

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. CANALES IÓNICOS	8
1.2. EXCITABILIDAD Y POTENCIAL DE MEMBRANA	9
1.3. CANALES K ₂ P	11
1.3.1. <i>TWIK (Tandem of P – domains in a weak inwardly-rectifying K⁺ channel)</i>	12
1.3.2. <i>THIK (Tandem pore domain halothane-inhibited K⁺ channel)</i>	13
1.3.3. <i>TREK (TWIK-related K⁺ channel)</i>	13
1.3.4. <i>TASK (TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel)</i>	14
1.3.5. <i>TALK (TWIK-related alkaline pH activated K⁺ channel)</i>	14
1.3.6. <i>TRESK (TWIK-related spinal cord K⁺ channel)</i>	15
1.4. RELACIÓN LÍPIDOS-PROTEÍNA.....	19
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO	23
3. OBJETIVO GENERAL	23
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS	24
5.1. CULTIVO PRIMARIO DE NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO (NGC)	24
5.2. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS DESDE NEURONAS	25
5.3. WESTERN BLOT	26
5.4. INMUNOFLUORESCENCIA.....	28
5.5. COLOCALIZACIÓN	31
5.5.1. <i>Coeficientes de sobreposición de Manders (R)</i>	32
6. RESULTADOS	33
6.1. CULTIVOS DE NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO.....	33
6.2. EXPRESIÓN DE CANALES K ₂ P EN NGC.....	34
6.3. INMUNOFLUORESCENCIA DE CANALES K ₂ P EN NGC	35
6.3.1. <i>Inmunofluorescencia del canal K₂P1 con marcadores de membrana en NGC.</i> 37	
6.3.2. <i>Inmunofluorescencia del canal K₂P3 con marcadores de membrana en NGC.</i> 41	
6.3.3. <i>Inmunofluorescencia del canal K₂P9 con marcadores de membrana en NGC.</i> 45	
6.3.4. <i>Inmunofluorescencia del canal K₂P18 con marcadores de membrana en NGC...</i>	49
6.4. COMPARACIÓN DE COLOCALIZACIÓN ENTRE LOS CANALES K ₂ P Y DISTINTOS MARCADORES DE MEMBRANA	53
7. DISCUSIÓN	56

8. CONCLUSIONES	61
9. REFERENCIAS.....	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Esquema de incubación para los experimentos de inmunofluorescencia.	35
Tabla 2. Coeficientes de análisis de colocalización.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de canales de K ⁺ de acuerdo a los modelos topológicos propuestos..	9
Figura 2. Dendograma de canales K2P	16
Figura 3. Corrientes de potasio de tipo leak en NGC	19
Figura 4. Mecanismos propuestos para la regulación de canales iónicos mediante microdominios lipídicos	21
Figura 5. Caracterización de antígenos por Western blotting.	26
Figura 6. Amplificación de señal mediante inmunofluorescencia.....	29
Figura 7. Cultivo primario NGC.	33
Figura 8. Western blot representativo de K2P en NGC	34
Figura 9. Inmunofluorescencia de TWIK-1 con β -adaptina.....	38
Figura 10. Inmunofluorescencia de TWIK-1 con caveolina.....	39
Figura 11. Inmunofluorescencia de TWIK-1 con flotilina.	40
Figura 12. Inmunofluorescencia de TASK-1 con β -adaptina.	42
Figura 13. Inmunofluorescencia de TASK-1 con caveolina.	43
Figura 14. Inmunofluorescencia de TASK-1 con flotilina.	44
Figura 15. Inmunofluorescencia de TASK-3 con β -adaptina.	46
Figura 16. Inmunofluorescencia de TASK-3 con caveolina.	47
Figura 17. Inmunofluorescencia de TASK-3 con flotilina.	48
Figura 18. Inmunofluorescencia de TRESK con β -adaptina.....	50
Figura 19. Inmunofluorescencia de TRESK con caveolina.....	51
Figura 20. Inmunofluorescencia de TRESK con flotilina.....	52
Figura 21. Gráfico de colocalización de canales K2P con marcadores de membrana.....	55