

### Análisis subcelular de adenomas hipofisarios humanos: evidencias ultraestructurales de macroautofagia

El análisis subcelular de los adenomas hipofisarios permitió la identificación de aspectos morfológicos muy característicos de los diversos subtipos tal como se muestra en la **Figura 15**.

La evaluación a través de MET permitió observar en 20 de 33 adenomas hipofisarios funcionantes, características morfológicas compatibles con macroautofagia. La característica ultraestructural más llamativa y mejor documentada fue la presencia de numerosas vesículas limitadas por membrana con material amorfo electrodensito y mitocondrias en su interior(**Figura 16**).

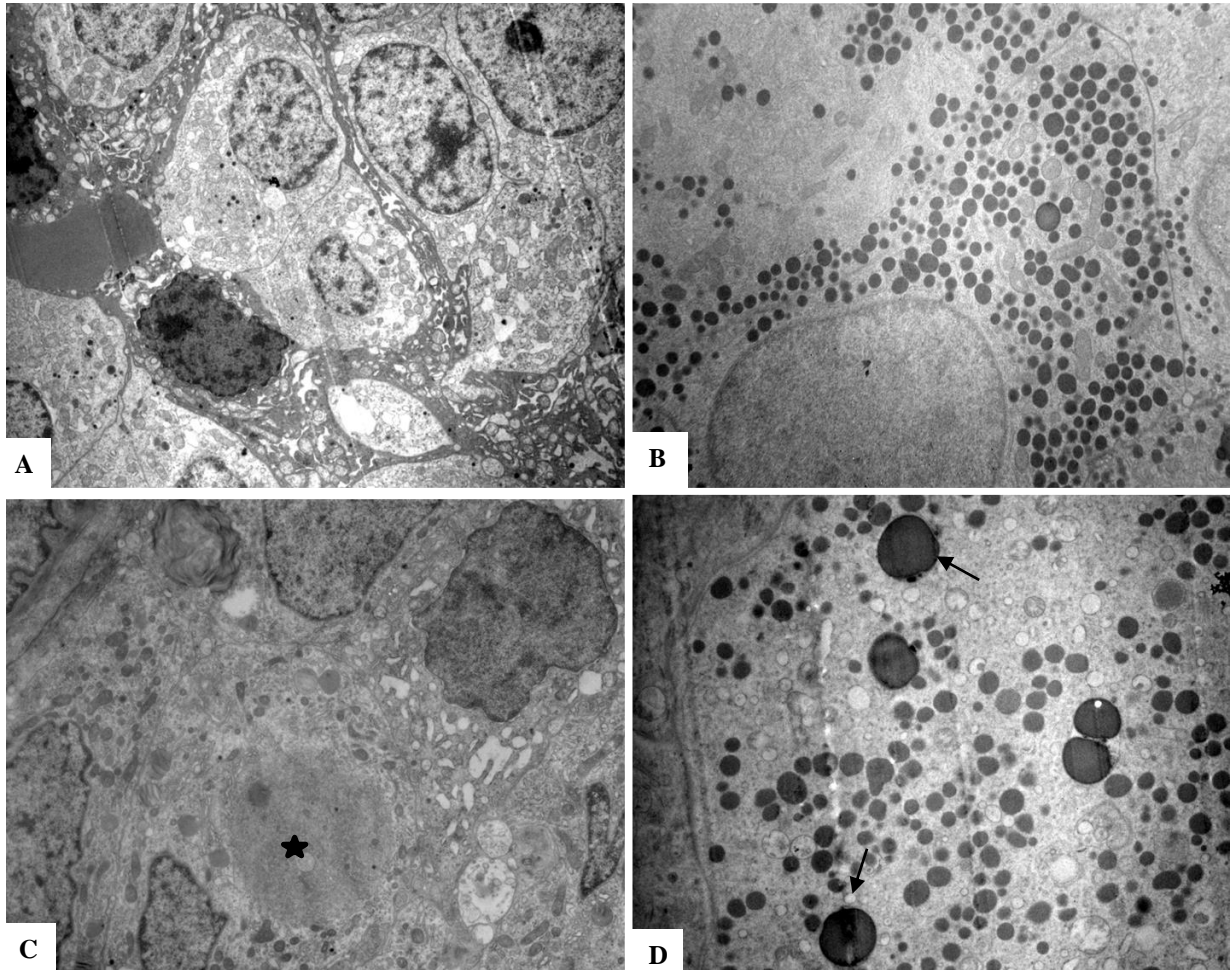
### Expresión de Beclina 1 y LC3 en adenomas hipofisarios humanos

La expresión de ambas moléculas relacionadas al proceso de macroautofagia se observó en 20 de los 33 adenomas hipofisarios funcionantes analizados. Como puede observarse en la **Tabla 2**, de los adenomas positivos para Beclina 1 y LC3 el 60% exhibió expresión de las moléculas de interés, la que varió del 11 al 50% de células inmunorreactivas.

El análisis mediante la técnica de inmunohistoquímica puso en evidencia inmunomarcación citoplasmática difusa tanto de Beclina 1 como de LC3. Las células inmunopositivas se distribuyeron en el adenoparénquima de manera individual o conformando pequeños agrupamientos (**Figura 17**).

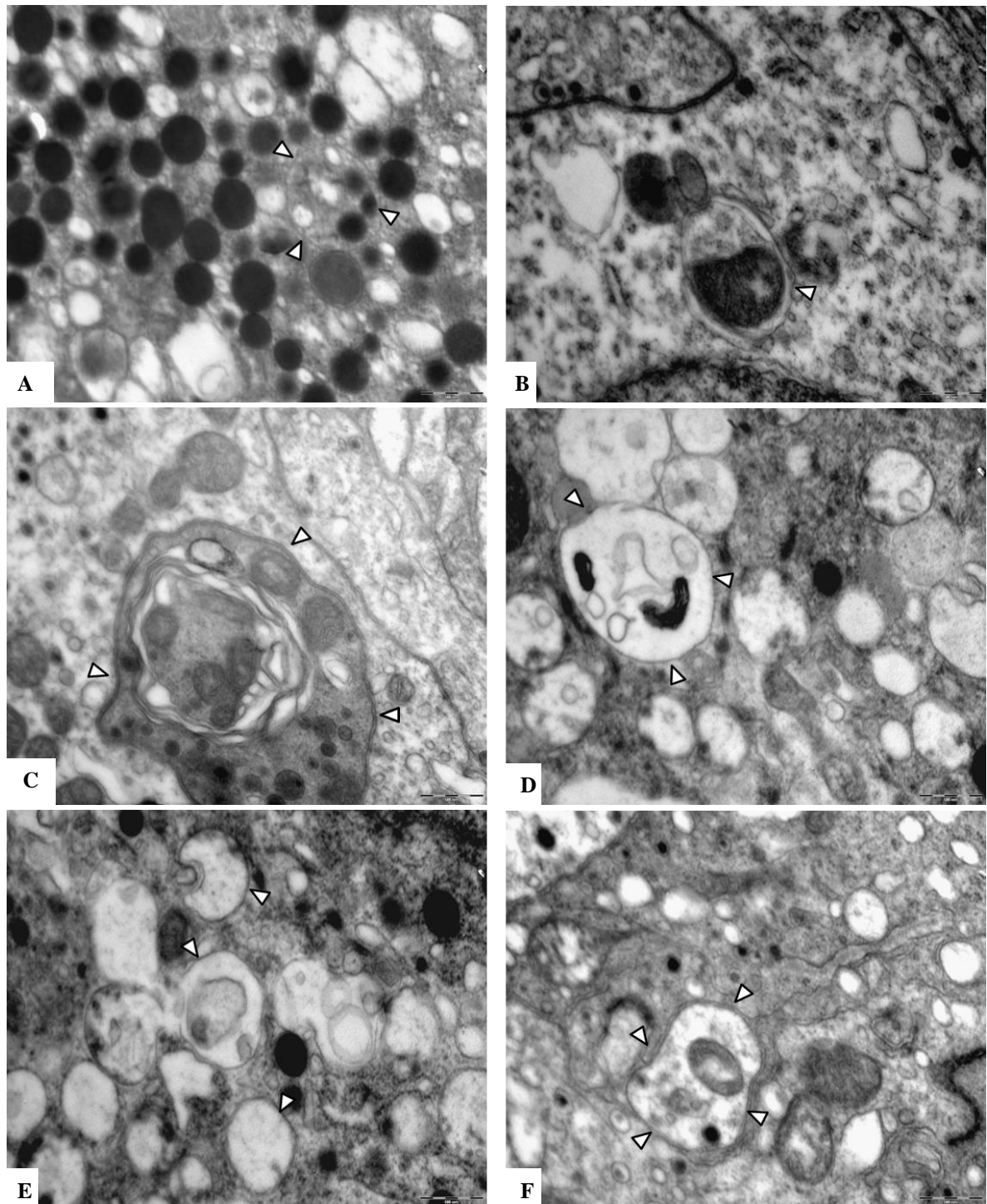
El análisis semicuantitativo de los marcadores de macroautofagia permitió comprobar una expresión mayor de las moléculas en adenomas de células somatotropas funcionantes (n:7) versus glándulas normales (**Figura 18**).

El análisis estadístico entre la expresión de Beclina 1 y LC3 asociado a los parámetros clínico-patológicos sólo puso en evidencia una diferencia significativa para Beclina 1 y LC3 entre macro y microadenomas ( $p < 0,05$ ) (**Tabla 3**).



**Figura 15.** Hallazgos ultraestructurales en diferentes adenomas pituitarios humanos funcionantes. (A) Adenoma de células lactotropas, (B) adenoma de células somatotropas densamente granulado, (C) adenoma de células somatotropas escasamente granulado de núcleo irregular con acumulación esférica de filamentos intermedios (asterisco), (D) adenoma de células corticotropas densamente granulado con gránulos secretorios de 200 a 300 nm y voluminosos lisosomas (flechas). Magnificaciones originales 7400X.

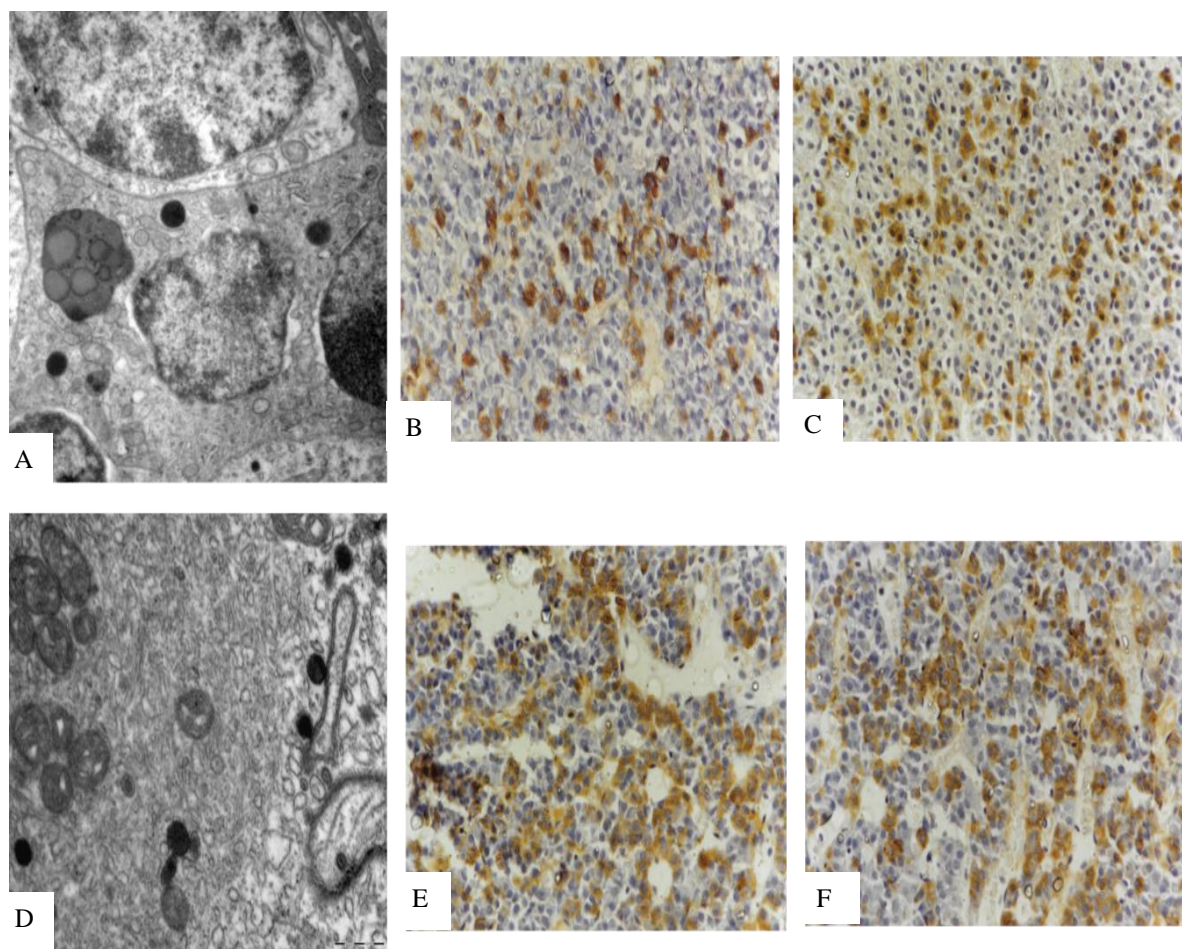




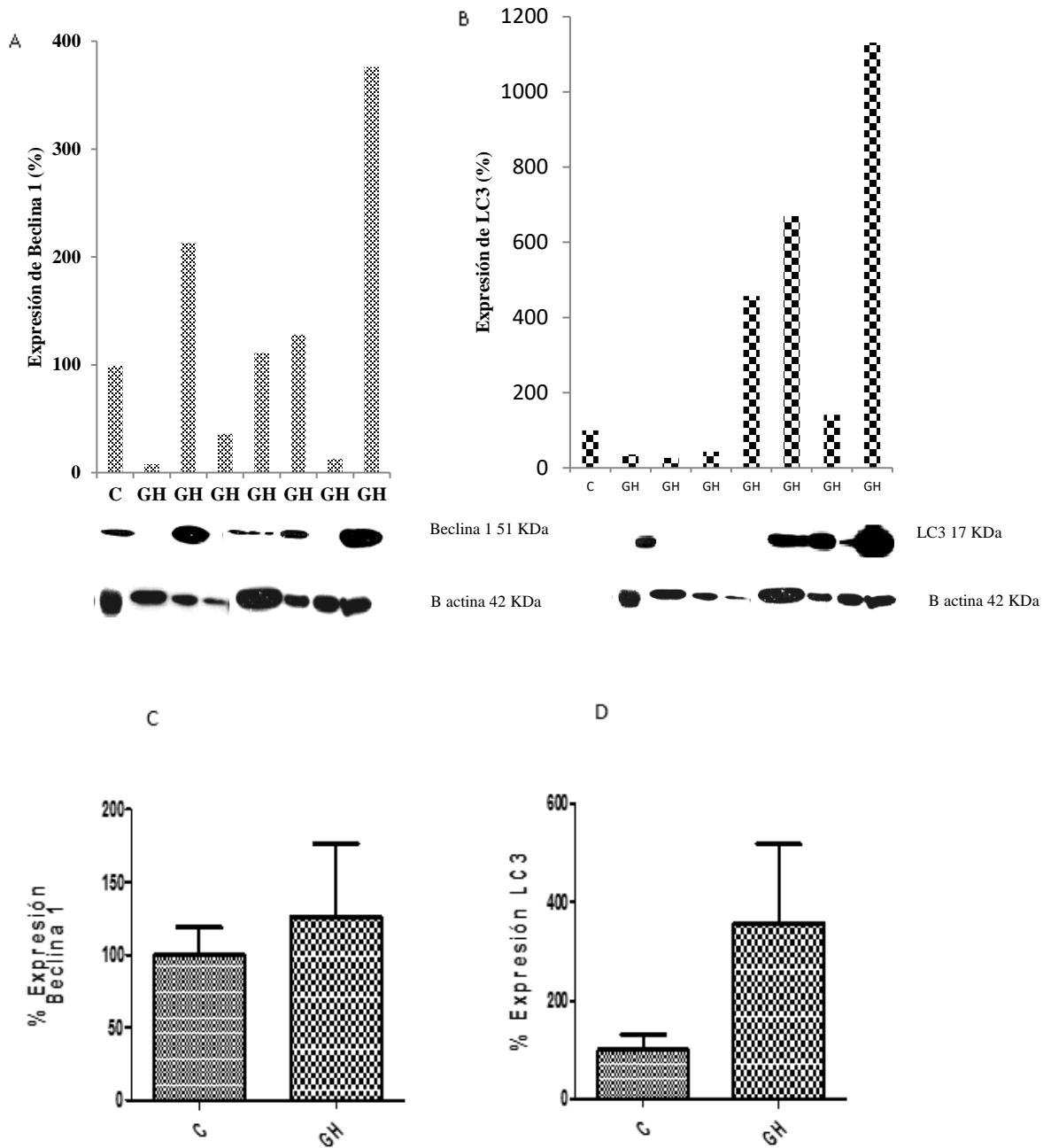
**Figura 16:** Imágenes ultraestructurales representativas de vacuolas macroautofágicas observadas en diferentes tipos de adenomas hipofisarios. Se destaca la presencia de vesículas con diferentes contenidos tales como gránulos secretorios (A), fragmentos de citoplasma y mitocondria (B-F).

**Tabla 2:** Expresión de Beclina 1 y LC3 en adenomas hipofisarios humanos

Adenoma	<i>n</i>	Neg	1+	2+	3+	4+
PRL	10	5	2	2	0	1
GH	11	3	3	4	0	1
ACTH	12	5	0	5	0	2



**Figura 17:** Evidencias moleculares de macroautofagia en adenomas hipofisarios humanos funcionantes. Estos ejemplos de adenoma de células lactotropas (A) y de células somatotropas escasamente granuladas (D), demuestran la expresión citoplasmática difusa de Beclina 1 (B y E) y LC3 (C y F) tanto en elementos celulares aislados como en conglomerados.



**Figura 18:** Análisis de la expresión de Beclina 1 (A) y LC3 (B) por WB, en una cohorte de adenomas de células somatotropas y adenohipófisis normales (n:7). Tanto Beclina 1 (C) como LC3 (D) presentaron mayor expresión en el grupo de los adenomas vs el grupo de hipófisis control, sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

**Tabla 3:** Relación de la expresión de Beclina 1 y LC3 con características clinicopatológicas de adenomas hipofisarios humanos funcionantes.

		<b>Inmuntinción para Beclina 1 y LC3</b>		
<b>Datos clínicos</b>	<b>n</b>	<b>Positivo (Casos)</b>	<b>Porcentaje (%)</b>	<b>Valor p (&lt; 0,05)</b>
<i>Edad</i>				
≥40	13	8	61,5	0.48
<40	20	9	45	
<i>Género</i>				
Masculino	12	8	61,53	0.50
Femenino	21	11	52,38	
<i>Adenoma</i>				
PRL	10	5	50	0.60
GH	11	8	63,63	
ACTH	12	7	58,33	
<i>Tamaño Tumoral</i>				
Macro	19	13	68,42	0.046
Micro	14	6	40	

## DISCUSIÓN

El presente trabajo de Tesis Doctoral ha abordado un tema de suma actualidad no sólo en el campo de la investigación básica sino también aplicada de la Medicina: la macroautofagia. Este mecanismo empezó a estudiarse en la década de 1960 y su interés ha ido acrecentándose a lo largo de los años de tal forma que, en 2016, la Asamblea Nobel en el Instituto Karolinska, otorgó el Premio en Medicina y Fisiología al biólogo celular japonés Yoshinori Ohsumi por sus investigaciones en la identificación y caracterización de la maquinaria de la autofagia (5). La gran relevancia del presente estudio es que este mecanismo celular evolutivamente conservado (155) ha sido analizado en una de las neoplasias más frecuentes del SNC: los adenomas hipofisarios, recientemente también denominados PitNETs (130). Este proceso celular fue evaluado en un diseño experimental básico desarrollado en ratas macho de la cepa F344 y en un grupo de adenomas funcionantes humanos.

