

INDICE GENERAL

Agradecimientos	6
Índice General	8
Índice de Figuras	10
Índice de tablas	12
Abreviaciones	14
Resumen	16
Summary	19
Introducción	
- Cáncer: Antecedentes generales	23
- Cáncer de piel: Melanoma	24
- Cáncer de mama	26
- Caveolas y Caveolinas	27
- Cav-1	29
- Cav-1 como supresor de tumores	31
- Cav-1 rol dual en cáncer	34
- Cav-1 y la señalización celular	33
- Cav-1 y E-Cadherina	35

- Antecedentes preliminares del laboratorio	38
- Respuesta a proteínas mal plegadas (UPR)	39
- UPR y cáncer	42
- Vía IRE1- α y cáncer	43
- Vía PERK y cáncer	44
- Vía ATF6 y cáncer	46
- Hipótesis	49
-Objetivo general	49
- Objetivos específicos	49
Materiales y métodos	50
Resultados	69
Objetivo 1	
- Morfología celular, niveles de expresión y distribución de Cav-1 y E-Cadherina	69
- Niveles de expresión de Cadherinas	73
- Niveles basales de expresión de marcadores de UPR	75
- Rol supresor de tumores de Cav-1 en ausencia de E-Cadherina	78
-Actividad supresora de tumores de Cav-1 asociada a inhibición de UPR	79
- Inhibición de UPR por Cav-1 es independiente del volumen tumoral	88
Objetivo 2	
- Efecto de Cav-1 en estrés de RE inducido por tunicamicina	91
- Efecto de Cav-1 en estrés de RE inducido por hipoxia	96
- Hipoxia induce Co-localización de Cav-1 con marcadores de UPR	99

Objetivo 3

- Obtención de una línea celular que establemente exprese Cav-1(S80A)	101
- Obtención de la expresión de mutantes Cav-1 (S80E), (W98F) y (W128F)	103
- Respuesta de las mutantes frente a estrés inducido por tunicamicina	105
- Evaluación de la viabilidad celular de las mutantes de Cav-1	107
- Distribución de las mutantes Cav-1 (S80A) y (S80E) tratada con tunicamicina	108
- Distribución de las mutantes Cav-1 (S80A) y (S80E) expuesta a hipoxia	114

Objetivo 4

- Rol de las mutantes en la formación de tumores	118
- Rol de las mutantes en la inhibición de UPR mediada por Cav-1	121
- Efecto de las mutantes en angiogénesis	125
- Inhibición de la UPR mediada por Cav-1 es del tipo proteína-proteína	127

Discusión	125
-----------	-----

Conclusiones	143
--------------	-----

Referencias	144
-------------	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Eventos que conllevan al desarrollo del cáncer	23
Figura 2: Progresión de melanomas	25
Figura 3: Estructura de Cav-1	29
Figura 4: Niveles de Cav-1 durante la progresión de tumores	33
Figura 5: Vías de señalización moduladas por Cav-1	34
Figura 6: Vías de señalización en estrés de retículo	41
Figura 7: Dominios CBD encontrado en sensores de UPR	47