La autofagia es un proceso de autodegradación celular controlado genéticamente, que se caracteriza por la formación de vesículas de doble membrana que capturan y secuestran componentes intracelulares que posteriormente se degradan en la luz lisosomal (2). Tiene diversas funciones fisiológicas que se mantienen en todo el organismo, sin embargo, también está involucrada en la patología de múltiples enfermedades. A nivel del sistema endocrino, la autofagia tiene funciones clásicas como así también específicas (156). La crinofagia es una variante de autofagia presente en glándulas endocrinas y en la hipófisis normal se encarga del mantenimiento de los niveles hormonales a través de la degradación de excesivos gránulos de secreción (157). Se ha demostrado que, durante el ciclo estral natural de la rata, si no se produce la gestación, los gránulos de PRL se fusionan con los lisosomas para ser degradados y reciclar sus aminoácidos (158). Kuriakose y col. (124), postularon que, en células lactotropas, este proceso puede ser modulado por esteroides, demostrando que los estrógenos estimulan la crinofagia mientras que la progesterona la inhibe (124). Aunque las investigaciones inicialmente se centraron en células productoras de PRL, también se ha confirmado que esta variante de autofagia está desarrollada en otros tipos de células de la adenohipófisis como corticotropas, somatotropas, gonadotropas y

tirotropas (159) (160) (123). En la actualidad, la macroautofagia también se puso en evidencia en el tejido adenomatoso pituitario, tanto en modelos básicos como en reportes aislados de casos de adenomas humanos (134) (136), pero aún se desconoce si este mecanismo está asociado al desarrollo tumoral o si actúa como responsable del control e inhibición de su crecimiento (161) (162). Es por este motivo que a partir de las investigaciones de esta Tesis Doctoral nos propusimos aclarar algunas de estas incógnitas.

A los fines de dar respuesta a ciertos mecanismos de génesis tumoral adenohipofisaria mediados por macroautofagia, se analizaron en el modelo experimental, dos de las moléculas marcadoras del proceso: Beclina 1 y LC3 y su relación con las proteínas reguladoras del ciclo celular.

La cepa de ratas F344 es una de las más sensibles al desarrollo de prolactinoma experimental y se la considera apropiada, aunque con limitaciones, para el estudio de los mecanismos tumorales adenohipofisarios ya que en ellas es factible controlar los procesos secretores, la proliferación celular normal, anormal y sus interrelaciones (163) (164). Se ha demostrado que los estrógenos tienen diferentes efectos sobre la función pituitaria, incluida la regulación de la síntesis y secreción de la mayoría de sus hormonas, la proliferación de sus diferentes tipos de células y poseen efectos mitogénicos en la glándula que están mediados por el receptor estrogénico alfa ( $ER\alpha$ ) (165) (166). A largo plazo, estas hormonas esteroideas pueden inducir tumores en una variedad de modelos animales, entre los cuales se incluyen los tumores pituitarios productores de PRL en ratas (167). En nuestro estudio, pudimos demostrar que tras 30d de estimulación con BE, se desarrollaron sobre un fondo hiperplásico, sectores adenomatosos. De manera similar Mukdsi y col. (153) describieron, en ratas macho de la cepa Wistar, transformación adenomatosa tras 60 días de efecto estrogénico, con un aumento progresivo del tamaño glandular, tal como lo reportaran Weiner y col. (168).

Asimismo, pudimos observar en nuestro modelo experimental, que la tasa de proliferación celular, evaluada mediante la inmunomarcación para Ki-67, tuvo su mayor índice a los 20d de acción estrogénica respecto a los demás tiempos de efecto hormonal y al grupo C. Este pico proliferativo se correspondió con el estadio hiperplásico/adenomatoso glandular. En concordancia con nuestros hallazgos,

Miyajima y col. (169), estudiaron la proliferación celular en un modelo de prolactinoma inducido por E2 en ratas F344 y demostraron también un marcado aumento en el número de células inmunopositivas para Ki-67 en las pituitarias de los murinos estrogenizados versus el grupo control (169). En contrapartida, Takekoshi y col. (170), evidenciaron en otro modelo tumoral inducido por estrógenos, pero en ratas de la cepa Sprague-Dawley, la aparición de nódulos neoplásicos cuyas células expresaron inmunopositividad para PRL y para las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de TSH, simulando un adenoma humano plurihormonal. Sin embargo, en estos tumores hipofisarios experimentales, la expresión de Ki-67 no demostró ser significativamente mayor con relación al resto del parénquima glandular no adenomatoso (170). En otro estudio de tumores hipofisarios experimentales inducidos en la cepa Wistar, la cuantificación de las células inmunopositivas para Ki-67 reveló un aumento significativo de la proliferación celular en el grupo de animales estrogenizados durante 10d, con un pico de aproximadamente ocho veces mayor respecto al grupo C, sin embargo, esta tasa proliferativa no se mantuvo durante todo el período analizado (40 d) y disminuyó sucesivamente aunque permaneció siendo más alto que los controles (171). Todos estos datos permiten inferir que el estímulo estrogénico en adenohipófisis genera cierto grado de proliferación celular en animales de laboratorio, pero el mismo es dependiente de la cepa.

Otra de las moléculas que se analizó fue la proteína p53 la cual, junto con p21 (su principal proteína diana), participan en el control del ciclo celular, inhibiendo la progresión del mismo frente a diversos escenarios, e intervienen en los mecanismos de muerte celular como apoptosis y autofagia (172). Cabe destacar que cada una de las funciones mencionadas de p53 está vinculada a su localización subcelular (116).

En los diferentes tiempos de estimulación con BE evaluados, p53 exhibió un marcado y significativo aumento de su expresión a los 10, 20 y 30d comparada con el grupo C, donde presentó niveles prácticamente indetectables. En un modelo animal similar de tumores hipofisarios, pero desarrollado en la cepa Wistar, Sabatino y col. (171) observaron un incremento de esta molécula a los 10 y 20d BE, con una clara localización en el compartimento citoplasmático y un descenso de sus niveles a los 40d de acción hormonal. Por su parte, Molinari y col. (173), describieron en una línea

celular de cáncer de mama MCF-7, que el estrógeno induce inactivación de p53, redistribuyéndolo al citosol, siendo este evento necesario para la proliferación de células inducidas por la hormona esteroidea. Si bien en nuestro modelo experimental no se analizaron fracciones subcelulares para evidenciar cambios en la relación citoplasmática/nuclear de p53, nuestros resultados son concordantes con los descritos por Sabatino y col. (171), con relación a la expresión de la proteína en modelos murinos estrogenizados, donde la relocalización de p53 podría estar asociada con la puesta en marcha de mecanismos de freno de la proliferación de las lactotropas (171), situación que pudimos apreciar en el tiempo final de estímulo estrogénico en virtud de una caída del pico de expresión de Ki-67 tal como fue observado después de los 20d BE. Como se mencionó previamente y en respuesta al daño del ADN, p53 induce a la que es probablemente la más importante de sus dianas transcripcionales, p21, la cual inhibe el complejo CDK-ciclina específicamente en la fase G1 y G2, bloqueando la progresión del ciclo celular e impidiendo el crecimiento de las células (174). En nuestro modelo de prolactinoma experimental, se apreció un incremento progresivo y significativo de la expresión de p21, alcanzando el máximo nivel a los 30d BE, tiempo relacionado con el desarrollo adenomatoso glandular. Esto permite hipotetizar que, en este tiempo de efecto hormonal, p21 estaría ejerciendo un efecto inhibitorio del ciclo celular debido a su mayor expresión. En un estudio con ratones knock-out con fenotipo doble negativo para p18/ p21, se demostró el desarrollo de adenomas hipofisarios más allá de los tres meses de edad (175). Sin embargo, aunque estos datos sugieren que la ausencia de p21 fomenta la aparición de la neoplasia hipofisaria, la sobreexpresión de p21 observada en los tumores también podría reflejar la interrupción de las vías sucesivas dependientes de p21, particularmente si la proteína es defectuosa a pesar de su abundancia relativa (176). Con el fin de aclarar aspectos sobre la patogenia de los adenomas hipofisarios, Chesnokova y col. (177) examinaron los mecanismos que favorecen la proliferación de células pituitarias, a partir del análisis de los cambios en la expresión del gen transformador de tumores hipofisarios (PTTG) y su efecto sobre las proteínas reguladoras del ciclo celular p53 y p21 en un modelo de ratones nulos para PTTG (177). La delección de este gen dio como resultado la inducción de la proteína p21 y abolió el desarrollo de tumores hipofisarios en ratones doblemente nulos



para RB/PTTG. Posteriormente, el mismo grupo de trabajo generó un modelo murino negativo para p21 y demostró que la ausencia de esta proteína invirtió la tasa de proliferación atenuada previamente y desencadenó un mayor desarrollo tumoral hipofisario en estos animales. Los resultados mencionados, indicarían que los cambios en la expresión de PTTG y p21 promueven la senescencia, frenando así el crecimiento tumoral (177).

Hasta este punto pudimos demostrar que, durante el desarrollo hiperplásico/adenomatoso hipofisario inducido por BE, se incrementan de manera significativa p53 y p21, probablemente como un freno a la proliferación celular. El siguiente paso fue analizar si se pone en marcha el mecanismo macroautofágico y qué asociación tendría con las moléculas anteriormente mencionadas.

La detección y el monitoreo adecuados de la macroautofagia constituyen un gran desafío teniendo en cuenta que se trata de un fenómeno de autodegradación celular altamente dinámico (147). Para estimar con precisión esta actividad, es esencial determinar el flujo autofágico, sin embargo, éste resulta difícil de medir tanto en células cultivadas como en modelos experimentales animales, siendo incluso actualmente poco viable en humanos (178). El método más antiguo utilizado para demostrar la autofagia es la MET, ya que permite identificar ultraestructuralmente la presencia de las vesículas típicas vinculadas al mecanismo (148). En el modelo murino, mediante el uso de MET, pudimos evidenciar hallazgos morfológicos compatibles con autofagosomas, a partir de la presencia de estructuras subcelulares delimitadas por una bicapa lipídica y con material citoplasmático en su interior (mitocondrias, RE, gránulos de secreción) en diferentes estadios de degradación. Estos elementos vesiculares, se objetivaron en todos los tiempos de estimulación con BE, siendo aparentemente mayor en número y tamaño a los 20d y 30d. Estos hallazgos se encuentran avalados por Eskelinen E. (179), quien postuló que la evidencia de componentes citoplasmáticos englobados en vesículas de doble membrana es el sello distintivo de los autofagosomas, proporcionando la certeza definitiva del proceso, y en otro de sus reportes (180), se especifica que la MET sigue siendo imprescindible para confirmar y verificar los resultados obtenidos por otros métodos, permitiendo analizar los detalles subcelulares de las organelas y determinando características de los subtipos específicos

de autofagia. Sin embargo, no podemos desestimar que, si bien la utilidad de la MET es indiscutible para el análisis de este proceso, es un método que puede conducir a interpretaciones variadas, teniendo en cuenta la compleja organización tridimensional de los tejidos (181).

Hallazgos ultraestructurales similares de macroautofagia a los que describimos en la presente Tesis Doctoral, fueron reportados en otros modelos experimentales. Jacob y col. (182), publicaron datos morfológicos compatibles con autofagosomas en células acinares pancreáticas en un modelo murino de pancreatitis aguda experimental inducida por fármacos. En analogía con lo reportado en nuestro modelo, estas vacuolas observadas mediante MET, estaban delimitadas por una doble membrana y contenían material citoplasmático en su interior (mitocondrias, fragmentos de RE, gránulos de zimógeno). En el reporte de Yi y col. (183), se demostró, mediante igual metodología, la presencia en células de Leydig de rata con autofagosomas que engloban mitocondrias, RE y gránulos secretores (183). Asimismo, la tasa de actividad autofágica en estos animales presentó fluctuaciones de acuerdo con la necesidad de síntesis hormonal (184). Este patrón de la activación de la autofagia reportado por Yi y col. (183), se podría comparar a los estudios de crinofagia descritos anteriormente en las células hipofisarias (157).

Tomando en consideración que la macroautofagia es un proceso dinámico que se desarrolla en múltiples pasos consecutivos y que está regulada en todas sus etapas por diferentes moduladores (156), se consideró necesario asociar al análisis ultraestructural otras metodologías complementarias. Para ello, y tomando en cuenta que el estudio molecular de la macroautofagia requiere de al menos dos técnicas que detecten la expresión de sus proteínas involucradas (2), se utilizaron IF y WB para analizar dos marcadores del mecanismo. Las proteínas estudiadas fueron Beclina 1 (185) y LC3 (186), las cuales participan en las etapas de inducción y formación del autofagosoma respectivamente (24). Estas dos moléculas se consideran “marcadoras claves de la macroautofagia” y han sido ampliamente analizadas en diferentes tejidos y en relación con los puntos regulatorios del proceso (26).

En nuestro modelo experimental, durante el desarrollo del prolactinoma experimental y mediante IF ambas moléculas fueron inmunodetectadas a nivel

citoplasmático tanto en células aisladas como agrupadas en todos los tiempos de estimulación con BE, siendo la expresión de estas más evidente a los 20 y 30d de efecto hormonal. Mediante la técnica de WB pudimos evidenciar que Beclina 1 demostró sus mayores niveles de expresión a los 20d BE (estado hiperplásico/adenomatoso) mientras que LC3 (en sus dos isoformas: LC3-I y LC3-II) presentó mayor concentración a los 30d BE con significación estadística respecto al grupo C.

Un dato de importancia fue que en nuestro modelo experimental LC3 al ser semicuantificada se presentó con sus dos isoformas.LC3-I, que es citosólica, y la otra LC3-II, que está conjugada con FE y se encuentra presente en estructuras membranosas, por ejemplo, el autofagosoma. La conversión de LC3-I a LC3-II representa la conjugación de la molécula con FE y demuestra la activación del proceso (187). La cantidad de LC3-II está estrechamente correlacionada con el número de autofagosomas, por lo cual sirve como un buen indicador de la formación de los mismos. Sin embargo, en algunos casos la acumulación de estos compartimentos autofágicos detectada por MET no se correlaciona con la cantidad de LC3-II semicuantificada, y esto puede deberse ya sea a un intenso flujo de autofagia que consume la proteína rápidamente o bien a la utilización de tejidos o cultivos celulares donde LC3-I es muy abundante (por ejemplo, el tejido cerebral) razón por la cual, la banda correspondiente a esta isoforma obstaculiza la visión de la banda de LC3-II. Con la finalidad de mejorar la interpretación de los resultados donde la expresión de LC3 II es muy abundante, algunos autores recomiendan utilizar inhibidores de proteasas lisosomales (188).

Un aspecto importante para considerar es que, el modelo experimental utilizado está inducido por BE. Estudios realizados en glándula mamaria, la que claramente responde a los estrógenos, demostraron que el E2 induce autofagia en células epiteliales por estimulación de la expresión de genes relacionados a este proceso (*BECN1*, *LC3*), como así también de los niveles de las proteínas correspondientes (189). De la misma manera, se comprobó que estas hormonas esteroideas ejercen un efecto protector de los miocardiocitos al inducir la maquinaria macroautofágica en el tejido cardiaco (190). A nivel tumoral se ha demostrado que el E2 podría desencadenar

una forma de daño mitocondrial que conduce a la senescencia y autofagia mediante la inducción de Beclina 1 y LC3 en células de carcinoma mamario(191).

La influencia del estatus hormonal sobre la autofagia ha sido demostrada no sólo en relación a los estrógenos. Wen y col. (192), describieron en un estudio de ratones con hiperinsulinemia, que los hepatocitos de estos animales expresaban niveles de Beclina 1 y LC3 disminuidos respecto al grupo C y atribuyeron esta inhibición de la autofagia a la insulina elevada (192) (193). Por el contrario en ratones con deficiencia de esta hormona pancreática, Sarparanta y col. (194), demostraron que la expresión de Beclina 1, LC3 y Atg5 se encontraba significativamente elevada en los hepatocitos cultivados (195). La explicación a este fenómeno es que los niveles elevados de glucosa generan estrés oxidativo en las células hepáticas de los roedores, activando el flujo autofágico a partir de la inhibición del mTOR (195) (196).

Se señala que en todas nuestras investigaciones se utilizó un modelo *in vivo*. Si bien se podrían haber realizado cultivos celulares poniendo a prueba la activación del proceso utilizando inhibidores del flujo autofágico, es necesario considerar que, en los modelos *in vitro*, el tejido pierde su estructura tridimensional y fundamentalmente las regulaciones hipotalámicas, como así también las interacciones con los órganos blanco, por lo cual las extrapolaciones son dificultosas y muchas veces los resultados se alejan del modelo *in vivo*.

A partir de los hallazgos morfológicos y moleculares descriptos en el modelo de prolactinoma experimental inducido por estrógenos, surgió el siguiente interrogante: ¿La macroautofagia se asocia a la expresión incrementada de las moléculas reguladoras del ciclo celular p53 y p21?

Un hallazgo estadístico significativo fue el de Beclina 1 con relación a p53 y p21. Esta asociación directa también fue descripta por Mrakovcic y Fröhlich (197), quienes reportaron que p53 nuclear actúa a nivel transcripcional, regulando diferentes genes que inhiben a mTOR (principal bloqueador del proceso) activando de esta manera el complejo iniciador de la autofagia donde participa Beclina 1. Estos autores también expresaron que, cuando p53 se localiza en citoplasma, ejerce funciones inhibitorias del proceso al favorecer la activación de mTOR por diferentes vías. En contrapartida, White E. (109), publicó que la autofagia puede suprimir a p53 ya que

disminuye el estrés oxidativo al eliminar la producción de ROS, proporcionando sustratos metabólicos necesarios para la defensa antioxidante (109). En nuestro modelo experimental, LC3 que demostró concentraciones mayores a los 30d BE, evidenció una tendencia inversamente proporcional a p53, aunque sin alcanzar significación estadística. Ya fue expresado que p21 activa la detención del ciclo celular favoreciendo el control de la proliferación. En nuestro análisis, tanto Beclina 1 como LC3, demostraron una correlación directa y significativa con p21. Por lo tanto, teniendo en cuenta nuestros resultados experimentales, podemos inferir que, la asociación entre autofagia y la regulación del ciclo celular sí existe, pero depende de la etapa del proceso, es decir, en las fases iniciales del mecanismo, esta asociación se justifica por la interacción directa entre Beclina 1 y p53 mientras que en las fases más avanzadas, p21 mediante su relación directa con LC3 sería la responsable de controlar la proliferación celular y esta acción sería independientemente de p53.

Hasta aquí, se discutieron los resultados obtenidos en el modelo de prolactinoma experimental en referencia a algunos mecanismos que participan en la generación de procesos proliferativos hipofisarios y su relación con la macroautofagia. Sin embargo, la puesta en marcha de este proceso en adenomas funcionantes humanos y su asociación a parámetros clínico-patológicos no ha sido abordado hasta el presente.

En nuestra cohorte, el 64% de las pacientes fueron mujeres y la edad media de la población fue 39 años (rango entre 20-64 años). Estos datos demográficos son equivalentes a los de estudios epidemiológicos descritos por Afflorei y col. (125), quienes sostienen que estos tumores han demostrado una prevalencia mayor en los últimos años debido al incremento y mejor definición de las pruebas diagnósticas, con mayor incidencia de los adenomas en el grupo etario de 40 a 60 años (125). Para los casos de pacientes con PitNETs funcionantes, la edad de diagnóstico suele ser más temprana que en los pacientes con PitNETs no funcionantes, y ello podría deberse a la aparición de la sintomatología propia de cada subtipo tumoral que conlleva a la consulta precozmente (198). En relación con el sexo predominante observado en nuestra población, la mayoría de las publicaciones, establecen en coincidencia con nosotros, un mayor porcentaje para el grupo femenino y en este sentido se puede plantear que la diferencia podría ser debida a sesgos dependientes de la mayor

propensión de las mujeres a consultar tempranamente (199) (125). Sin embargo, estas variaciones en la distribución por edad y sexo dependen del tipo tumoral como así también a las diferencias planteadas según cada estudio poblacional (198). Dentro del grupo de neoplasias analizadas en la presente Tesis de Doctorado, la inmunohistoquímica evidenció que el 37% fueron adenomas de células corticotropas, el 33% de células somatotropas/mamosomatotropas y el 30% de células lactotropas. Mindermann y Wilson (200) analizaron la frecuencia de los adenomas de acuerdo con el grupo etario y los resultados fueron: durante la primera década de la vida, mayor prevalencia para los adenomas secretantes de ACTH; entre las segunda y cuarta décadas, los adenomas lactotropos; y luego de la quinta década de vida, mayor predominio para los adenomas no funcionantes (ANF) (200). Agustsson y col. (198) en su serie de 471 pacientes, identificaron los ANF como el subtipo tumoral más prevalente (43%), seguido por el adenoma lactotrofo (39,9%). Para Fernández y col. (201), en su estudio de 63 pacientes, los resultados mostraron hallazgos similares: los prolactinomas representaron el 57% de los casos, los ANF el 28%, y el resto de adenomas en menor frecuencia de presentación. En el estudio de Clayton (202), los adenomas lactotropos representaron entre el 31,6% y 35,7% de los tumores y los ANF entre el 32,1% y 36,8%, siendo los subtipos más frecuentes. En estudios poblacionales locales, Cecenarro y col. (199) reportaron, en un análisis retrospectivo y descriptivo llevado a cabo en la ciudad de Córdoba con un total de 102 pacientes, una frecuencia del 28% para los adenomas lactotropos, 11.8% de adenomas somatotropos y un 6.2% de adenomas corticotropos. Tal como se discute en este estudio (199), la discrepancia entre las diversas publicaciones sobre la incidencia de algún tipo de adenoma hipofisario, podría deberse a que el reclutamiento de los pacientes en el presente trabajo de Tesis, procedió de instituciones que son centro de derivación neuroquirúrgica y a la experticia del neurocirujano en el tratamiento específico de una variedad de lesión proliferativa versus otra.

Otro aspecto de importancia clínica en estos pacientes es la evaluación del tamaño tumoral de los adenomas. Durante muchos años se utilizó este dato clínico como uno de los parámetros de clasificación fundamental para decidir la conducta terapéutica (203). Del total de casos analizados en la presente investigación, el mayor porcentaje

(58%) fueron macroadenomas. Este hallazgo, a partir de los datos demográficos disponibles, es coincidente con lo reportado en la literatura médica, donde se ha puntualizado que los PitNETs funcionantes, usualmente son macroadenomas, con excepción de los corticotropinomas (204).

En nuestro grupo de pacientes también se evaluó la expresión de Ki-67, siendo la media del índice de 2,68 (DE: 0,39). El 73% de los adenomas revelaron un Ki-67  $\leq 3\%$  y, al correlacionarlo con el tamaño tumoral, no se encontraron diferencias estadísticamente positivas ( $p > 0,05$ ). Durante mucho tiempo se reconoció a la positividad de Ki-67 mayor al 3%, como factor pronóstico del comportamiento agresivo de los tumores hipofisarios humanos (205). Sin embargo, publicaciones recientes, demostraron datos contradictorios respecto al punto de corte de dicho porcentaje asociado a peor evolución (206) (207). En sintonía con los hallazgos de esta Tesis, Grimm y col. (208) han demostrado que el carácter invasivo de los adenomas hipofisarios no se correlaciona con un aumento del índice de Ki-67, concluyendo que los parámetros de proliferación son independientes del tamaño del tumor en la presentación inicial, siendo sólo importante la expresión elevada de este marcador en tumores recurrentes. Estudios recientes sobre el valor real de este factor predictivo en adenomas hipofisarios humanos, expresan que su utilidad en forma aislada es controvertida, y se sugiere asociarlo con otros parámetros histológicos para asegurar la actividad proliferativa del tejido (209) (210). Por muchos años se utilizó el análisis de Ki-67 y p53 como marcadores de proliferación y progresión celular en la adenohipófisis (211). Actualmente, la OMS en su última clasificación de PitNETs, desestimó el uso de estos inmunomarcadores como factores pronósticos de comportamiento agresivo debido a la existencia de resultados muy variables en la bibliografía respecto al punto de corte considerado como parámetro de peor evolución (129). Estos datos de relevancia clínica abren paso a la búsqueda nuevos marcadores en estas neoplasias que pudieran ser blancos involucrados en la patogenia y/o terapéutica médica.

Al igual que en el modelo experimental, la MET fue la herramienta cardinal para el análisis de evidencias ultraestructurales de macroautofagia en el grupo de adenomas hipofisarios humanos funcionantes analizados. Del total de tumores

evaluados (n:33), 20 de ellos evidenciaron características morfológicas compatibles con el proceso autofágico. El rasgo más relevante y mejor documentado fue la presencia de numerosas vesículas citoplasmáticas limitadas por doble membrana con material amorfo electrodensito, gránulos de secreción y mitocondrias en su interior en distintos estadios de degradación. Estas formaciones membranosas fueron sorprendentemente similares a las observadas en el modelo de prolactinoma experimental anteriormente descrito. Hallazgos equivalentes, fueron publicados por Nixon y col. (212), a partir del estudio por MET de biopsias de tejido cerebral provenientes de pacientes con Enfermedad de Alzheimer. Estos autores describieron la presencia de vacuolas compatibles con autofagosomas, los cuales se identificaron por sus características morfológicas clásicas (tamaño superior a 0,5  $\mu$ m, delimitados por doble membrana y contenido intraluminal heterogéneo, que incluía organelas intactas como así también componentes del citoplasma parcialmente degradados), y posteriormente, para confirmar los datos morfológicos, midieron los niveles de LC3-II tisular (212). Como se dijo anteriormente, la macroautofagia está presente en múltiples estados, tanto fisiológicos como patológicos de diferentes órganos. Kostin y col. (213) describieron características ultraestructurales de miocitos en pacientes con miocardiopatía dilatada idiopática y demostraron la presencia de vacuolas autofágicas con material proteico citoplasmático y nuclear en su interior totalmente desintegrados (213). En lo que refiere al proceso autofágico de la glándula hipófisis, tal como se indicó al principio de este capítulo, los reportes bibliográficos son escasos y no concluyentes, y la mayoría de ellos hacen referencia a una variante del mecanismo conocido como crinofagia. Kovacs y col. (134), observaron mediante MET que los gránulos secretorios se degradaban por autofagia para formar gránulos con pigmento, en prolactinomas y más tarde también estos hallazgos fueron descritos en células de un adenoma corticotropo silente (134). Por su parte, Mashiter y col (214), informaron el caso de un paciente con diagnóstico de macroadenoma hipofisario con rasgos clínicos de acromegalia, pero con niveles séricos de GH normales. Estos autores, luego del análisis por MET y el hallazgo de gránulos secretorios englobados en vesículas membranosas, atribuyeron a la crinofagia como responsable de la degradación de los gránulos con hormona de crecimiento. De esta manera, los resultados ultraestructurales



observados en los adenomas funcionantes humanos incluidos en este trabajo (neoplasias de células lactotropas, somatotropas densamente granuladas, somatotropas escasamente granuladas y corticotropas), acrecentarían la evidencia sobre los mecanismos de macroautofagia en hipófisis, sumando datos certeros a la bibliografía actualmente existente.

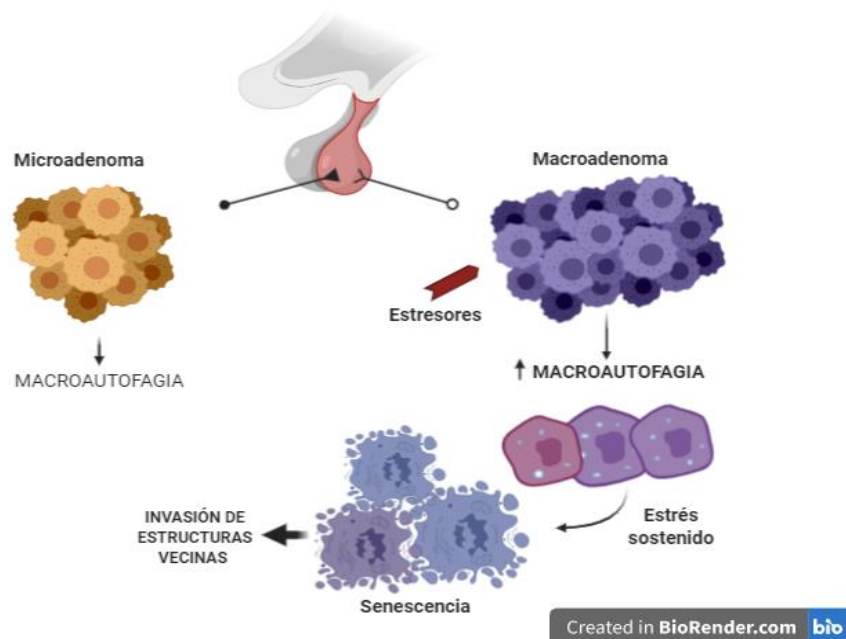
Entendiendo que la autofagia es un proceso dinámico que se desarrolla en múltiples pasos consecutivos, al igual que en modelo experimental, se consideró necesario complementar el análisis ultraestructural con la inmunodetección y la semicuantificación de las moléculas marcadoras del mecanismo: Beclina 1 y LC3. Ambas proteínas presentaron una expresión citoplasmática difusa, tanto en elementos celulares aislados como en conglomerados, en el 60% de los tumores funcionantes analizados. El análisis mediante la técnica de WB, en un grupo adenomas de células somatotropas (n:7) versus glándulas normales (n:7), demostró que tanto Beclina 1 como LC3 presentaron mayor expresión en el grupo tumoral versus el grupo de hipófisis control, sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. En la búsqueda de reportes bibliográficos concordantes con estos resultados, se encontró que la evidencia actualmente disponible, relaciona la macroautofagia con la respuesta a diferentes tratamientos farmacológicos en los pacientes con estos tumores. Para abordar este tópico, nos remitimos a los hallazgos de Geng y col. (215) quienes demostraron una expresión de LC3 significativamente superior en adenomas hipofisarios secretores de PRL en un grupo pacientes tratados exclusivamente con BRC versus pacientes sin tratamiento, concluyendo que la BRC podría inducir el proceso autofágico. Otro agonista dopaminérgico muy utilizado en el tratamiento médico del prolactinoma es la CAB. Lin y col. (216), demostraron que, este fármaco indujo la conversión de LC3-I a LC3-II en células de tumores hipofisarios de rata MMQ y GH3 en las primeras etapas del tratamiento. Así también, mediante MET, revelaron un mayor número de autofagosomas y autolisosomas en las células de cultivo tratadas con CAB en comparación con las células del grupo control. En el mismo estudio se demostró que en fases más tardías del tratamiento, este agonista dopaminérgico inhibió el flujo autofágico al reducir el valor de pH de los lisosomas, produciendo acumulación de la proteína p62 y los autofagosomas no fusionados en las

células tumorales. En conjunto, estas observaciones concluyen que, CAB primero desencadena la autofagia pero luego interrumpe progresivamente el flujo autofágico. Contrariamente a los resultados mostrados por Lin y col. (216), en el total de prolactinomas analizados en esta Tesis Doctoral, el 50% mostró inmunopositividad para las proteínas Beclina 1 y LC3, pero de estos tumores positivos, sólo dos habían sido tratados previamente con CAB. Si bien se trata de un número poblacional muy reducido, las conclusiones planteadas en el mencionado trabajo (216), nos motivan a estudiar los efectos de CAB y su relación con autofagia en otros subtipos de adenomas hipofisarios en futuras investigaciones. Siguiendo los reportes bibliográficos que relacionan el tratamiento farmacológico de los adenomas y la macroautofagia, se menciona un estudio retrospectivo donde Dagistanli y col. (140) demostraron sobre muestras de adenomas secretores de GH la expresión aumentada de Atg5 y la disminución de Beclina 1 y Ki-67 en 11 pacientes tratados con SRL (análogos de somatostatina) versus 9 pacientes sin tratamiento, concluyendo que estos fármacos podrían inducir la autofagia y reducir la proliferación celular. En nuestro grupo poblacional, sobre un total de 11 neoplasias de células somatotropas analizados por IHQ, el 72% (n:8) fueron inmunopositivas para Beclina 1 y LC3, y por la técnica de WB se semicuantificaron estas proteínas en 7 tumores secretores de GH y 7 hipófisis normales. Si bien la expresión de las moléculas marcadoras de macroautofagia fue mayor en el grupo de PitNETs versus el grupo control, la diferencia no fue estadísticamente significativamente ( $p > 0.05$ ). El 90% de nuestros pacientes con tumores de células somatotropas no recibieron tratamiento médico previo a la cirugía. Si bien este número de pacientes libre de fármacos pre-cirugía es reducido, contrariamente a lo reportado por Dagistanli y col. (140), en nuestros hallazgos existe evidencia de actividad autofágica en estas neoplasias incluso sin tratamiento farmacológico previo.

Otro de los hallazgos más relevantes de nuestra investigación, es la asociación significativa entre el tamaño tumoral (macroadenoma) y la expresión de las moléculas Beclina 1 y LC3. El crecimiento y extensión de los adenomas hacia los senos cavernosos, estructuras óseas y/o seno esfenoidal, se considera un signo de invasividad (217). La tasa general de invasión de los senos cavernosos es del 35% y de la

duramadre alrededor del 64 al 85% de los casos, siendo los macroadenomas los que invaden con más frecuencia (218). Estas características de invasividad son determinadas a partir de hallazgos radiológicos y/o quirúrgicos, pero no siempre significa que el tumor sea más agresivo. El término “agresividad”, está asociado al comportamiento clínico, y son generalmente aquellas lesiones más resistentes a los tratamientos y con una tasa de recurrencia mayor (219). Asimismo, la OMS en su última clasificación, definió algunas variantes histopatológicas como adenomas más propensos al comportamiento agresivo (129). Sin embargo, a pesar de la existencia de múltiples estudios patológicos, ultraestructurales y moleculares, la relación entre invasividad, agresividad y el tipo de tumor aún no se ha resuelto (219). Con respecto al crecimiento e invasión de las neoplasias, las fuentes bibliográficas concluyen que la autofagia muestra comportamientos diferentes según el tipo y estadio tumoral (220). En un modelo animal de cáncer de pulmón inducido por activación de la vía Ras, la inhibición de la autofagia condujo a la tumorigénesis inicialmente, pero con disminución y control del crecimiento del tumor en las etapas tardías (107). No obstante, esta reducción tumoral no se observó en otro modelo experimental de cáncer hepático inducido por la delección de Atg5 y Atg7, donde, por el contrario, la supresión de la autofagia produjo una hiperplasia significativa de los hepatocitos con crecimiento y diseminación de los tumores en todo el hígado de los murinos (221). Si bien los resultados mencionados provienen de modelos animales, surge la necesidad de detectar biomarcadores potenciales en humanos que puedan ser utilizados para identificar lesiones invasivas/agresivas con la finalidad de alcanzar el tratamiento adecuado. En nuestros resultados, la expresión significativa de marcadores de autofagia en macroadenomas humanos, abre una nueva posibilidad sobre mecanismos de control del crecimiento tumoral. Si bien el n muestral del presente trabajo de Tesis Doctoral es acotado y no se pueden proyectar estos hallazgos al total de adenomas funcionantes, encontramos evidencia significativa, tanto a nivel morfológico como molecular, de que existe activación de la autofagia en los adenomas, con mayor expresión en los macroadenomas versus microadenomas. Estos hallazgos obtenidos desde la investigación clínica se podrían vincular con los resultados evidenciados en nuestro modelo de prolactinoma experimental en donde la asociación estadística de las

moléculas marcadoras de autofagia y p21 en el estado adenomatoso glandular, actuarían como freno a la posible capacidad proliferativa/invasiva celular que caracteriza a este modelo tumoral. Finalmente, es relevante mencionar la posible vinculación de la macroautofagia a otro proceso de regulación celular ya conocido y comprobado en la glándula hipófisis de modelos experimentales y humanos: la senescencia. Según la evidencia bibliográfica disponible (171) y los recientes resultados descritos en esta Tesis, ambos mecanismos, se pondrían en marcha ante la presencia de ciertos estresores y actuarían frenando la capacidad invasiva de los adenomas hipofisarios (**Figura 1**).



**Figura 1:** Representación gráfica de la activación de los mecanismos de macroautofagia y senescencia ante estímulos estresores, para frenar la capacidad invasiva celular en macroadenomas hipofisarios. Propia autoría. Diseño realizado en BioRender.com.

## CONCLUSIONES

Tal como se hipotetizó, la macroautofagia en lesiones proliferativas adenohipofisarias, es un mecanismo celular y molecular involucrado en el desarrollo y crecimiento tumoral. Esta conclusión general se sustenta en lo que pudimos inferir de los hallazgos observados en un modelo de prolactinoma experimental y en un grupo de adenomas pituitarios humanos funcionantes.

### *Modelo de investigación básica:*

- ✓ La estimulación estrogénica generó un *modelo hiperplásico/adenomatoso* con un pico de proliferación a los 20 días de acción hormonal.
- ✓ A nivel ultraestructural se evidenciaron formaciones vesiculares con contenido citoplasmático compatibles con autofagosomas.
- ✓ Las evidencias morfológicas se vincularon con cambios en la expresión de Beclina 1 y LC3. Estas moléculas presentaron diferentes picos de expresión, lo que conduce a hipotetizar la puesta en marcha del mecanismo macroautofágico:
  - Beclina 1 demostró su máximo nivel de expresión a los 20 días de estimulación con BE etapa correspondiente al estadio hiperplásico-adenomatoso.
  - LC3 demostró un incremento de su expresión a partir de los 20 días de estimulación con BE, alcanzando los máximos niveles a los 30 días (estadio adenomatoso glandular).
- ✓ Se demostró asociación entre las moléculas reguladoras del ciclo celular y las marcadoras del proceso autofágico, variando de acuerdo con la etapa del mismo:
  - p53 participaría en la regulación de la macroautofagia a través de la asociación con Beclina 1 en las etapas iniciales, mientras que, en las fases avanzadas del mecanismo, p21 sería la responsable de controlar la proliferación celular mediante su relación directa con LC3.

*Modelo de investigación aplicada:*

- ✓ El 60% de los adenomas hipofisarios funcionantes humanos presentaron evidencias morfológicas ultraestructurales y moleculares (Beclina 1 y LC3) del mecanismo macroautofágico.
- ✓ Se demostró una asociación significativa entre el tamaño tumoral (macroadenoma) y la expresión de las moléculas Beclina 1 y LC3, planteando a la autofagia como un posible mecanismo de control del crecimiento tumoral adenohipofisario.
- ✓ En el grupo de adenomas hipofisarios funcionantes analizados no se evidenció asociación entre los marcadores moleculares de autofagia y el índice de proliferación celular.
- ✓ En nuestra cohorte de pacientes no se observó relación estadísticamente significativa entre tamaño tumoral y marcadores de proliferación celular (Ki-67).