Figura 8: Ensayo de progresión de tumores	52
Figura 9: Obtención de células ex -tumor	59
Figura 10: Clasificación poblaciones celular por citometría de flujo	64
Figura 11: Mapa del plasmidio PLKO.1	67
Figura 12: Expresión de Cav-1 en células B16F10 y MDA-MB-231	71
Figura 13: Localización de Cav-1 en células B16F10 y MDA-MB-231	72
Figura 14: Las células B16F10 expresan N y P-Cadherina	74
Figura 15: Las Células B16F10 presentan niveles detectables de marcadores de UPR en condiciones basales	76
Figura 16: Las Células B16F10 presentan niveles detectables de marcadores de UPR en condiciones basales	77
Figura 17: Las Células B16F10 presentan niveles detectables de procesamiento de XBP-1 en condiciones basales	78
Figura 18: Actividad supresora de tumores de Cav-1 es independiente de E-Cadherina	79
Figura 19: Inducción de las vías de UPR durante crecimiento tumoral	80
Figura 20: Inducción en tumores de blancos de la rama de IRE1-α fue suprimida por Cav-1	82
Figura 21: Inducción en tumores de blancos de la rama de PERK fue suprimida a nivel transcripcional por Cav-1	84
Figura 22: Inducción en tumores de blancos de la rama de PERK fue suprimida a nivel proteico por Cav-1	85
Figura 23: La supresión de la vía dependiente de PERK por Cav-1 fue mantenida en células ex – tumor	88
Figura 24: La supresión de la vía de UPR dependiente de IRE1-α por Cav-1 fue mantenida en células ex –tumor	87
Figura 25: La supresión de UPR por Cav-1 es independiente del volumen tumoral	90
Figura 26: Células B16F10 responden a tunicamicina	94
Figura 27: Cav-1 retarda la activación de la rama de IRE-1α en células B16F10 y en células MDA-MB-231 tratadas con tunicamicina	95
Figura 28: Cav-1 retarda la activación de la rama de IRE-1α en células B16F10 y en células MDA-MB-231 sometidas a hipoxia	97
Figura 29: La expresión de Cav-1 reduce la viabilidad celular luego de tratamiento con tunicamicina o hipoxia	98
Figura 30: Co-localización de Cav-1 con el RE en estrés inducido por hipoxia	100

Figura 31: Expresión estable de la mutante Cav-1(S80A) en la línea celular de melanoma B16F10	102
Figura 32: Niveles de expresión de las mutantes de Cav-1 en células B16F10	103
Figura 33: Distribución intracelular de Cav-1(WT) y proteínas mutantes de Cav-1 en células B16F10	104
Figura 34: Células B16F10 que expresan Cav-1(S80A) y Cav-1(S80E) responden diferencialmente a tunicamicina en comparación con Cav-1(WT)	106
Figura 35: Células B16F10 que expresan Cav-1(S80A) y Cav-1(S80E) presentan una viabilidad mayor en comparación con Cav-1(WT)	108
Figura 36: Co-localización de Cav-1 en células B16F10(Mock) con RE luego de estrés inducido por tunicamicina	110
Figura 37: Co-localización de Cav-1(WT) en células B16F10 con RE luego de estrés inducido por tunicamicina	111
Figura 38: Co-localización de Cav-1(S80A) en células B16F10 con RE luego de estrés inducido por tunicamicina	112
Figura 39: Co-localización de Cav-1(S80A) en células B16F10 con RE luego de estrés inducido por tunicamicina	113
Figura 40: Co-localización de Cav-1(S80A) en células B16F10 con RE luego de estrés inducido por Hipoxia	115
Figura 41: Co-localización de Cav-1(S80E) en células B16F10 con RE luego de estrés inducido por Hipoxia	116
Figura 42: Determinación del grado de Co-localización de las mutantes de Cav-1 con el RE	117
Figura 43: Distintas concentraciones de IPTG son necesarias para lograr niveles de expresión similares entre las mutantes de Cav-1	119
Figura 44: El residuo de Serina 80 es importante para el rol supresor de tumores de Cav-1	120
Figura 45: El residuo de Serina 80 es importante para la inhibición de la respuesta UPR <i>in vivo</i>	122
Figura 46: Determinación de la expresión de Cav-1 en el tiempo	124
Figura 47: El residuo de Serina 80 es importante para la inhibición del factor de crecimiento vascular VEGF <i>in vivo</i>	126
Figura 48: Regulación negativa de la respuesta UPR es a través de interacciones del tipo proteína-proteína	128
Figura 49: XBP-1 precipita con Cav-1 en células HT29(ATCC Cav-1)	139

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Secuencia de partidores usado en ensayos de RT-PCR	55
Tabla 2: Secuencia de partidores usado en ensayos de qPCR	57
Tabla 3: Anticuerpos usado en ensayos de Western Blot	61