*“Los hallazgos obtenidos desde la investigación clínica, sumados a los resultados evidenciados en el modelo de prolactinoma experimental, conducen a interpretar a la macroautofagia como un mecanismo presente en las lesiones proliferativas hipofisarias. Su participación en el control del crecimiento tumoral la convierten en un proceso de gran interés para la investigación endocrinológica y como un posible blanco terapéutico a través de la manipulación (activación y/o inhibición) del mismo”.*

## BIBLIOGRAFÍA

1. Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol.* 2010 Sep;12(9):814-22. doi: 10.1038/ncb0910-814. PMID: 20811353; PMCID: PMC3616322.
2. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell.* 2010 Feb 5;140(3):313-26. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.028. PMID: 20144757; PMCID: PMC2852113.
3. Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med.* 2013 May 9;368(19):1845-6. doi: 10.1056/NEJMc1303158. PMID: 23656658.
4. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 2008 Jan 11;132(1):27-42. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.018. PMID: 18191218; PMCID: PMC2696814.
5. Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Bravo-San Pedro JM, Cecconi F, Choi AM, Chu CT, Codogno P, Colombo MI, Cuervo AM, Debnath J, Deretic V, Dikic I, Eskelinen EL, Fimia GM, Fulda S, Gewirtz DA, Green DR, Hansen M, Harper JW, Jäättelä M, Johansen T, Juhasz G, Kimmelman AC, Kraft C, Ktistakis NT, Kumar S, Levine B, Lopez-Otin C, Madeo F, Martens S, Martinez J, Melendez A, Mizushima N, Münz C, Murphy LO, Penninger JM, Piacentini M, Reggiori F, Rubinsztein DC, Ryan KM, Santambrogio L, Scorrano L, Simon AK, Simon HU, Simonsen A, Tavernarakis N, Tooze SA, Yoshimori T, Yuan J, Yue Z, Zhong Q, Kroemer G. Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J.* 2017 Jul 3;36(13):1811-1836. doi: 10.15252/emboj.201796697. Epub 2017 Jun 8. PMID: 28596378; PMCID: PMC5494474.
6. Münz C. The Macroautophagy Machinery in Endo- and Exocytosis. *J Mol Biol.* 2017 Feb 17;429(4):473-485. doi: 10.1016/j.jmb.2016.11.028. Epub 2016 Dec 6. PMID: 27932293.
7. Foot N, Henshall T, Kumar S. Ubiquitination and the Regulation of Membrane Proteins. *Physiol Rev.* 2017 Jan;97(1):253-281. doi: 10.1152/physrev.00012.2016. PMID: 27932395.

8. Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 2010 Apr;22(2):124-31. doi: 10.1016/j.ceb.2009.11.014. Epub 2009 Dec 23. PMID: 20034776; PMCID: PMC2854249.
9. Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal.* 2014 Jan 20;20(3):460-73. doi: 10.1089/ars.2013.5371. Epub 2013 Aug 2. PMID: 23725295; PMCID: PMC3894687.
10. Farré JC, Subramani S. Mechanistic insights into selective autophagy pathways: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016 Sep;17(9):537-52. doi: 10.1038/nrm.2016.74. Epub 2016 Jul 6. PMID: 27381245; PMCID: PMC5549613.
11. Uttenweiler A, Mayer A. Microautophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol.* 2008;445:245-59. doi: 10.1007/978-1-59745-157-4\_16. PMID: 18425455.
12. Li WW, Li J, Bao JK. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci.* 2012 Apr;69(7):1125-36. doi: 10.1007/s00018-011-0865-5. Epub 2011 Nov 12. PMID: 22080117.
13. Kaushik S, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol.* 2012 Aug;22(8):407-17. doi: 10.1016/j.tcb.2012.05.006. Epub 2012 Jun 27. PMID: 22748206; PMCID: PMC3408550.
14. Dice JF. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem Sci.* 1990 Aug;15(8):305-9. doi: 10.1016/0968-0004(90)90019-8. PMID: 2204156.
15. Schneider JL, Suh Y, Cuervo AM. Deficient chaperone-mediated autophagy in liver leads to metabolic dysregulation. *Cell Metab.* 2014 Sep 2;20(3):417-32. doi: 10.1016/j.cmet.2014.06.009. Epub 2014 Jul 17. PMID: 25043815; PMCID: PMC4156578.
16. Kaushik S, Cuervo AM. Degradation of lipid droplet-associated proteins by chaperone-mediated autophagy facilitates lipolysis. *Nat Cell Biol.* 2015



- Jun;17(6):759-70. doi: 10.1038/ncb3166. Epub 2015 May 11. PMID: 25961502; PMCID: PMC4449813.
17. Park C, Suh Y, Cuervo AM. Regulated degradation of Chk1 by chaperone-mediated autophagy in response to DNA damage. *Nat Commun.* 2015 Apr 16;6:6823. doi: 10.1038/ncomms7823. PMID: 25880015; PMCID: PMC4400843.
  18. Cuervo AM, Dice JF. Age-related decline in chaperone-mediated autophagy. *J Biol Chem.* 2000 Oct 6;275(40):31505-13. doi: 10.1074/jbc.M002102200. PMID: 10806201.
  19. Rodríguez-Muela N, Koga H, García-Ledo L, de la Villa P, de la Rosa EJ, Cuervo AM, Boya P. Balance between autophagic pathways preserves retinal homeostasis. *Aging Cell.* 2013 Jun;12(3):478-88. doi: 10.1111/accel.12072. Epub 2013 Apr 19. PMID: 23521856; PMCID: PMC3655122.
  20. Schneider JL, Villarroya J, Diaz-Carretero A, Patel B, Urbanska AM, Thi MM, Villarroya F, Santambrogio L, Cuervo AM. Loss of hepatic chaperone-mediated autophagy accelerates proteostasis failure in aging. *Aging Cell.* 2015 Apr;14(2):249-64. doi: 10.1111/accel.12310. Epub 2015 Jan 23. PMID: 25620427; PMCID: PMC4364837.
  21. Valdor R, Mocholi E, Botbol Y, Guerrero-Ros I, Chandra D, Koga H, Gravekamp C, Cuervo AM, Macian F. Chaperone-mediated autophagy regulates T cell responses through targeted degradation of negative regulators of T cell activation. *Nat Immunol.* 2014 Nov;15(11):1046-54. doi: 10.1038/ni.3003. Epub 2014 Sep 28. PMID: 25263126; PMCID: PMC4208273.
  22. Orenstein SJ, Kuo SH, Tasset I, Arias E, Koga H, Fernandez-Carasa I, Cortes E, Honig LS, Dauer W, Consiglio A, Raya A, Sulzer D, Cuervo AM. Interplay of LRRK2 with chaperone-mediated autophagy. *Nat Neurosci.* 2013 Apr;16(4):394-406. doi: 10.1038/nn.3350. Epub 2013 Mar 3. PMID: 23455607; PMCID: PMC3609872.
  23. Kon M, Kiffin R, Koga H, Chapochnik J, Macian F, Varticovski L, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy is required for tumor growth. *Sci Transl Med.* 2011 Nov 16;3(109):109ra117. doi: 10.1126/scitranslmed.3003182. PMID: 22089453; PMCID: PMC4000261.

24. Yang Z, Klionsky DJ. An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2009;335:1-32. doi: 10.1007/978-3-642-00302-8\_1. PMID: 19802558; PMCID: PMC2832191.
25. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev*. 2007 Nov 15;21(22):2861-73. doi: 10.1101/gad.1599207. PMID: 18006683.
26. He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet*. 2009;43:67-93. doi: 10.1146/annurev-genet-102808-114910. PMID: 19653858; PMCID: PMC2831538.
27. Ravikumar B, Moreau K, Jahreiss L, Puri C, Rubinsztein DC. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat Cell Biol*. 2010 Aug;12(8):747-57. doi: 10.1038/ncb2078. Epub 2010 Jul 18. Erratum in: *Nat Cell Biol*. 2010 Oct;12(10):1021. PMID: 20639872; PMCID: PMC2923063.
28. Ravikumar B, Moreau K, Rubinsztein DC. Plasma membrane helps autophagosomes grow. *Autophagy*. 2010 Nov;6(8):1184-6. doi: 10.4161/auto.6.8.13428. Epub 2010 Nov 16. PMID: 20861674; PMCID: PMC3039720.
29. Zhao YG, Zhang H. Autophagosome maturation: An epic journey from the ER to lysosomes. *J Cell Biol*. 2019 Mar 4;218(3):757-770. doi: 10.1083/jcb.201810099. Epub 2018 Dec 21. PMID: 30578282; PMCID: PMC6400552.
30. Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T, Yamamoto A. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol*. 2009 Dec;11(12):1433-7. doi: 10.1038/ncb1991. Epub 2009 Nov 8. PMID: 19898463.
31. Takahashi Y, Meyerkord CL, Hori T, Runkle K, Fox TE, Kester M, Loughran TP, Wang HG. Bif-1 regulates Atg9 trafficking by mediating the fission of Golgi membranes during autophagy. *Autophagy*. 2011 Jan;7(1):61-73. doi: 10.4161/auto.7.1.14015. Epub 2011 Jan 1. PMID: 21068542; PMCID: PMC3039731.
32. Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, Mitra K, Sougrat R, Kim PK, Lippincott-Schwartz J. Mitochondria supply membranes for autophagosome

- biogenesis during starvation. *Cell*. 2010 May 14;141(4):656-67. doi: 10.1016/j.cell.2010.04.009. PMID: 20478256; PMCID: PMC3059894.
33. Badadani M. Autophagy Mechanism, Regulation, Functions, and Disorders., ISRN Cell Biology. 2012, 1-11. doi.org/10.5402/2012/927064
34. Wirawan E, Lippens S, Vanden Berghe T, Romagnoli A, Fimia GM, Piacentini M, Vandenabeele P. Beclin1: a role in membrane dynamics and beyond. *Autophagy*. 2012 Jan;8(1):6-17. doi: 10.4161/auto.8.1.16645. Epub 2012 Jan 1. PMID: 22170155.
35. McKnight NC, Zhong Y, Wold MS, Gong S, Phillips GR, Dou Z, Zhao Y, Heintz N, Zong WX, Yue Z. Beclin 1 is required for neuron viability and regulates endosome pathways via the UVRAG-VPS34 complex. *PLoS Genet*. 2014 Oct 2;10(10):e1004626. doi: 10.1371/journal.pgen.1004626. PMID: 25275521; PMCID: PMC4183436.
36. Rohatgi RA, Shaw LM. An autophagy-independent function for Beclin 1 in cancer. *Mol Cell Oncol*. 2016 Jan 2;3(1):e1030539. doi: 10.1080/23723556.2015.1030539. Epub 2015 Apr 14. PMID: 26998512; PMCID: PMC4792009.
37. Kaur J, Debnath J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015 Aug;16(8):461-72. doi: 10.1038/nrm4024. Epub 2015 Jul 15. PMID: 26177004.
38. Barth S, Glick D, Macleod KF. Autophagy: assays and artifacts. *J Pathol*. 2010 Jun;221(2):117-24. doi: 10.1002/path.2694. PMID: 20225337; PMCID: PMC2989884.
39. Huang R, Xu Y, Wan W, Shou X, Qian J, You Z, Liu B, Chang C, Zhou T, Lippincott-Schwartz J, Liu W. Deacetylation of nuclear LC3 drives autophagy initiation under starvation. *Mol Cell*. 2015 Feb 5;57(3):456-66. doi: 10.1016/j.molcel.2014.12.013. Epub 2015 Jan 15. PMID: 25601754.
40. Mizushima N, Klionsky DJ. Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu Rev Nutr*. 2007;27:19-40. doi: 10.1146/annurev.nutr.27.061406.093749. PMID: 17311494.

41. Devenish RJ, Klionsky DJ. Autophagy: mechanism and physiological relevance 'brewed' from yeast studies. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2012 Jun 1;4:1354-63. doi: 10.2741/s337. PMID: 22652877; PMCID: PMC3615647.
42. Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ*. 2005 Nov;12 Suppl 2(Suppl 2):1542-52. doi: 10.1038/sj.cdd.4401765. PMID: 16247502; PMCID: PMC1828868.
43. He C, Klionsky DJ. Analyzing autophagy in zebrafish. *Autophagy*. 2010 Jul;6(5):642-4. doi: 10.4161/auto.6.5.12092. Epub 2010 Jul 1. PMID: 20495344; PMCID: PMC3654832.
44. Tooze J, Hollinshead M, Ludwig T, Howell K, Hoflack B, Kern H. In exocrine pancreas, the basolateral endocytic pathway converges with the autophagic pathway immediately after the early endosome. *J Cell Biol*. 1990 Aug;111(2):329-45. doi: 10.1083/jcb.111.2.329. PMID: 2166050; PMCID: PMC2116176.
45. Stephan JS, Yeh YY, Ramachandran V, Deminoff SJ, Herman PK. The Tor and cAMP-dependent protein kinase signaling pathways coordinately control autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy*. 2010 Feb;6(2):294-5. doi: 10.4161/auto.6.2.11129. Epub 2010 Feb 6. PMID: 20087062.
46. Cherra SJ 3rd, Kulich SM, Uechi G, Balasubramani M, Mountzouris J, Day BW, Chu CT. Regulation of the autophagy protein LC3 by phosphorylation. *J Cell Biol*. 2010 Aug 23;190(4):533-9. doi: 10.1083/jcb.201002108. Epub 2010 Aug 16. PMID: 20713600; PMCID: PMC2928022.
47. Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, Neufeld TP, Guan KL. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat Cell Biol*. 2008 Aug;10(8):935-45. doi: 10.1038/ncb1753. Epub 2008 Jul 6. PMID: 18604198; PMCID: PMC2711503.
48. Blancquaert S, Wang L, Paternot S, Coulonval K, Dumont JE, Harris TE, Roger PP. cAMP-dependent activation of mammalian target of rapamycin (mTOR) in thyroid cells. Implication in mitogenesis and activation of CDK4. *Mol Endocrinol*. 2010 Jul;24(7):1453-68. doi: 10.1210/me.2010-0087. Epub 2010 May 19. PMID: 20484410; PMCID: PMC2903905.
49. Djouder N, Tuerk RD, Suter M, Salvioni P, Thali RF, Scholz R, Vaahtomeri K, Auchli Y, Rechsteiner H, Brunisholz RA, Viollet B, Mäkelä TP, Wallimann T,

- Neumann D, Krek W. PKA phosphorylates and inactivates AMPK $\alpha$  to promote efficient lipolysis. *EMBO J*. 2010 Jan 20;29(2):469-81. doi: 10.1038/emboj.2009.339. Epub 2009 Nov 26. PMID: 19942859; PMCID: PMC2824464.
50. Alers S, Löffler AS, Wesselborg S, Stork B. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol*. 2012 Jan;32(1):2-11. doi: 10.1128/MCB.06159-11. Epub 2011 Oct 24. PMID: 22025673; PMCID: PMC3255710.
51. Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*. 2003 Nov 26;115(5):577-90. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00929-2. PMID: 14651849.
52. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*. 2011 Feb;13(2):132-41. doi: 10.1038/ncb2152. Epub 2011 Jan 23. PMID: 21258367; PMCID: PMC3987946.
53. Lee JW, Park S, Takahashi Y, Wang HG. The association of AMPK with ULK1 regulates autophagy. *PLoS One*. 2010 Nov 3;5(11):e15394. doi: 10.1371/journal.pone.0015394. PMID: 21072212; PMCID: PMC2972217.
54. Shang L, Chen S, Du F, Li S, Zhao L, Wang X. Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 22;108(12):4788-93. doi: 10.1073/pnas.1100844108. Epub 2011 Mar 7. PMID: 21383122; PMCID: PMC3064373.
55. Høyer-Hansen M, Bastholm L, Szyniarowski P, Campanella M, Szabadkai G, Farkas T, Bianchi K, Fehrenbacher N, Elling F, Rizzuto R, Mathiasen IS, Jäättelä M. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. *Mol Cell*. 2007 Jan 26;25(2):193-205. doi: 10.1016/j.molcel.2006.12.009. PMID: 17244528.
56. Ding WX, Ni HM, Gao W, Hou YF, Melan MA, Chen X, Stolz DB, Shao ZM, Yin XM. Differential effects of endoplasmic reticulum stress-induced autophagy on cell survival. *J Biol Chem*. 2007 Feb 16;282(7):4702-10. doi: 10.1074/jbc.M609267200. Epub 2006 Nov 29. PMID: 17135238.

57. Jia M, Dahlman-Wright K, Gustafsson JÅ. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2015 Aug;29(4):557-68. doi: 10.1016/j.beem.2015.04.008. Epub 2015 Apr 26. PMID: 26303083.
58. Park J, Shin H, Song H, Lim HJ. Autophagic regulation in steroid hormone-responsive systems. *Steroids.* 2016 Nov;115:177-181. doi: 10.1016/j.steroids.2016.09.011. Epub 2016 Sep 16. PMID: 27643453.
59. Totta P, Busonero C, Leone S, Marino M, Acconcia F. Dynamin II is required for 17 $\beta$ -estradiol signaling and autophagy-based ER $\alpha$  degradation. *Sci Rep.* 2016 Mar 24;6:23727. doi: 10.1038/srep23727. PMID: 27009360; PMCID: PMC4806323.
60. Lahm T, Petrache I. LC3 as a potential therapeutic target in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Autophagy.* 2012 Jul 1;8(7):1146-7. doi: 10.4161/auto.20520. Epub 2012 May 25. PMID: 22627195; PMCID: PMC3429553.
61. Lahm T, Albrecht M, Fisher AJ, Selej M, Patel NG, Brown JA, Justice MJ, Brown MB, Van Demark M, Trulock KM, Dieudonne D, Reddy JG, Presson RG, Petrache I. 17 $\beta$ -Estradiol attenuates hypoxic pulmonary hypertension via estrogen receptor-mediated effects. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012 May 1;185(9):965-80. doi: 10.1164/rccm.201107-1293OC. Epub 2012 Mar 1. PMID: 22383500; PMCID: PMC3359941.
62. Hsieh DJ, Kuo WW, Lai YP, Shibu MA, Shen CY, Pai P, Yeh YL, Lin JY, Viswanadha VP, Huang CY. 17 $\beta$ -Estradiol and/or Estrogen Receptor  $\beta$  Attenuate the Autophagic and Apoptotic Effects Induced by Prolonged Hypoxia Through HIF-1 $\alpha$ -Mediated BNIP3 and IGFBP-3 Signaling Blockage. *Cell Physiol Biochem.* 2015;36(1):274-84. doi: 10.1159/000374070. Epub 2015 May 4. PMID: 25967966.
63. Wang F, Xiao J, Shen Y, Yao F, Chen Y. Estrogen protects cardiomyocytes against lipopolysaccharide by inhibiting autophagy. *Mol Med Rep.* 2014 Sep;10(3):1509-12. doi: 10.3892/mmr.2014.2365. Epub 2014 Jul 7. PMID: 25017426.
64. Lin CW, Chen B, Huang KL, Dai YS, Teng HL. Inhibition of Autophagy by Estradiol Promotes Locomotor Recovery after Spinal Cord Injury in Rats. *Neurosci Bull.* 2016 Apr;32(2):137-44. doi: 10.1007/s12264-016-0017-x. Epub 2016 Feb 29. PMID: 26924807; PMCID: PMC5563739.

65. Yang Y, Zheng X, Li B, Jiang S, Jiang L. Increased activity of osteocyte autophagy in ovariectomized rats and its correlation with oxidative stress status and bone loss. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Aug 15;451(1):86-92. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.07.069. Epub 2014 Jul 22. PMID: 25063028.
66. Luo H, Liu M, Luo S, Yu T, Wu C, Yang G, Tu G. Dynamic monitoring of GPER-mediated estrogenic effects in breast cancer associated fibroblasts: An alternative role of estrogen in mammary carcinoma development. *Steroids.* 2016 Aug;112:1-11. doi: 10.1016/j.steroids.2016.03.013. Epub 2016 Mar 23. PMID: 27016131.
67. Orshal JM, Khalil RA. Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004 Feb;286(2):R233-49. doi: 10.1152/ajpregu.00338.2003. PMID: 14707008.
68. He H, Feng YS, Zang LH, Liu WW, Ding LQ, Chen LX, Kang N, Hayashi T, Tashiro S, Onodera S, Qiu F, Ikejima T. Nitric oxide induces apoptosis and autophagy; autophagy down-regulates NO synthesis in physalin A-treated A375-S2 human melanoma cells. *Food Chem Toxicol.* 2014 Sep;71:128-35. doi: 10.1016/j.fct.2014.06.007. Epub 2014 Jun 19. PMID: 24952311.
69. Solakidi S, Psarra AM, Sekeris CE. Differential subcellular distribution of estrogen receptor isoforms: localization of ERalpha in the nucleoli and ERbeta in the mitochondria of human osteosarcoma SaOS-2 and hepatocarcinoma HepG2 cell lines. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Sep 30;1745(3):382-92. doi: 10.1016/j.bbamcr.2005.05.010. PMID: 15993498.
70. Solakidi S, Psarra AM, Sekeris CE. Differential distribution of glucocorticoid and estrogen receptor isoforms: localization of GRbeta and ERalpha in nucleoli and GRalpha and ERbeta in the mitochondria of human osteosarcoma SaOS-2 and hepatocarcinoma HepG2 cell lines. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2007 Jul-Sep;7(3):240-5. PMID: 17947807.
71. Yang SH, Liu R, Perez EJ, Wen Y, Stevens SM Jr, Valencia T, Brun-Zinkernagel AM, Prokai L, Will Y, Dykens J, Koulen P, Simpkins JW. Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 23;101(12):4130-5. doi: 10.1073/pnas.0306948101. Epub 2004 Mar 15. PMID: 15024130; PMCID: PMC384706.

72. Chen JQ, Delannoy M, Cooke C, Yager JD. Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004 Jun;286(6):E1011-22. doi: 10.1152/ajpendo.00508.2003. Epub 2004 Jan 21. PMID: 14736707.
73. Chen JQ, Eshete M, Alworth WL, Yager JD. Binding of MCF-7 cell mitochondrial proteins and recombinant human estrogen receptors alpha and beta to human mitochondrial DNA estrogen response elements. *J Cell Biochem.* 2004 Oct 1;93(2):358-73. doi: 10.1002/jcb.20178. PMID: 15368362.
74. Chen JQ, Russo PA, Cooke C, Russo IH, Russo J. ERbeta shifts from mitochondria to nucleus during estrogen-induced neoplastic transformation of human breast epithelial cells and is involved in estrogen-induced synthesis of mitochondrial respiratory chain proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Dec;1773(12):1732-46. doi: 10.1016/j.bbamcr.2007.05.008. Epub 2007 May 29. PMID: 17604135.
75. Totta P, Pesiri V, Marino M, Acconcia F. Lysosomal function is involved in 17 $\beta$ -estradiol-induced estrogen receptor  $\alpha$  degradation and cell proliferation. *PLoS One.* 2014 Apr 15;9(4):e94880. doi: 10.1371/journal.pone.0094880. PMID: 24736371; PMCID: PMC3988130.
76. Cheng SB, Quinn JA, Graeber CT, Filardo EJ. Down-modulation of the G-protein-coupled estrogen receptor, GPER, from the cell surface occurs via a trans-Golgi-proteasome pathway. *J Biol Chem.* 2011 Jun 24;286(25):22441-55. doi: 10.1074/jbc.M111.224071. Epub 2011 May 2. PMID: 21540189; PMCID: PMC3121390.
77. Xiang J, Liu X, Ren J, Chen K, Wang HL, Miao YY, Qi MM. How does estrogen work on autophagy? *Autophagy.* 2019 Feb;15(2):197-211. doi: 10.1080/15548627.2018.1520549. Epub 2018 Sep 25. PMID: 30208759; PMCID: PMC6333457.
78. Kanamori H, Takemura G, Goto K, Maruyama R, Tsujimoto A, Ogino A, Takeyama T, Kawaguchi T, Watanabe T, Fujiwara T, Fujiwara H, Seishima M, Minatoguchi S. The role of autophagy emerging in postinfarction cardiac remodelling. *Cardiovasc Res.* 2011 Jul 15;91(2):330-9. doi: 10.1093/cvr/cvr073. Epub 2011 Mar 15. PMID: 21406597.



79. Ma X, Liu H, Foyil SR, Godar RJ, Weinheimer CJ, Hill JA, Diwan A. Impaired autophagosome clearance contributes to cardiomyocyte death in ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. 2012 Jun 26;125(25):3170-81. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.041814. Epub 2012 May 16. PMID: 22592897; PMCID: PMC3397471.
80. Linton PJ, Gurney M, Sengstock D, Mentzer RM Jr, Gottlieb RA. This old heart: Cardiac aging and autophagy. *J Mol Cell Cardiol*. 2015 Jun;83:44-54. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.12.017. Epub 2014 Dec 24. PMID: 25543002; PMCID: PMC4459942.
81. Li Z, Wang J, Yang X. Functions of autophagy in pathological cardiac hypertrophy. *Int J Biol Sci*. 2015 Apr 27;11(6):672-8. doi: 10.7150/ijbs.11883. PMID: 25999790; PMCID: PMC4440257.
82. Ravikumar B, Duden R, Rubinsztein DC. Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum Mol Genet*. 2002 May 1;11(9):1107-17. doi: 10.1093/hmg/11.9.1107. PMID: 11978769.
83. Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, Oroz LG, Scaravilli F, Easton DF, Duden R, O'Kane CJ, Rubinsztein DC. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet*. 2004 Jun;36(6):585-95. doi: 10.1038/ng1362. Epub 2004 May 16. PMID: 15146184.
84. Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*. 2006 Jun 15;441(7095):880-4. doi: 10.1038/nature04723. Epub 2006 Apr 19. PMID: 16625205.
85. Nikolettou V, Papandreou ME, Tavernarakis N. Autophagy in the physiology and pathology of the central nervous system. *Cell Death Differ*. 2015 Mar;22(3):398-407. doi: 10.1038/cdd.2014.204. Epub 2014 Dec 19. PMID: 25526091; PMCID: PMC4326580.
86. Hernandez D, Torres CA, Setlik W, Cebrián C, Mosharov EV, Tang G, Cheng HC, Kholodilov N, Yarygina O, Burke RE, Gershon M, Sulzer D. Regulation of presynaptic neurotransmission by macroautophagy. *Neuron*. 2012 Apr

- 26;74(2):277-84. doi: 10.1016/j.neuron.2012.02.020. PMID: 22542182; PMCID: PMC3578406.
87. Wang C, Liang CC, Bian ZC, Zhu Y, Guan JL. FIP200 is required for maintenance and differentiation of postnatal neural stem cells. *Nat Neurosci.* 2013 May;16(5):532-42. doi: 10.1038/nn.3365. Epub 2013 Mar 31. PMID: 23542691; PMCID: PMC3637881.
88. Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature.* 1999 Dec 9;402(6762):672-6. doi: 10.1038/45257. PMID: 10604474.
89. Qu X, Zou Z, Sun Q, Luby-Phelps K, Cheng P, Hogan RN, Gilpin C, Levine B. Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell.* 2007 Mar 9;128(5):931-46. doi: 10.1016/j.cell.2006.12.044. PMID: 17350577.
90. Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhisa T, Mizushima N. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature.* 2004 Dec 23;432(7020):1032-6. doi: 10.1038/nature03029. Epub 2004 Nov 3. PMID: 15525940.
91. Meijer AJ, Codogno P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Dec;36(12):2445-62. doi: 10.1016/j.biocel.2004.02.002. PMID: 15325584.
92. Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene.* 2004 Apr 12;23(16):2891-906. doi: 10.1038/sj.onc.1207521. PMID: 15077152.
93. Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science.* 2004 Nov 5;306(5698):990-5. doi: 10.1126/science.1099993. PMID: 15528435; PMCID: PMC1705980.
94. Yang X, Yu DD, Yan F, Jing YY, Han ZP, Sun K, Liang L, Hou J, Wei LX. The role of autophagy induced by tumor microenvironment in different cells and stages of cancer. *Cell Biosci.* 2015 Mar 28;5:14. doi: 10.1186/s13578-015-0005-2. PMID: 25844158; PMCID: PMC4384293.

95. Yang S, Wang X, Contino G, Liesa M, Sahin E, Ying H, Bause A, Li Y, Stommel JM, Dell'antonio G, Mautner J, Tonon G, Haigis M, Shirihai OS, Doglioni C, Bardeesy N, Kimmelman AC. Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes Dev.* 2011 Apr 1;25(7):717-29. doi: 10.1101/gad.2016111. Epub 2011 Mar 15. PMID: 21406549; PMCID: PMC3070934.
96. Zhi X, Zhong Q. Autophagy in cancer. *F1000Prime Rep.* 2015 Feb 3;7:18. doi: 10.12703/P7-18. PMID: 25750736; PMCID: PMC4338832.
97. Trocoli A, Djavaheri-Mergny M. The complex interplay between autophagy and NF- $\kappa$ B signaling pathways in cancer cells. *Am J Cancer Res.* 2011;1(5):629-49. Epub 2011 Apr 26. PMID: 21994903; PMCID: PMC3189824.
98. Zhong Z, Sanchez-Lopez E, Karin M. Autophagy, Inflammation, and Immunity: A Troika Governing Cancer and Its Treatment. *Cell.* 2016 Jul 14;166(2):288-298. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.051. PMID: 27419869; PMCID: PMC4947210.
99. Lin HH, Chung Y, Cheng CT, Ouyang C, Fu Y, Kuo CY, Chi KK, Sadeghi M, Chu P, Kung HJ, Li CF, Limesand KH, Ann DK. Autophagic reliance promotes metabolic reprogramming in oncogenic KRAS-driven tumorigenesis. *Autophagy.* 2018;14(9):1481-1498. doi: 10.1080/15548627.2018.1450708. Epub 2018 Aug 21. PMID: 29956571; PMCID: PMC6135591.
100. Duan L, Perez RE, Davaadelger B, Dedkova EN, Blatter LA, Maki CG. p53-regulated autophagy is controlled by glycolysis and determines cell fate. *Oncotarget.* 2015 Sep 15;6(27):23135-56. doi: 10.18632/oncotarget.5218. PMID: 26337205; PMCID: PMC4695109.
101. Yu J, Zhang L. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Jun 10;331(3):851-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.03.189. PMID: 15865941.
102. Gartel AL, Serfas MS, Tyner AL. p21—Negative Regulator of the Cell Cycle. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.* 1996;213(2):138-149. doi:10.3181/00379727-213-44046
103. Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 May;9(5):402-12. doi: 10.1038/nrm2395. PMID: 18431400.

104. Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett.* 2010 Apr 2;584(7):1287-95. doi: 10.1016/j.febslet.2010.01.017. Epub 2010 Jan 18. PMID: 20083114; PMCID: PMC2846630.
105. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* 2011 Feb;13(2):132-41. doi: 10.1038/ncb2152. Epub 2011 Jan 23. PMID: 21258367; PMCID: PMC3987946.
106. Guo JY, Xia B, White E. Autophagy-mediated tumor promotion. *Cell.* 2013 Dec 5;155(6):1216-9. doi: 10.1016/j.cell.2013.11.019. PMID: 24315093; PMCID: PMC3987898.
107. Guo JY, Karsli-Uzunbas G, Mathew R, Aisner SC, Kamphorst JJ, Strohecker AM, Chen G, Price S, Lu W, Teng X, Snyder E, Santanam U, Dipaola RS, Jacks T, Rabinowitz JD, White E. Autophagy suppresses progression of K-ras-induced lung tumors to oncocytomas and maintains lipid homeostasis. *Genes Dev.* 2013 Jul 1;27(13):1447-61. doi: 10.1101/gad.219642.113. PMID: 23824538; PMCID: PMC3713426.
108. Vakifahmetoglu-Norberg H, Kim M, Xia HG, Iwanicki MP, Ofengeim D, Coloff JL, Pan L, Ince TA, Kroemer G, Brugge JS, Yuan J. Chaperone-mediated autophagy degrades mutant p53. *Genes Dev.* 2013 Aug 1;27(15):1718-30. doi: 10.1101/gad.220897.113. Erratum in: *Genes Dev.* 2013 Sep 1;27(17):1947. Erratum in: *Genes Dev.* 2016 Apr 1;30(7):870. PMID: 23913924; PMCID: PMC3744729.
109. White E. Autophagy and p53. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016 Apr 1;6(4):a026120. doi: 10.1101/cshperspect.a026120. PMID: 27037419; PMCID: PMC4817743.
110. Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer.* 2009 Jun;9(6):400-14. doi: 10.1038/nrc2657. PMID: 19440234; PMCID: PMC2722839.
111. Karimian A, Ahmadi Y, Yousefi B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair*

- (Amst). 2016 Jun;42:63-71. doi: 10.1016/j.dnarep.2016.04.008. Epub 2016 Apr 22. PMID: 27156098.
112. Blagosklonny MV. Are p27 and p21 cytoplasmic oncoproteins? *Cell Cycle*. 2002 Nov-Dec;1(6):391-3. doi: 10.4161/cc.1.6.262. PMID: 12548011.
  113. Mohapatra P, Preet R, Das D, Satapathy SR, Choudhuri T, Wyatt MD, Kundu CN. Quinacrine-mediated autophagy and apoptosis in colon cancer cells is through a p53- and p21-dependent mechanism. *Oncol Res*. 2012;20(2-3):81-91. doi: 10.3727/096504012x13473664562628. PMID: 23193914.
  114. Jung D, Khurana A, Roy D, Kalogera E, Bakkum-Gamez J, Chien J, Shridhar V. Quinacrine upregulates p21/p27 independent of p53 through autophagy-mediated downregulation of p62-Skp2 axis in ovarian cancer. *Sci Rep*. 2018 Feb 6;8(1):2487. doi: 10.1038/s41598-018-20531-w. PMID: 29410485; PMCID: PMC5802832.
  115. Matoušek P, Buzrla P, Reguli Š, Krajča J, Dvořáčková J, Lipina R. Factors That Predict the Growth of Residual Nonfunctional Pituitary Adenomas: Correlations between Relapse and Cell Cycle Markers. *Biomed Res Int*. 2018 Jul 10;2018:1876290. doi: 10.1155/2018/1876290. PMID: 30112364; PMCID: PMC6077672.
  116. Dong W, Li J, Liu Q, Liu C, Li C, Song G, Zhu H, Gao H, Zhang Y. P21Waf1/Cip1 and p27Kip1 are correlated with the development and invasion of prolactinoma. *J Neurooncol*. 2018 Feb;136(3):485-494. doi: 10.1007/s11060-017-2683-6. Epub 2017 Dec 11. PMID: 29230669.
  117. Würth R, Thellung S, Corsaro A, Barbieri F, Florio T. Experimental Evidence and Clinical Implications of Pituitary Adenoma Stem Cells. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Feb 20;11:54. doi: 10.3389/fendo.2020.00054. PMID: 32153500; PMCID: PMC7044184.
  118. Mantovani G, Giardino E, Treppiedi D, Catalano R, Mangili F, Spada A, Arosio M, Peverelli E. Stem Cells in Pituitary Tumors: Experimental Evidence Supporting Their Existence and Their Role in Tumor Clinical Behavior. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 Oct 25;10:745. doi: 10.3389/fendo.2019.00745. PMID: 31708878; PMCID: PMC6823178.

119. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008 Jan 11;132(1):27-42. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.018. PMID: 18191218; PMCID: PMC2696814.
120. Weckman A, Di Ieva A, Rotondo F, Syro LV, Ortiz LD, Kovacs K, Cusimano MD. Autophagy in the endocrine glands. *J Mol Endocrinol*. 2014 Feb 24;52(2):R151-63. doi: 10.1530/JME-13-0241. PMID: 24565917.
121. Bernabé A, Gómez MA, Seva J, Serrano J, Sánchez J, Navarro JA. Light and ultrastructural immunocytochemical study of prolactin cells in ovine adenohypophysis. Influence of lactation and weaning. *Cells Tissues Organs*. 2001;168(4):264-71. doi: 10.1159/000047843. PMID: 11275693.
122. Smith RE, Farquhar MG. Lysosome function in the regulation of the secretory process in cells of the anterior pituitary gland. *J Cell Biol*. 1966 Nov 1;31(2):319-47. doi: 10.1083/jcb.31.2.319. PMID: 19866704; PMCID: PMC2107048.
123. Moi VD, Bácsy E, Gaál G, Rappay G. Lysosomal enzyme activities in hypo- and hypersecretory anterior pituitary cells. A combined immunocytochemical and enzyme cytochemical study. *Histochemistry*. 1984;81(1):79-85. doi: 10.1007/BF00495405. PMID: 6088442.
124. Kuriakose NR, Reifel CW, Bendayan M, Elce JS, Shin SH. Prolactin crinophagy is induced in the estrogen-stimulated male rat pituitary. *Histochemistry*. 1989;92(6):499-503. doi: 10.1007/BF00524761. PMID: 2807996.
125. Aflorei ED, Korbonits M. Epidemiology and etiopathogenesis of pituitary adenomas. *J Neurooncol*. 2014 May;117(3):379-94. doi: 10.1007/s11060-013-1354-5. Epub 2014 Jan 31. PMID: 24481996.
126. Di Ieva A, Rotondo F, Syro LV, Cusimano MD, Kovacs K. Aggressive pituitary adenomas--diagnosis and emerging treatments. *Nat Rev Endocrinol*. 2014 Jul;10(7):423-35. doi: 10.1038/nrendo.2014.64. Epub 2014 May 13. PMID: 24821329.
127. Tirosh A, Shimon I. Current approach to treatments for prolactinomas. *Minerva Endocrinol*. 2016 Sep;41(3):316-23. Epub 2015 Sep 24. PMID: 26399371.

128. Miermeister CP, Petersenn S, Buchfelder M, Fahlbusch R, Lüdecke DK, Hölsken A, Bergmann M, Knappe HU, Hans VH, Flitsch J, Saeger W, Buslei R. Histological criteria for atypical pituitary adenomas - data from the German pituitary adenoma registry suggests modifications. *Acta Neuropathol Commun*. 2015 Aug 19;3:50. doi: 10.1186/s40478-015-0229-8. Erratum in: *Acta Neuropathol Commun*. 2016;4(1):21. PMID: 26285571; PMCID: PMC4545559.
129. Mete O, Lopes MB. Overview of the 2017 WHO Classification of Pituitary Tumors. *Endocr Pathol*. 2017 Sep;28(3):228-243. doi: 10.1007/s12022-017-9498-z. PMID: 28766057.
130. Asa SL, Casar-Borota O, Chanson P, Delgrange E, Earls P, Ezzat S, Grossman A, Ikeda H, Inoshita N, Karavitaki N, Korbonits M, Laws ER Jr, Lopes MB, Maartens N, McCutcheon IE, Mete O, Nishioka H, Raverot G, Roncaroli F, Saeger W, Syro LV, Vasiljevic A, Villa C, Wierinckx A, Trouillas J; attendees of 14th Meeting of the International Pituitary Pathology Club, Annecy, France, November 2016. From pituitary adenoma to pituitary neuroendocrine tumor (PitNET): an International Pituitary Pathology Club proposal. *Endocr Relat Cancer*. 2017 Apr;24(4):C5-C8. doi: 10.1530/ERC-17-0004. PMID: 28264912.
131. Herman V, Fagin J, Gonsky R, Kovacs K, Melmed S. Clonal origin of pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990 Dec;71(6):1427-33. doi: 10.1210/jcem-71-6-1427. PMID: 1977759.
132. Zatelli MC. Pathogenesis of non-functioning pituitary adenomas. *Pituitary*. 2018 Apr;21(2):130-137. doi: 10.1007/s11102-018-0874-6. PMID: 29404893.
133. Kovacs K, Horvath E, Ilse RG, Ezrin C, Ilse D. Spontaneous pituitary adenomas in aging rats. A light microscopic, immunocytological and fine structural study. *Beitr Pathol*. 1977 Sep;161(1):1-16. doi: 10.1016/s0005-8165(77)80106-6. PMID: 336031.
134. Horvath E, Kovacs K, Killinger DW, Smyth HS, Platts ME, Singer W. Silent corticotropic adenomas of the human pituitary gland: a histologic, immunocytologic, and ultrastructural study. *Am J Pathol*. 1980 Mar;98(3):617-38. PMID: 6244736; PMCID: PMC1903510.

135. Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011 Jan;12(1):9-14. doi: 10.1038/nrm3028. PMID: 21179058; PMCID: PMC4780047.
136. Deyu H, Luqing C, Xianglian L, Pu G, Qirong L, Xu W, Zonghui Y. Protective mechanisms involving enhanced mitochondrial functions and mitophagy against T-2 toxin-induced toxicities in GH3 cells. *Toxicol Lett.* 2018 Oct 1;295:41-53. doi: 10.1016/j.toxlet.2018.05.041. Epub 2018 Jun 2. PMID: 29870751.
137. Leng ZG, Lin SJ, Wu ZR, Guo YH, Cai L, Shang HB, Tang H, Xue YJ, Lou MQ, Zhao W, Le WD, Zhao WG, Zhang X, Wu ZB. Activation of DRD5 (dopamine receptor D5) inhibits tumor growth by autophagic cell death. *Autophagy.* 2017 Aug 3;13(8):1404-1419. doi: 10.1080/15548627.2017.1328347. Epub 2017 Jun 14. PMID: 28613975; PMCID: PMC5584849.
138. Tang C, Sun R, Wen G, Zhong C, Yang J, Zhu J, Cong Z, Luo X, Ma C. Bromocriptine and cabergoline induce cell death in prolactinoma cells via the ERK/EGR1 and AKT/mTOR pathway respectively. *Cell Death Dis.* 2019 Apr 18;10(5):335. doi: 10.1038/s41419-019-1526-0. PMID: 31000722; PMCID: PMC6472389.
139. Gadelha MR, Bronstein MD, Brue T, Coculescu M, Fleseriu M, Guitelman M, Pronin V, Raverot G, Shimon I, Lievre KK, Fleck J, Aout M, Pedroncelli AM, Colao A; Pasireotide C2402 Study Group. Pasireotide versus continued treatment with octreotide or lanreotide in patients with inadequately controlled acromegaly (PAOLA): a randomised, phase 3 trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014 Nov;2(11):875-84. doi: 10.1016/S2213-8587(14)70169-X. Epub 2014 Sep 24. PMID: 25260838.
140. Dagistanli FK, Ozkaya HM, Kucukyoruk B, Biceroglu H, Metin D, Gazioglu N, Oz B, Kadioglu P, Ozturk M. Preoperative Somatostatin Analogue Treatment Might Trigger Apoptosis and Autophagy in Tumor Tissues of Patients with Acromegaly: A Pilot Study. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2018



- Mar;126(3):168-175. doi: 10.1055/s-0042-107243. Epub 2016 Jun 20. PMID: 27322826.
141. Lim S, Shahinian H, Maya MM, Yong W, Heaney AP. Temozolomide: a novel treatment for pituitary carcinoma. *Lancet Oncol.* 2006 Jun;7(6):518-20. doi: 10.1016/S1470-2045(06)70728-8. PMID: 16750503.
  142. Kun Z, Yuling Y, Dongchun W, Bingbing X, Xiaoli L, Bin X. HIF-1 $\alpha$  Inhibition Sensitized Pituitary Adenoma Cells to Temozolomide by Regulating Presenilin 1 Expression and Autophagy. *Technol Cancer Res Treat.* 2016 Dec;15(6):NP95-NP104. doi: 10.1177/1533034615618834. Epub 2015 Dec 8. PMID: 26647409.
  143. Amaravadi RK, Lippincott-Schwartz J, Yin XM, Weiss WA, Takebe N, Timmer W, DiPaola RS, Lotze MT, White E. Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clin Cancer Res.* 2011 Feb 15;17(4):654-66. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2634. PMID: 21325294; PMCID: PMC3075808.
  144. Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science.* 2004 Nov 5;306(5698):990-5. doi: 10.1126/science.1099993. PMID: 15528435; PMCID: PMC1705980.
  145. Sotelo J, Briceño E, López-González MA. Adding chloroquine to conventional treatment for glioblastoma multiforme: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med.* 2006 Mar 7;144(5):337-43. doi: 10.7326/0003-4819-144-5-200603070-00008. PMID: 16520474.
  146. Lin SJ, Wu ZR, Cao L, Zhang Y, Leng ZG, Guo YH, Shang HB, Zhao WG, Zhang X, Wu ZB. Pituitary Tumor Suppression by Combination of Cabergoline and Chloroquine. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017 Oct 1;102(10):3692-3703. doi: 10.1210/jc.2017-00627. PMID: 28973192.
  147. National Research Council (US) Institute for Laboratory Animal Research. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.* Washington (DC): National Academies Press (US); 1996. PMID: 25121211.

148. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell*. 2010 Feb 5;140(3):313-26. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.028. PMID: 20144757; PMCID: PMC2852113.
149. Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, Agholme L, Agnello M, Agostinis P, Aguirre-Ghiso JA, Ahn HJ, Ait-Mohamed O, Ait-Si-Ali S, Akematsu T, Akira S, Al-Younes HM, Al-Zeer MA, Albert ML, Albin RL, Alegre-Abarrategui J, Aleo MF, Alirezaei M, Almasan A, Almonte-Becerril M, Amano A, Amaravadi R, Amarnath S, Amer AO, Andrieu-Abadie N, Anantharam V, Ann DK, Anoopkumar-Dukie S, Aoki H, Apostolova N, Arancia G, Aris JP, Asanuma K, Asare NY, Ashida H, Askanas V, Askew DS, Auberger P, Baba M, Backues SK, Baehrecke EH, Bahr BA, Bai XY, Bailly Y, Baiocchi R, Baldini G, Balduini W, Ballabio A, Bamber BA, Bampton ET, Bánhegyi G, Bartholomew CR, Bassham DC, Bast RC Jr, Batoko H, Bay BH, Beau I, Béchet DM, Begley TJ, Behl C, Behrends C, Bekri S, Bellaire B, Bendall LJ, Benetti L, Berliocchi L, Bernardi H, Bernassola F, Besteiro S, Bhatia-Kissova I, Bi X, Biard-Piechaczyk M, Blum JS, Boise LH, Bonaldo P, Boone DL, Bornhauser BC, Bortoluci KR, Bossis I, Bost F, Bourquin JP, Boya P, Boyer-Guittaut M, Bozhkov PV, Brady NR, Brancolini C, Brech A, Brenman JE, Brennand A, Bresnick EH, Brest P, Bridges D, Bristol ML, Brookes PS, Brown EJ, Brumell JH, Brunetti-Pierri N, Brunk UT, Bulman DE, Bultman SJ, Bultynck G, Burbulla LF, Bursch W, Butchar JP, Buzgariu W, Bydlowski SP, Cadwell K, Cahová M, Cai D, Cai J, Cai Q, Calabretta B, Calvo-Garrido J, Camougrand N, Campanella M, Campos-Salinas J, Candi E, Cao L, Caplan AB, Carding SR, Cardoso SM, Carew JS, Carlin CR, Carmignac V, Carneiro LA, Carra S, Caruso RA, Casari G, Casas C, Castino R, Cebollero E, Cecconi F, Celli J, Chaachouay H, Chae HJ, Chai CY, Chan DC, Chan EY, Chang RC, Che CM, Chen CC, Chen GC, Chen GQ, Chen M, Chen Q, Chen SS, Chen W, Chen X, Chen X, Chen X, Chen YG, Chen Y, Chen Y, Chen YJ, Chen Z, Cheng A, Cheng CH, Cheng Y, Cheong H, Cheong JH, Cherry S, Chess-Williams R, Cheung ZH, Chevet E, Chiang HL, Chiarelli R, Chiba T, Chin LS, Chiou SH, Chisari FV, Cho CH, Cho DH, Choi AM, Choi

D, Choi KS, Choi ME, Chouaib S, Choubey D, Choubey V, Chu CT, Chuang TH, Chueh SH, Chun T, Chwae YJ, Chye ML, Ciarcia R, Ciriolo MR, Clague MJ, Clark RS, Clarke PG, Clarke R, Codogno P, Coller HA, Colombo MI, Comincini S, Condello M, Condorelli F, Cookson MR, Coombs GH, Coppens I, Corbalan R, Cossart P, Costelli P, Costes S, Coto-Montes A, Couve E, Coxon FP, Cregg JM, Crespo JL, Cronjé MJ, Cuervo AM, Cullen JJ, Czaja MJ, D'Amelio M, Darfeuille-Michaud A, Davids LM, Davies FE, De Felici M, de Groot JF, de Haan CA, De Martino L, De Milito A, De Tata V, Debnath J, Degterev A, Dehay B, Delbridge LM, Demarchi F, Deng YZ, Dengjel J, Dent P, Denton D, Deretic V, Desai SD, Devenish RJ, Di Gioacchino M, Di Paolo G, Di Pietro C, Díaz-Araya G, Díaz-Laviada I, Diaz-Meco MT, Diaz-Nido J, Dikic I, Dinesh-Kumar SP, Ding WX, Distelhorst CW, Diwan A, Djavaheri-Mergny M, Dokudovskaya S, Dong Z, Dorsey FC, Dosenko V, Dowling JJ, Doxsey S, Dreux M, Drew ME, Duan Q, Duchosal MA, Duff K, Dugail I, Durbeej M, Duszenko M, Edelstein CL, Edinger AL, Egea G, Eichinger L, Eissa NT, Ekmekcioglu S, El-Deiry WS, Elazar Z, Elgendy M, Ellerby LM, Eng KE, Engelbrecht AM, Engelender S, Erenpreisa J, Escalante R, Esclatine A, Eskelinen EL, Espert L, Espina V, Fan H, Fan J, Fan QW, Fan Z, Fang S, Fang Y, Fanto M, Fanzani A, Farkas T, Farré JC, Faure M, Fechheimer M, Feng CG, Feng J, Feng Q, Feng Y, Fésüs L, Feuer R, Figueiredo-Pereira ME, Fimia GM, Fingar DC, Finkbeiner S, Finkel T, Finley KD, Fiorito F, Fisher EA, Fisher PB, Flajolet M, Florez-McClure ML, Florio S, Fon EA, Fornai F, Fortunato F, Fotodar R, Fowler DH, Fox HS, Franco R, Frankel LB, Fransen M, Fuentes JM, Fueyo J, Fujii J, Fujisaki K, Fujita E, Fukuda M, Furukawa RH, Gaestel M, Gailly P, Gajewska M, Galliot B, Galy V, Ganesh S, Ganetzky B, Ganley IG, Gao FB, Gao GF, Gao J, Garcia L, Garcia-Manero G, Garcia-Marcos M, Garmyn M, Gartel AL, Gatti E, Gautel M, Gawriluk TR, Gegg ME, Geng J, Germain M, Gestwicki JE, Gewirtz DA, Ghavami S, Ghosh P, Giammarioli AM, Giatromanolaki AN, Gibson SB, Gilkerson RW, Ginger ML, Ginsberg HN, Golab J, Goligorsky MS, Golstein P, Gomez-Manzano C, Goncu E, Gongora C, Gonzalez CD, Gonzalez R, González-Estévez C, González-Polo

RA, Gonzalez-Rey E, Gorbunov NV, Gorski S, Goruppi S, Gottlieb RA, Gozuacik D, Granato GE, Grant GD, Green KN, Gregorc A, Gros F, Grose C, Grunt TW, Gual P, Guan JL, Guan KL, Guichard SM, Gukovskaya AS, Gukovsky I, Gunst J, Gustafsson AB, Halayko AJ, Hale AN, Halonen SK, Hamasaki M, Han F, Han T, Hancock MK, Hansen M, Harada H, Harada M, Hardt SE, Harper JW, Harris AL, Harris J, Harris SD, Hashimoto M, Haspel JA, Hayashi S, Hazelhurst LA, He C, He YW, Hébert MJ, Heidenreich KA, Helfrich MH, Helgason GV, Henske EP, Herman B, Herman PK, Hetz C, Hilfiker S, Hill JA, Hocking LJ, Hofman P, Hofmann TG, Höhfeld J, Holyoake TL, Hong MH, Hood DA, Hotamisligil GS, Houwerzijl EJ, Høyer-Hansen M, Hu B, Hu CA, Hu HM, Hua Y, Huang C, Huang J, Huang S, Huang WP, Huber TB, Huh WK, Hung TH, Hupp TR, Hur GM, Hurley JB, Hussain SN, Hussey PJ, Hwang JJ, Hwang S, Ichihara A, Ilkhanizadeh S, Inoki K, Into T, Iovane V, Iovanna JL, Ip NY, Isaka Y, Ishida H, Isidoro C, Isobe K, Iwasaki A, Izquierdo M, Izumi Y, Jaakkola PM, Jäättelä M, Jackson GR, Jackson WT, Janji B, Jendrach M, Jeon JH, Jeung EB, Jiang H, Jiang H, Jiang JX, Jiang M, Jiang Q, Jiang X, Jiang X, Jiménez A, Jin M, Jin S, Joe CO, Johansen T, Johnson DE, Johnson GV, Jones NL, Joseph B, Joseph SK, Joubert AM, Juhász G, Juillerat-Jeanneret L, Jung CH, Jung YK, Kaarniranta K, Kaasik A, Kabuta T, Kadowaki M, Kagedal K, Kamada Y, Kaminsky VO, Kampinga HH, Kanamori H, Kang C, Kang KB, Kang KI, Kang R, Kang YA, Kanki T, Kanneganti TD, Kanno H, Kanthasamy AG, Kanthasamy A, Karantza V, Kaushal GP, Kaushik S, Kawazoe Y, Ke PY, Kehrl JH, Kelekar A, Kerkhoff C, Kessel DH, Khalil H, Kiel JA, Kiger AA, Kihara A, Kim DR, Kim DH, Kim DH, Kim EK, Kim HR, Kim JS, Kim JH, Kim JC, Kim JK, Kim PK, Kim SW, Kim YS, Kim Y, Kimchi A, Kimmelman AC, King JS, Kinsella TJ, Kirkin V, Kirshenbaum LA, Kitamoto K, Kitazato K, Klein L, Klimecki WT, Klucken J, Knecht E, Ko BC, Koch JC, Koga H, Koh JY, Koh YH, Koike M, Komatsu M, Kominami E, Kong HJ, Kong WJ, Korolchuk VI, Kotake Y, Koukourakis MI, Kouri Flores JB, Kovács AL, Kraft C, Krainc D, Krämer H, Kretz-Remy C, Krichevsky AM, Kroemer G, Krüger R, Krut O, Ktistakis NT, Kuan CY, Kucharczyk R, Kumar

A, Kumar R, Kumar S, Kundu M, Kung HJ, Kurz T, Kwon HJ, La Spada AR, Lafont F, Lamark T, Landry J, Lane JD, Lapaquette P, Laporte JF, László L, Lavandero S, Lavoie JN, Layfield R, Lazo PA, Le W, Le Cam L, Ledbetter DJ, Lee AJ, Lee BW, Lee GM, Lee J, Lee JH, Lee M, Lee MS, Lee SH, Leeuwenburgh C, Legembre P, Legouis R, Lehmann M, Lei HY, Lei QY, Leib DA, Leiro J, Lemasters JJ, Lemoine A, Lesniak MS, Lev D, Levenson VV, Levine B, Levy E, Li F, Li JL, Li L, Li S, Li W, Li XJ, Li YB, Li YP, Liang C, Liang Q, Liao YF, Liberski PP, Lieberman A, Lim HJ, Lim KL, Lim K, Lin CF, Lin FC, Lin J, Lin JD, Lin K, Lin WW, Lin WC, Lin YL, Linden R, Lingor P, Lippincott-Schwartz J, Lisanti MP, Liton PB, Liu B, Liu CF, Liu K, Liu L, Liu QA, Liu W, Liu YC, Liu Y, Lockshin RA, Lok CN, Lonial S, Loos B, Lopez-Berestein G, López-Otín C, Lossi L, Lotze MT, Löw P, Lu B, Lu B, Lu B, Lu Z, Luciano F, Lukacs NW, Lund AH, Lynch-Day MA, Ma Y, Macian F, MacKeigan JP, Macleod KF, Madeo F, Maiuri L, Maiuri MC, Malagoli D, Malicdan MC, Malorni W, Man N, Mandelkow EM, Manon S, Manov I, Mao K, Mao X, Mao Z, Marambaud P, Marazziti D, Marcel YL, Marchbank K, Marchetti P, Marciniak SJ, Marcondes M, Mardi M, Marfe G, Mariño G, Markaki M, Marten MR, Martin SJ, Martinand-Mari C, Martinet W, Martinez-Vicente M, Masini M, Matarrese P, Matsuo S, Matteoni R, Mayer A, Mazure NM, McConkey DJ, McConnell MJ, McDermott C, McDonald C, McInerney GM, McKenna SL, McLaughlin B, McLean PJ, McMaster CR, McQuibban GA, Meijer AJ, Meisler MH, Meléndez A, Melia TJ, Melino G, Mena MA, Menendez JA, Menna-Barreto RF, Menon MB, Menzies FM, Mercer CA, Merighi A, Merry DE, Meschini S, Meyer CG, Meyer TF, Miao CY, Miao JY, Michels PA, Michiels C, Mijaljica D, Milojkovic A, Minucci S, Miracco C, Miranti CK, Mitroulis I, Miyazawa K, Mizushima N, Mograbi B, Mohseni S, Molero X, Mollereau B, Mollinedo F, Momoi T, Monastyrska I, Monick MM, Monteiro MJ, Moore MN, Mora R, Moreau K, Moreira PI, Moriyasu Y, Moscat J, Mostowy S, Mottram JC, Motyl T, Moussa CE, Müller S, Muller S, Münger K, Münz C, Murphy LO, Murphy ME, Musarò A, Mysorekar I, Nagata E, Nagata K, Nahimana A, Nair U, Nakagawa T, Nakahira K, Nakano H,

Nakatogawa H, Nanjundan M, Naqvi NI, Narendra DP, Narita M, Navarro M, Nawrocki ST, Nazarko TY, Nemchenko A, Netea MG, Neufeld TP, Ney PA, Nezis IP, Nguyen HP, Nie D, Nishino I, Nislow C, Nixon RA, Noda T, Noegel AA, Nogalska A, Noguchi S, Notterpek L, Novak I, Nozaki T, Nukina N, Nürnberger T, Nyfeler B, Obara K, Oberley TD, Oddo S, Ogawa M, Ohashi T, Okamoto K, Oleinick NL, Oliver FJ, Olsen LJ, Olsson S, Opota O, Osborne TF, Ostrander GK, Otsu K, Ou JH, Ouimet M, Overholtzer M, Ozpolat B, Paganetti P, Pagnini U, Pallet N, Palmer GE, Palumbo C, Pan T, Panaretakis T, Pandey UB, Papackova Z, Papassideri I, Paris I, Park J, Park OK, Parys JB, Parzych KR, Patschan S, Patterson C, Pattingre S, Pawelek JM, Peng J, Perlmutter DH, Perrotta I, Perry G, Pervaiz S, Peter M, Peters GJ, Petersen M, Petrovski G, Phang JM, Piacentini M, Pierre P, Pierrefite-Carle V, Pierron G, Pinkas-Kramarski R, Piras A, Piri N, Plataniias LC, Pöggeler S, Poirot M, Poletti A, Poüs C, Pozuelo-Rubio M, Prætorius-Ibba M, Prasad A, Prescott M, Priault M, Produit-Zengaffinen N, Progulske-Fox A, Proikas-Cezanne T, Przedborski S, Przyklenk K, Puertollano R, Puyal J, Qian SB, Qin L, Qin ZH, Quaggin SE, Raben N, Rabinowich H, Rabkin SW, Rahman I, Rami A, Ramm G, Randall G, Randow F, Rao VA, Rathmell JC, Ravikumar B, Ray SK, Reed BH, Reed JC, Reggiori F, Régnier-Vigouroux A, Reichert AS, Reiners JJ Jr, Reiter RJ, Ren J, Revuelta JL, Rhodes CJ, Ritis K, Rizzo E, Robbins J, Roberge M, Roca H, Roccheri MC, Rocchi S, Rodemann HP, Rodríguez de Córdoba S, Rohrer B, Roninson IB, Rosen K, Rost-Roszkowska MM, Rouis M, Rouschop KM, Rovetta F, Rubin BP, Rubinsztein DC, Ruckdeschel K, Rucker EB 3rd, Rudich A, Rudolf E, Ruiz-Opazo N, Russo R, Rusten TE, Ryan KM, Ryter SW, Sabatini DM, Sadoshima J, Saha T, Saitoh T, Sakagami H, Sakai Y, Salekdeh GH, Salomoni P, Salvaterra PM, Salvesen G, Salvioli R, Sanchez AM, Sánchez-Alcázar JA, Sánchez-Prieto R, Sandri M, Sankar U, Sansanwal P, Santambrogio L, Saran S, Sarkar S, Sarwal M, Sasakawa C, Sasnauskiene A, Sass M, Sato K, Sato M, Schapira AH, Scharl M, Schätzl HM, Scheper W, Schiaffino S, Schneider C, Schneider ME, Schneider-Stock R, Schoenlein PV, Schorderet DF, Schüller C, Schwartz GK, Scorrano L, Sealy L, Seglen PO,

Segura-Aguilar J, Seiliez I, Seleverstov O, Sell C, Seo JB, Separovic D, Setaluri V, Setoguchi T, Settembre C, Shacka JJ, Shanmugam M, Shapiro IM, Shaulian E, Shaw RJ, Shelhamer JH, Shen HM, Shen WC, Sheng ZH, Shi Y, Shibuya K, Shidoji Y, Shieh JJ, Shih CM, Shimada Y, Shimizu S, Shintani T, Shirihai OS, Shore GC, Sibirny AA, Sidhu SB, Sikorska B, Silva-Zacarin EC, Simmons A, Simon AK, Simon HU, Simone C, Simonsen A, Sinclair DA, Singh R, Sinha D, Sinicrope FA, Sirko A, Siu PM, Sivridis E, Skop V, Skulachev VP, Slack RS, Smaili SS, Smith DR, Soengas MS, Soldati T, Song X, Sood AK, Soong TW, Sotgia F, Spector SA, Spies CD, Springer W, Srinivasula SM, Stefanis L, Steffan JS, Stendel R, Stenmark H, Stephanou A, Stern ST, Sternberg C, Stork B, Strålfors P, Subauste CS, Sui X, Sulzer D, Sun J, Sun SY, Sun ZJ, Sung JJ, Suzuki K, Suzuki T, Swanson MS, Swanton C, Sweeney ST, Sy LK, Szabadkai G, Tabas I, Taegtmeier H, Tafani M, Takács-Vellai K, Takano Y, Takegawa K, Takemura G, Takeshita F, Talbot NJ, Tan KS, Tanaka K, Tanaka K, Tang D, Tang D, Tanida I, Tannous BA, Tavernarakis N, Taylor GS, Taylor GA, Taylor JP, Terada LS, Terman A, Tettamanti G, Thevissen K, Thompson CB, Thorburn A, Thumm M, Tian F, Tian Y, Tocchini-Valentini G, Tolkovsky AM, Tomino Y, Tönges L, Tooze SA, Tournier C, Tower J, Towns R, Trajkovic V, Travassos LH, Tsai TF, Tschan MP, Tsubata T, Tsung A, Turk B, Turner LS, Tyagi SC, Uchiyama Y, Ueno T, Umekawa M, Umemiya-Shirafuji R, Unni VK, Vaccaro MI, Valente EM, Van den Berghe G, van der Klei IJ, van Doorn W, van Dyk LF, van Egmond M, van Grunsven LA, Vandenabeele P, Vandenberghe WP, Vanhorebeek I, Vaquero EC, Velasco G, Vellai T, Vicencio JM, Vierstra RD, Vila M, Vindis C, Viola G, Viscomi MT, Voitsekhovskaja OV, von Haefen C, Votruba M, Wada K, Wade-Martins R, Walker CL, Walsh CM, Walter J, Wan XB, Wang A, Wang C, Wang D, Wang F, Wang F, Wang G, Wang H, Wang HG, Wang HD, Wang J, Wang K, Wang M, Wang RC, Wang X, Wang X, Wang YJ, Wang Y, Wang Z, Wang ZC, Wang Z, Wansink DG, Ward DM, Watada H, Waters SL, Webster P, Wei L, Wehl CC, Weiss WA, Welford SM, Wen LP, Whitehouse CA, Whitton JL, Whitworth AJ, Wileman T, Wiley JW,

- Wilkinson S, Willbold D, Williams RL, Williamson PR, Wouters BG, Wu C, Wu DC, Wu WK, Wytttenbach A, Xavier RJ, Xi Z, Xia P, Xiao G, Xie Z, Xie Z, Xu DZ, Xu J, Xu L, Xu X, Yamamoto A, Yamamoto A, Yamashina S, Yamashita M, Yan X, Yanagida M, Yang DS, Yang E, Yang JM, Yang SY, Yang W, Yang WY, Yang Z, Yao MC, Yao TP, Yeganeh B, Yen WL, Yin JJ, Yin XM, Yoo OJ, Yoon G, Yoon SY, Yorimitsu T, Yoshikawa Y, Yoshimori T, Yoshimoto K, You HJ, Youle RJ, Younes A, Yu L, Yu L, Yu SW, Yu WH, Yuan ZM, Yue Z, Yun CH, Yuzaki M, Zahirnyk O, Silva-Zacarin E, Zacks D, Zacksenhaus E, Zaffaroni N, Zakeri Z, Zeh HJ 3rd, Zeitlin SO, Zhang H, Zhang HL, Zhang J, Zhang JP, Zhang L, Zhang L, Zhang MY, Zhang XD, Zhao M, Zhao YF, Zhao Y, Zhao ZJ, Zheng X, Zhivotovsky B, Zhong Q, Zhou CZ, Zhu C, Zhu WG, Zhu XF, Zhu X, Zhu Y, Zoladek T, Zong WX, Zorzano A, Zschocke J, Zuckerbraun B. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*. 2012 Apr;8(4):445-544. doi: 10.4161/auto.19496. PMID: 22966490; PMCID: PMC3404883.
150. Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med*. 2013 Feb 14;368(7):651-62. doi: 10.1056/NEJMra1205406. PMID: 23406030.
151. Tanida I. Autophagy basics. *Microbiol Immunol*. 2011 Jan;55(1):1-11. doi: 10.1111/j.1348-0421.2010.00271.x. PMID: 21175768.
152. Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*. 2004 Apr;6(4):463-77. doi: 10.1016/s1534-5807(04)00099-1. PMID: 15068787.
153. Mukdsi JH, De Paul AL, Petiti JP, Gutiérrez S, Aoki A, Torres AI. Pattern of FGF-2 isoform expression correlated with its biological action in experimental prolactinomas. *Acta Neuropathol*. 2006 Oct; 112(4):491-501
154. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat versión 2018. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en: URL <http://www.infostat.com.ar>.
155. Jiang P, Mizushima N: Autophagy and human diseases. *Cell Res* 2014, 24:69-79.



156. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*. 2011 Nov 11;147(4):728-41. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.026. PMID: 22078875.
157. Weckman A, Di Ieva A, Rotondo F, Syro LV, Ortiz LD, Kovacs K, Cusimano MD. Autophagy in the endocrine glands. *J Mol Endocrinol*. 2014 Feb 24;52(2):R151-63. doi: 10.1530/JME-13-0241. PMID: 24565917.
158. Poole MC, Mahesh VB & Costoff A 1981 Morphometric analysis of the autophagic and crinophagic lysosomal systems in mammoth throughout the estrous cycle of the rat. *Cell and Tissue Research* 220:131–137. (doi:10.1007/BF00209972).
159. Farquhar MG 1969 Lysosome function in regulating secretion: disposal of secretory granules in cells of the anterior pituitary gland. In *Lysosomes in Biology and Pathology*, vol 2, pp 462–482. Eds JT Jingle & HB Fell. Amsterdam: North-Holland Publ.
160. Sirek AM, Horvath E, Ezrin C, Kovacs K. Effect of starvation on pituitary growth hormone cells and blood growth hormone and prolactin levels in the rat. *Nutr Metab*. 1976;20(1):67-75. doi: 10.1159/000175688. PMID: 958650.
161. Weckman A, Rotondo F, Di Ieva A, Syro LV, Butz H, Cusimano MD, Kovacs K. Autophagy in endocrine tumors. *Endocr Relat Cancer*. 2015 Aug;22(4):R205-18. doi: 10.1530/ERC-15-0042. Epub 2015 May 6. PMID: 25947570.
162. Lieberman ME, Maurer RA, Claude P, Wiklund J, Wertz N, Gorski J. Regulation of pituitary growth and prolactin gene expression by estrogen. *Adv Exp Med Biol*. 1981;138:151-63. doi: 10.1007/978-1-4615-7192-6\_9. PMID: 7342713.
163. Takekoshi S, Yasui Y, Inomoto C, Kitatani K, Nakamura N, Osamura RY. A Histopathological Study of Multi-hormone Producing Proliferative Lesions in Estrogen-induced Rat Pituitary Prolactinoma. *Acta Histochem Cytochem*. 2014 Aug 29;47(4):155-64. doi: 10.1267/ahc.14029. Epub 2014 Jul 16. PMID: 25392569; PMCID: PMC4164703.

164. Cao L, Gao H, Gui S, Bai G, Lu R, Wang F, Zhang Y. Effects of the estrogen receptor antagonist fulvestrant on F344 rat prolactinoma models. *J Neurooncol*. 2014 Feb;116(3):523-31. doi: 10.1007/s11060-013-1351-8. Epub 2014 Jan 10. PMID: 24407733.
165. Ciccarelli A, Daly AF, Beckers A. The epidemiology of prolactinomas. *Pituitary*. 2005;8(1):3-6. 121) Ben Jonathan N, Hnasko R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev* 2001 Dec; 22(6):724-63
166. Sinha YN, Gilligan TA. Estrogen in high doses inhibits perphenazine-induced prolactin release. *Endocrinology*. 1982 Jan; 110(1):126-30.
167. Phelps C, Hymer WC. Characterization of estrogen-induced adenohypophyseal tumors in the Fischer 344 rat. *Neuroendocrinology*. 1983 Jul;37(1):23-31. doi: 10.1159/000123511. PMID: 6888657.
168. Weiner RI, Elias KA, Monnet F: The role of vascular changes in the etiology of prolactin-secreting anterior pituitary tumors; in MacLeod RM, Thorner MO, Scapagnini U (eds): *Prolactin. Basic and Clinical Correlates*. Fidia Reserch Series, Padova, Liviana, 1985, vol 1, pp 641-653.
169. Miyajima K, Takekoshi S, Itoh J, Kakimoto K, Miyakoshi T, Osamura RY. Inhibitory effects of anti-VEGF antibody on the growth and angiogenesis of estrogen-induced pituitary prolactinoma in Fischer 344 Rats: animal model of VEGF-targeted therapy for human endocrine tumors. *Acta Histochem Cytochem*. 2010 May 1;43(2):33-44. doi: 10.1267/ahc.09034. Epub 2010 Apr 7. PMID: 20514290; PMCID: PMC2875861.
170. Takekoshi S, Yasui Y, Inomoto C, Kitatani K, Nakamura N, Osamura RY. A Histopathological Study of Multi-hormone Producing Proliferative Lesions in Estrogen-induced Rat Pituitary Prolactinoma. *Acta Histochem Cytochem*. 2014 Aug 29;47(4):155-64. doi: 10.1267/ahc.14029. Epub 2014 Jul 16. PMID: 25392569; PMCID: PMC4164703.
171. Sabatino ME, Petiti JP, Sosa L del V, Pérez PA, Gutiérrez S, Leimgruber C, Latini A, Torres AI, De Paul AL. Evidence of cellular senescence during the development of estrogen-induced pituitary tumors. *Endocr Relat Cancer*. 2015

- Jun;22(3):299-317. doi: 10.1530/ERC-14-0333. Epub 2015 Mar 19. PMID: 25792544.
172. Gejman R, Swearingen B, Hedley-Whyte ET. Role of Ki-67 proliferation index and p53 expression in predicting progression of pituitary adenomas. *Hum Pathol.* 2008 May;39(5):758-66. doi: 10.1016/j.humpath.2007.10.004. PMID: 18439942
173. Molinari AM, Bontempo P, Schiavone EM, Tortora V, Verdicchio MA, Napolitano M, Nola E, Moncharmont B, Medici N, Nigro V, Armetta I, Abbondanza C, Puca GA. Estradiol induces functional inactivation of p53 by intracellular redistribution. *Cancer Res.* 2000 May 15;60(10):2594-7. PMID: 10825127.
174. Reed SM, Quelle DE. p53 Acetylation: Regulation and Consequences. *Cancers (Basel).* 2014 Dec 23;7(1):30-69. doi: 10.3390/cancers7010030. PMID: 25545885; PMCID: PMC4381250.
175. Franklin DS, Godfrey VL, O'Brien DA, Deng C, Xiong Y. Functional collaboration between different cyclin-dependent kinase inhibitors suppresses tumor growth with distinct tissue specificity. *Mol Cell Biol.* 2000 Aug;20(16):6147-58. doi: 10.1128/mcb.20.16.6147-6158.2000. PMID: 10913196; PMCID: PMC86090.
176. Neto AG, McCutcheon IE, Vang R, Spencer ML, Zhang W, Fuller GN. Elevated expression of p21 (WAF1/Cip1) in hormonally active pituitary adenomas. *Ann Diagn Pathol.* 2005 Feb;9(1):6-10. doi: 10.1053/j.anndiagpath.2004.10.002. PMID: 15692944.
177. Chesnokova V, Zonis S, Kovacs K, Ben-Shlomo A, Wawrowsky K, Bannykh S, Melmed S. p21(Cip1) restrains pituitary tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Nov 11;105(45):17498-503. doi: 10.1073/pnas.0804810105. Epub 2008 Nov 3. PMID: 18981426; PMCID: PMC2577704.
178. Yoshii SR, Mizushima N. Monitoring and Measuring Autophagy. *Int J Mol Sci.* 2017 Aug 28;18(9):1865. doi: 10.3390/ijms18091865. PMID: 28846632; PMCID: PMC5618514.

179. Eskelinen EL. Fine structure of the autophagosome. *Methods Mol Biol.* 2008;445:11-28. doi: 10.1007/978-1-59745-157-4\_2. PMID: 18425441.
180. Eskelinen EL, Reggiori F, Baba M, Kovács AL, Seglen PO. Seeing is believing: the impact of electron microscopy on autophagy research. *Autophagy.* 2011 Sep;7(9):935-56. doi: 10.4161/auto.7.9.15760. Epub 2011 Sep 1. PMID: 21566462.
181. Palade GE. A study of fixation for electron microscopy. *J Exp Med.* 1952 Mar;95(3):285-98. doi: 10.1084/jem.95.3.285. PMID: 14927794; PMCID: PMC2212069.
182. Jacob TG, Sreekumar VI, Roy TS, Garg PK. Electron-microscopic evidence of mitochondriae containing macroautophagy in experimental acute pancreatitis: implications for cell death. *Pancreatology.* 2014 Nov-Dec;14(6):454-8. doi: 10.1016/j.pan.2014.08.009. Epub 2014 Sep 3. PMID: 25280593.
183. Yi J, Tang XM. Functional implication of autophagy in steroid-secreting cells of the rat. *Anat Rec.* 1995 Jun;242(2):137-46. doi: 10.1002/ar.1092420202. PMID: 7668398.
184. Tang XM. [The autophagic activity of Leydig cells in normal rat testes]. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao.* 1988 Mar;21(1):119-29. Chinese. PMID: 3201844.
185. Wirth M, Joachim J, Tooze SA. Autophagosome formation--the role of ULK1 and Beclin1-PI3KC3 complexes in setting the stage. *Semin Cancer Biol.* 2013 Oct;23(5):301-9. doi: 10.1016/j.semcancer.2013.05.007. Epub 2013 May 29. PMID: 23727157.
186. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 2000 Nov 1;19(21):5720-8. doi: 10.1093/emboj/19.21.5720. Erratum in: *EMBO J.* 2003 Sep 1;22(17):4577. PMID: 11060023; PMCID: PMC305793.
187. Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy.* 2007 Nov-Dec;3(6):542-5. doi: 10.4161/auto.4600. Epub 2007 Jun 19. PMID: 17611390.

188. Tanida I, Wakabayashi M, Kanematsu T, Minematsu-Ikeguchi N, Sou YS, Hirata M, Ueno T, Kominami E. Lysosomal turnover of GABARAP-phospholipid conjugate is activated during differentiation of C2C12 cells to myotubes without inactivation of the mTor kinase-signaling pathway. *Autophagy*. 2006 Oct-Dec;2(4):264-71. doi: 10.4161/auto.2871. Epub 2006 Oct 14. PMID: 16874098.
189. Zielniok K, Sobolewska A, Gajewska M. Mechanisms of autophagy induction by sex steroids in bovine mammary epithelial cells. *J Mol Endocrinol*. 2017 Jul;59(1):29-48. doi: 10.1530/JME-16-0247. Epub 2017 Apr 20. PMID: 28428343.
190. Wang F, Xiao J, Shen Y, Yao F, Chen Y. Estrogen protects cardiomyocytes against lipopolysaccharide by inhibiting autophagy. *Mol Med Rep*. 2014 Sep;10(3):1509-12. doi: 10.3892/mmr.2014.2365. Epub 2014 Jul 7. PMID: 25017426.
191. Bajbouj K, Shafarin J, Taneera J, Hamad M. Estrogen Signaling Induces Mitochondrial Dysfunction-Associated Autophagy and Senescence in Breast Cancer Cells. *Biology (Basel)*. 2020 Apr 1;9(4):68. doi: 10.3390/biology9040068. PMID: 32244623; PMCID: PMC7235898.
192. Wen H, Gris D, Lei Y, Jha S, Zhang L, Huang MT, Brickey WJ, Ting JP. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol*. 2011 May;12(5):408-15. doi: 10.1038/ni.2022. Epub 2011 Apr 10. PMID: 21478880; PMCID: PMC4090391.
193. Ueno T, Komatsu M. Autophagy in the liver: functions in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017 Mar;14(3):170-184. doi: 10.1038/nrgastro.2016.185. Epub 2017 Jan 5. PMID: 28053338.
194. Sarparanta J, García-Macia M, Singh R. Autophagy and Mitochondria in Obesity and Type 2 Diabetes. *Curr Diabetes Rev*. 2017;13(4):352-369. doi: 10.2174/1573399812666160217122530. PMID: 26900135.
195. Ost A, Svensson K, Ruishalme I, Brännmark C, Franck N, Krook H, Sandström P, Kjolhede P, Strålfors P. Attenuated mTOR signaling and enhanced autophagy in adipocytes from obese patients with type 2 diabetes. *Mol Med*.

- 2010 Jul-Aug;16(7-8):235-46. doi: 10.2119/molmed.2010.00023. Epub 2010 Mar 26. PMID: 20386866; PMCID: PMC2896460.
196. Dehdashtian E, Mehrzadi S, Yousefi B, Hosseinzadeh A, Reiter RJ, Safa M, Ghaznavi H, Naseripour M. Diabetic retinopathy pathogenesis and the ameliorating effects of melatonin; involvement of autophagy, inflammation and oxidative stress. *Life Sci.* 2018 Jan 15;193:20-33. doi: 10.1016/j.lfs.2017.12.001. Epub 2017 Dec 5. PMID: 29203148.
197. Mrakovcic M, Fröhlich LF. p53-Mediated Molecular Control of Autophagy in Tumor Cells. *Biomolecules.* 2018 Mar 21;8(2):14. doi: 10.3390/biom8020014. PMID: 29561758; PMCID: PMC6022997.
198. Agustsson TT, Baldvinsdottir T, Jonasson JG, Olafsdottir E, Steinthorsdottir V, Sigurdsson G, Thorsson AV, Carroll PV, Korbonits M, Benediktsson R. The epidemiology of pituitary adenomas in Iceland, 1955-2012: a nationwide population-based study. *Eur J Endocrinol.* 2015 Nov;173(5):655-64. doi: 10.1530/EJE-15-0189. PMID: 26423473.
199. Cecenarro LA, Rodrigo Fanton ET, Estario P, Papalini RF, Estario MÉ. Adenomas hipofisarios: análisis de la casuística de 10 años [Pituitary tumors: 10 years of experience]. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba.* 2015;72(1):32-8. Spanish. PMID: 26273946.
200. Mindermann T, Wilson CB. Age-related and gender-related occurrence of pituitary adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1994 Sep;41(3):359-64. doi: 10.1111/j.1365-2265.1994.tb02557.x. Erratum in: *Clin Endocrinol (Oxf)* 1994 Nov;41(5):700. PMID: 7893282.
201. Fernandez A, Karavitaki N, Wass JA. Prevalence of pituitary adenomas: a community-based, cross-sectional study in Banbury (Oxfordshire, UK). *Clin Endocrinol (Oxf).* 2010 Mar;72(3):377-82. doi: 10.1111/j.1365-2265.2009.03667.x. Epub 2009 Jul 24. PMID: 19650784.
202. Clayton RN. Sporadic pituitary tumours: from epidemiology to use of databases. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 1999 Oct;13(3):451-60. doi: 10.1053/beem.1999.0036. PMID: 10909435.

203. Raverot G, Vasiljevic A, Jouanneau E, Trouillas J. A prognostic clinicopathologic classification of pituitary endocrine tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2015 Mar;44(1):11-8. doi: 10.1016/j.ecl.2014.10.001. Epub 2014 Nov 4. PMID: 25732637.
204. Osamura RY, Kajiya H, Takei M, Egashira N, Tobita M, Takekoshi S, Teramoto A. Pathology of the human pituitary adenomas. *Histochem Cell Biol.* 2008 Sep;130(3):495-507. doi: 10.1007/s00418-008-0472-1. Epub 2008 Aug 8. PMID: 18688636; PMCID: PMC2522328.
205. Kim JS, Lee YS, Jung MJ, Hong YK. The Predictive Value of Pathologic Features in Pituitary Adenoma and Correlation with Pituitary Adenoma Recurrence. *J Pathol Transl Med.* 2016 Nov;50(6):419-425. doi: 10.4132/jptm.2016.06.30. Epub 2016 Oct 6. PMID: 27713217; PMCID: PMC5122726.
206. Fahlbusch R, Buchfelder M. Transsphenoidal surgery of parasellar pituitary adenomas. *Acta Neurochir (Wien).* 1988;92(1-4):93-9. doi: 10.1007/BF01401978. PMID: 3407479.
207. Yarman S, Kurtulmus N, Canbolat A, Bayindir C, Bilgic B, Ince N. Expression of Ki-67, p53 and vascular endothelial growth factor (VEGF) concomitantly in growth 94 hormonesecreting pituitary adenomas; which one has a role in tumor behavior? *Neuro Endocrinol Lett.* 2010; 31(6):823-8.
208. Grimm F, Maurus R, Beschorner R, Naros G, Stanojevic M, Gugel I, Giese S, Bier G, Bender B, Honegger J. Ki-67 labeling index and expression of p53 are non-predictive for invasiveness and tumor size in functional and nonfunctional pituitary adenomas. *Acta Neurochir (Wien).* 2019 Jun;161(6):1149-1156. doi: 10.1007/s00701-019-03879-4. Epub 2019 Apr 30. PMID: 31037500.
209. Aranda López IF, Niveiro de Jaime M, Peiró Cabrera G, Alenda González C, Picó Alfonso A. Adenoma hipofisario: estudio de la actividad proliferativa con Ki-67. *Rev Esp Patol.* Octubre-Diciembre 2007; 40(4):225-31.
210. Sadeghipour A, Mahouzi L, Salem MM, Ebrahim-Nejad S, Asadi-Lari M, Radfar A, Filip I, Babaheidarian P. Ki67 Labeling Correlated With Invasion But Not With Recurrence. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2017

- May/Jun;25(5):341-345. doi: 10.1097/PAI.0000000000000303. PMID: 26862946.
211. Grossman AB. The 2004 World Health Organization classification of pituitary tumors: is it clinically helpful? *Acta Neuropathol.* 2006 Jan;111(1):76-7. doi: 10.1007/s00401-005-1101-x. Epub 2005 Nov 22. PMID: 16328520.
212. Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A, Cuervo AM. Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005 Feb;64(2):113-22. doi: 10.1093/jnen/64.2.113. PMID: 15751225.
213. Kostin S, Pool L, Elsässer A, Hein S, Drexler HC, Arnon E, Hayakawa Y, Zimmermann R, Bauer E, Klövekorn WP, Schaper J. Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts. *Circ Res.* 2003 Apr 18;92(7):71524. doi: 10.1161/01.RES.0000067471.95890.5C. Epub 2003 Mar 20. PMID: 12649263.
214. Mashiter K, De Marco L, Van Noorden S, Adams E, Loizou M, Joplin GF, Peters TJ. Inappropriately low serum GH in an acromegalic: lysosomal involvement in intracellular hormone degradation. *Metabolism.* 1982 Sep;31(9):931-6. doi: 10.1016/0026-0495(82)90184-6. PMID: 7121264.
215. Geng X, Ma L, Li Z, Li Z, Li J, Li M, Wang Q, Chen Z, Sun Q. Bromocriptine Induces Autophagy-Dependent Cell Death in Pituitary Adenomas. *World Neurosurg.* 2017 Apr;100:407-416. doi: 10.1016/j.wneu.2017.01.052. Epub 2017 Jan 27. PMID: 28137551.
216. Lin SJ, Leng ZG, Guo YH, Cai L, Cai Y, Li N, Shang HB, Le WD, Zhao WG, Wu ZB. Suppression of mTOR pathway and induction of autophagy-dependent cell death by cabergoline. *Oncotarget.* 2015 Nov 17;6(36):39329-41. doi: 10.18632/oncotarget.5744. PMID: 26513171; PMCID: PMC4770775.
217. Scheithauer BW, Kovacs KT, Laws ER Jr, Randall RV. Pathology of invasive pituitary tumors with special reference to functional classification. *J Neurosurg.* 1986 Dec;65(6):733-44. doi: 10.3171/jns.1986.65.6.0733. PMID: 3095506.
218. Daita G, Yonemasu Y. Dural invasion and proliferative potential of pituitary adenomas. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 1996 Apr;36(4):211-4. doi: 10.2176/nmc.36.211. PMID: 8741248.



219. Sav A, Rotondo F, Syro LV, Di Ieva A, Cusimano MD, Kovacs K. Invasive, atypical and aggressive pituitary adenomas and carcinomas. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2015 Mar;44(1):99-104. doi: 10.1016/j.ecl.2014.10.008. Epub 2014 Nov 4. PMID: 25732646.
220. Liu W, Meng Y, Zong C, Zhang S, Wei L. Autophagy and Tumorigenesis. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1207:275-299. doi: 10.1007/978-981-15-4272-5\_20. PMID: 32671755.
221. Jing Y, Sun K, Liu W, Sheng D, Zhao S, Gao L, Wei L. Tumor necrosis factor- $\alpha$  promotes hepatocellular carcinogenesis through the activation of hepatic progenitor cells. *Cancer Lett.* 2018 Oct 10;434:22-32. doi: 10.1016/j.canlet.2018.07.001. Epub 2018 Jul 4. PMID: 29981431.

# ANEXO

## Aprobación CIEIS Hospital Privado Centro Médico de Córdoba SA

Formulario\_registro no patroc. INVESTIGACION\_V2\_2016

Ministerio de SALUD  
**ENTRE TODOS** | GOBIERNO DE LA PROVINCIA DE CORDOBA | **VAMOS MAS ALTO**  
**REGISTRO PROVINCIAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD (RePIS)**

**REGISTRO DE INVESTIGACIONES NO PATROCINADAS POR LA INDUSTRIA FARMACEUTICA**

N° DE RePIS  
 DE INVESTIGACIONES NO PATROCINADAS POR LA INDUSTRIA FARMACEUTICA

3390

**I. PATROCINANTE (Universidad, Fundación, Institución que otorga beca. Corresponde marcar NO, si es independiente de autogestión)**

Posee Patrocinante:	SI <input type="checkbox"/>	NO <input checked="" type="checkbox"/>
Identificación:		
Carácter:	Público <input type="checkbox"/>	Privado <input type="checkbox"/>
	Otro <input type="checkbox"/>	

**II. TÍTULO**

Título de la Investigación	La macroautofagia como mecanismo modulador del desarrollo tumoral adenohipofisario: evidencias morfológicas y moleculares.		
Especialidad Vinculada	Neurocirugía- Endocrinología- Anatomía Patológica		
Objetivo principal	Examinar si existe interrelación entre macroautofagia y marcadores de proliferación y/o muerte celular en lesiones tumorales adenohipofisarias.		
Protocolo (Versión y Fecha)	Versión 2 Fecha 14/06/2017 N° de Trabajo 2017-25		
Consentimiento Informado (Versión y Fecha)	Versión 1 Fecha 14/06/2017	Declaración de confidencialidad	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>

<b>III. INVESTIGADOR</b>		N° RePIS Investigador
Nombre Investigador Principal	Méd. De Battista Juan Carlos	N° 947

**EQUIPO DE INVESTIGADORES**

Nombres	Coca Hugo
	Cecenarro Laura Anahi
	Mukdsi Jorge Humberto

**IV. TIPO DE INVESTIGACIÓN (marcar con cruz lo que corresponda)**

Descriptivo	<input type="checkbox"/> Descriptivo simple	Observacional	<input type="checkbox"/> de Cohortes
	<input type="checkbox"/> Descriptivo correlacional		<input type="checkbox"/> de Casos y Controles
	<input type="checkbox"/> Descriptivo longitudinal		
<input checked="" type="checkbox"/> Otros (Describir): Estudio retrospectivo y prospectivo descriptivo correlacional con diseño transversal y longitudinal			

**V. CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO (marcar lo que corresponda, pueden ser varias marcas)**

<input type="checkbox"/>	Investigación en Genética humana
<input type="checkbox"/>	Investigación en Reproducción Humana
<input type="checkbox"/>	Estudios Farmacológicos en Fase I o II
<input type="checkbox"/>	Estudios Clínicos con Vacunas (cualquier Fase)

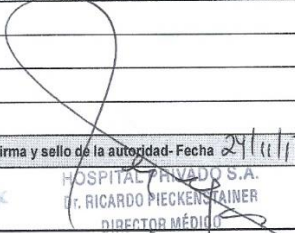
MINISTERIO DE SALUD  
 REGISTRO PROVINCIAL DE INVESTIGACION EN SALUD  
 28/11/17  
**REGISTRO**  
 N° 3390 FIRMA:

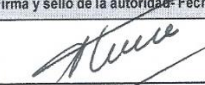
<input type="checkbox"/>	Investigaciones consideradas de alto riesgo
<input type="checkbox"/>	Nuevos procedimientos aún no descriptos y/o validados en la literatura (aún en Fase IV)
<input type="checkbox"/>	Investigación con grupos vulnerables, (niños, embarazadas, ancianos, pacientes psiquiátricos, discapacitados, poblaciones marginales, prisioneros, etc.)
<input type="checkbox"/>	Estudios que incluyen investigación en farmacogenómica

VI. VINCULACIÓN INTERNACIONAL	
<input type="checkbox"/>	Investigaciones coordinadas desde el extranjero o con participación extranjera
<input type="checkbox"/>	Estudios que incluyen envío de material biológico al extranjero

VII. ALCANCE DEL ESTUDIO				
<input type="checkbox"/>	Estudios multicéntricos	<input checked="" type="checkbox"/> Local	<input type="checkbox"/> Nacional	<input type="checkbox"/> Internacional
<input type="checkbox"/>	Otros:			

VIII. DURACIÓN	
Duración de la Investigación (tiempo estimado desde el inicio a la terminación)	5 años

IX. CENTRO DE INVESTIGACIÓN: (LUGAR DE DONDE SE EXTRAE LA MUESTRA / PACIENTES)		Nº DE REPIS DEL CENTRO	Nº 20
Establecimiento/s:	Hospital Privado Universitario de Córdoba		
Ciudad:	Córdoba Capital		
Domicilio:	Av. Naciones Unidas 346		
Ámbito:	Público <input type="checkbox"/> Privado <input type="checkbox"/> Otros (Especificar): <input checked="" type="checkbox"/>		
AUTORIDAD RESPONSABLE DEL ESTABLECIMIENTO		Firma y sello de la autoridad- Fecha	
Apellido y Nombre	Dr. Ricardo Pieckenstainer	 HOSPITAL PRIVADO S.A. Dr. RICARDO PIECKENSTAINER DIRECTOR MÉDICO	
Cargo	Director Médico Hospital Privado de Córdoba		

X. INSTITUCIÓN DONDE SE PROCESAN LOS DATOS		
Establecimiento/s:	Centro de Microscopía Electrónica, INICSA-(FCM-UNC-CONICET)	
Ciudad:	Córdoba	
Domicilio:	Enrique Barros esquina Enfermera Gordillo. Ciudad Universitaria	
Ámbito:	Público <input checked="" type="checkbox"/> Privado <input type="checkbox"/> Otros (Especificar):	
AUTORIDAD RESPONSABLE DEL ESTABLECIMIENTO		Firma y sello de la autoridad- Fecha
Apellido y Nombre	Prof. Dra. Marta H. Fiol de Cuneo	 Prof. Dra. MARTA FIOI de CUNEO VICEDECANA FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA
Cargo	Vicedecana y Secretaria de Ciencia y Tecnología-FCM-UNC	

XI. PÓLIZA DE SEGURO <input checked="" type="checkbox"/> No aplica	
Compañía Aseguradora	
Domicilio:	
Ciudad:	
País	
Fecha de vencimiento (deber tener vigencia mayor a 15 días al momento de presentar este formulario)	___/___/20__
Póliza presenta renovación automática:	<input type="checkbox"/> Si <input checked="" type="checkbox"/> No
Período de duración de cada Renovación:	



**XII. CIEIS DONDE SE PRESENTO EL ESTUDIO**

Nombre	CIEIS Hospital Privado de Córdoba
Institución	Hospital Privado de Córdoba
Coordinador	Dr. Adrián Kahn

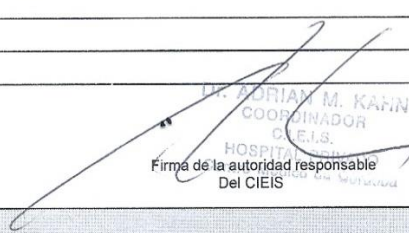
La información de este formulario tiene carácter de declaración jurada por lo que no se aceptarán inscripciones manuales ni enmiendas realizadas al mismo.

  
**JUAN DE BATTISTA**  
 MEDICO NEURÓCIRUJANO  
 M.P. 26232/7 - M.E. 17584  
 \_\_\_\_\_  
 Firma Investigador Principal      Sello      Fecha

23/11/2017

**XIII. EVALUACIÓN DEL CIEIS**

Organismo evaluador	
Resultado Evaluación	<input type="checkbox"/> Condicionada
	<input checked="" type="checkbox"/> Aprobada
	<input type="checkbox"/> Rechazada

  
 DR. ADRIAN M. KAHN  
 COORDINADOR  
 C.I.E.I.S.  
 HOSPITAL PRIVADO DE CORDOBA  
 Firma de la autoridad responsable  
 Del CIEIS      Sello      Fecha

23 NOV. 2017

**XIV. EVALUACIÓN DE COEIS**

Se Solicita Evaluación:	<input type="checkbox"/> Si <input checked="" type="checkbox"/> No
Razón:	<input type="checkbox"/> La investigación posee características nombradas en el Art. 21- Ley 9694/09 (Art. 18 Res. 22/07)
	<input type="checkbox"/> La investigación posee características nombradas en el Art.22- Ley 9694/09 (Art. 19 Res. 22/07)
	<input type="checkbox"/> Ambos

**XV. INFORME CONSEJO DE EVALUACIÓN ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SALUD COEIS (cuando corresponda)**

Resultado Evaluación	<input type="checkbox"/> Aprobado
	<input type="checkbox"/> Aprobado con recomendación
	<input type="checkbox"/> Condicionada y aprobada
	<input type="checkbox"/> Condicionada y rechazada
	<input type="checkbox"/> Rechazada
	<input type="checkbox"/> Rechazada por no cumplir condicionamiento

**Resultados de la presente Tesis fueron presentados en los siguientes eventos científicos:**

- **XII CONGRESO FASEN 2018.** “Participación de la Macroautofagia durante el desarrollo de lesiones proliferativas adenohipofisarias: Evidencias en un modelo experimental y en humanos”. Premio «Investigador Joven» Beca FASEN-CONICET 2018. Mar del Plata, Argentina. Septiembre 2018. AUTORES: Cecenarro LA, Moyano Crespo GD, Guido CB, Petiti JP, De Battista JC, Coca H, Torres AI, Mukdsi JH.



- **60ª CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ENDOCRINOLOGIA Y NUTRICIÓN (SEEN).** «Expresión de LC3 y Beclina 1, como marcadores de macroautofagia en lesiones proliferativas adenohipofisarias inducidas por estrógeno y en adenomas humanos». Bilbao, España. Octubre 2019.  
AUTORES: Cecenarro LA, Moyano Crespo GD, Guido CB, Pérez PA, Picech F, De Battista JC, Coca H, Petiti JP, Torres AI, Mukdsi JH.



## CERTIFICADO

Irene Bretón Lesmes, presidenta de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición (SEEN), Carmen Fajardo Montañana, presidenta del Comité Programa y Sonia Gaztambide Sáenz, presidenta del Comité Local del 60 Congreso de la SEEN, celebrado en Bilbao del 16 al 18 de Octubre de 2019.

CERTIFICAN que:

La comunicación científica con el título:

**EXPRESIÓN DE LC3 Y BECLINA1, COMO MARCADORES DE MACROAUTOFAGIA, EN LESIONES PROLIFERATIVAS ADENOHIPOFISARIAS INDUCIDAS POR ESTRÓGENO Y EN ADENOMAS HUMANOS**

de la que son autores:

LAURA ANAHI CECENARRO (1); GABRIELA DEISI MOYANO CRESPO (1); CAROLINA BEATRIZ GUIDO (1); PABLO ANIBAL PÉREZ (1); FLORENCIA PICECH (1); JUAN CARLOS DE BATTISTA (2); HUGO COCA (2); JUAN PABLO PETITI (1); ALICIA INÉS TORRES (1); JORGE HUMBERTO MUKDSI (1)

(1) UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA - CENTRO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA, INICSA (FCM-UNC-CONICET), CÓRDOBA, ARGENTINA, (2) HOPITAL UNIVERSITARIO PRIVADO DE CÓRDOBA S.A - SERVICIO DE NEUROCIROLOGÍA

ha sido presentada en forma COMUNICACIÓN ORAL en el 60 Congreso de la SEEN.

Y para que conste, y a los efectos oportunos, firman el presente certificado, en Bilbao a dieciocho de Octubre de dos mil diecinueve.

Irene Bretón  
Presidenta  
SEEN

Carmen Fajardo  
Presidenta  
Comité Programa

Sonia Gaztambide  
Presidenta  
Comité Local

- **XXII JORNADA ANUAL CIENTÍFICA SEMCO 2020.** «Pistas morfológicas y moleculares sobre el papel de la macroautofagia en el desarrollo de tumores adenohipofisarios». Córdoba, Argentina. Diciembre 2020. AUTORES: Cecenarro Laura A., Moyano Crespo Gabriela D., Picech Florencia, De Battista Juan C., Petiti Juan P., Torres Alicia I., Mukdsi Jorge H.

**XXII Jornada Anual Científica  
SEMCO 2020**

HOMENAJE AL DR. ANTONIO BLANCO

2 de diciembre de 2020

CERTIFICAMOS QUE  
CECENARRO LAURA A., MOYANO CRESPO GABRIELA D.,  
PICECH FLORENCIA, DE BATTISTA JUAN C., PETITI JUAN P.,  
TORRES ALICIA I., MUKDSI JORGE H.

**HAN PARTICIPADO EN CALIDAD DE PRESENTADORES DE TRABAJO CIENTÍFICO**  
Pistas morfológicas y moleculares sobre el papel de la macroautofagia  
en el desarrollo de tumores adenohipofisarios  
en la VideoConferencia de la XXII Jornada Anual Científica SEMCO,  
llevada a cabo el día 2 de diciembre de 2020

  
Dra. Cecilia Garrizo  
Vicepresidenta SEMCO

  
Dra. Milagros Nicollier  
Secretaria SEMCO

  
Dra. Patricia Dogliani  
Presidenta SEMCO

**SEMCO**  
Sociedad de Endocrinología  
y Metabolismo de Córdoba