



UNIVERSIDAD  
SAN SEBASTIAN

***UNIVERSIDAD SAN SEBASTIAN***

***Facultad de Ciencias de la Salud***

***Carrera de Tecnología Médica***

**Rol de los transportadores basolaterales  
NKCC1 y NBCe1 en la secreción aniónica en  
el íleon distal murino.**

**Escrito por:** Andrés Salvatierra Martinez

**Tutor:** Dr. Carlos Flores

(2025)

## **Índice**

Resumen .....	3
Abstract .....	4
Introducción.....	5
Pregunta de investigación .....	10
Objetivos .....	10
Objetivo general.....	10
Objetivos específicos .....	10
Materiales y métodos .....	10
Animales utilizados en los experimentos .....	10
Reactivos utilizados .....	11
Obtención y montaje del tejido de íleon en la cámara Ussing .....	11
Eutanasia del animal.....	11
Obtención del tejido .....	11
Setteo y montaje de la cámara Ussing.....	12
Protocolo experimental .....	13
Estadística .....	14
Resultados esperados.....	14
Resultados .....	14
Discusión.....	18
Conclusión.....	20
Carta Gantt.....	21
Bibliografía .....	22

## **Resumen**

El mucus es importante en el sistema digestivo debido a que provee un ambiente favorable para la digestión de alimentos y para la proliferación de la microbiota intestinal. Cuando la hidratación y el pH del mucus es inadecuado, se genera una disfunción del mucus, provocando problemas como meconio ileal, obstrucción en el colon, síndrome de obstrucción intestinal distal y disbiosis.

Los cotransportadores basolaterales NKCC1 y NBCe1 permiten la entrada de cloruro y de bicarbonato al enterocito, los cuales al estar acoplados al canal apical CFTR, permiten la secreción aniónica necesaria para la mantención del pH y de la hidratación del mucus. Estos transportadores se distribuyen a lo largo de las vellosidades y criptas de todo el intestino delgado, y son vitales para el mantenimiento, función y secreción del mucus.

La secreción aniónica se puede estimular mediante el uso de PGE<sub>2</sub> y carbacol, que activan vías de AMP cíclico y de calcio respectivamente. El uso de bumetanida y del inhibidor S0859 permiten inhibir actividad de NKCC1 y NBCe1 respectivamente.

En experimentos con cámara Ussing, se observó que el inhibidor S0859 no cambiaba de manera significativa la corriente, ni tampoco bloqueaba la corriente de carbacol. Sin embargo, se observó que, al utilizar bumetanida, se producía un significante bloqueo de la actividad del carbacol, atribuido al bloqueo de iones cloruro hacia el enterocito por parte de NKCC1. No se observaron cambios significativos en los experimentos con S0859, esto debido a que el aporte de bicarbonato por parte de NBCe1 es demasiado bajo, o debido a que está acoplado a procesos de secreción con transportadores electroneutros. El estudio del tejido de íleon puede ser continuado haciendo uso de ratones knockout para ser comparados con ratones wild type tratados con inhibidor.

Faltan datos sobre la distribución de la expresión de los transportadores NKCC1, NBCe1 en el epitelio del íleon murino y su co-expresión con canales apicales aniónicos como puede ser el canal CFTR.

## **Abstract**

Mucus is important in the digestive system because it provides a favorable environment for food digestion and the proliferation of the intestinal microbiota. When mucus hydration and pH are inadequate, mucus dysfunction occurs, leading to problems such as meconium ileus, colon obstruction, distal intestinal obstruction syndrome, and dysbiosis.

The basolateral cotransporters NKCC1 and NBCe1 allow the entry of chloride and bicarbonate into the enterocyte. These are coupled to the apical CFTR channel, enabling the anionic secretion necessary to maintain the mucus's pH and hydration. These transporters are distributed along the villi and crypts of the entire small intestine and are vital for mucus maintenance, function, and secretion.

Anionic secretion can be stimulated by using PGE2 and carbachol, which activate cyclic AMP and calcium pathways, respectively. The use of bumetanide and the inhibitor S0859 allows for the inhibition of NKCC1 and NBCe1 activity, respectively.

In Ussing chamber experiments, it was observed that the inhibitor S0859 did not significantly change the current, nor did it block the carbachol current. However, when bumetanide was used, a significant blockade of carbachol activity was observed, attributed to the blocking of chloride ions into the enterocyte by NKCC1. No significant changes were observed in the experiments with S0859. This is due to the contribution of bicarbonate by NBCe1 being too low, or because it is coupled to electroneutral transporter secretion processes. The study of ileal tissue can be continued using knockout mice to be compared with inhibitor-treated wild-type mice.

There is a lack of data in the expression distribution of the NKCC1 and NBCe1 transporters in the murine ileum epithelium and their co-expression with apical anionic channels such as the CFTR channel.

## Introducción

El mucus está formado por proteínas llamadas mucinas, cuya conformación es dependiente de del pH y la hidratación, de los cuales recientes estudios han demostrado que estos afectan a la función del mucus. Cuando hay una importante disminución de la secreción de bicarbonato con la consiguiente reducción del pH, el mucus en el sistema digestivo es más espeso, esto provoca que el contenido del intestino tiende a desplazarse más lento, lo cual puede ocasionar una obstrucción y, a su vez, generar disbiosis de la microbiota intestinal asociada con bacterias que favorecen la inflamación, lo cual provoca malestares intestinales. (Johansson et al., 2011; Lynch et al., 2013)

Adicionalmente, el mucus en el intestino es importante porque ofrece un ambiente favorable para la digestión y también es impermeable a las bacterias (Johansson et al., 2011). En estudios previos se ha determinado que, en el sistema digestivo, la congestión por parte del mucus puede generar problemas en el colon del intestino humano, debido a su acumulación. En el modelo murino, se han observado efectos similares en el íleon del ratón, que se asemeja al fenotipo obstructivo en el íleon del humano adulto. También se ha descrito que la presencia de iones bicarbonato es necesaria para la maduración del mucus y a la mantención de su función homeostática, lo que lleva a la conclusión que el bicarbonato es importante en el intestino, y en las vías aéreas. (Gustafsson et al., 2011, 2012)

La prostaglandina E2 ( $PGE_2$ ) proviene del ácido araquidónico, un lípido que se encuentra en la membrana fosfolipídica de las células. Dependiendo del estímulo (como, por ejemplo, daño celular), el ácido araquidónico es liberado hacia el citosol donde es modificado por las enzimas COX-1 y COX-2, dando origen a la prostaglandina H<sub>2</sub>, de la cuál, dependiendo de la enzima, dará origen a distintas prostaglandinas entre las cuales se encuentra la  $PGE_2$ . Existen 4 tipos de receptores de prostaglandina (EP1, EP2, EP3 y EP4), de los cuales, cada uno activa una vía de señalización distinta. EP2 y EP4 tienen mayor afinidad por la  $PGE_2$ , a comparación con EP1 y EP4. Los receptores EP2 y EP4 ambos coinciden

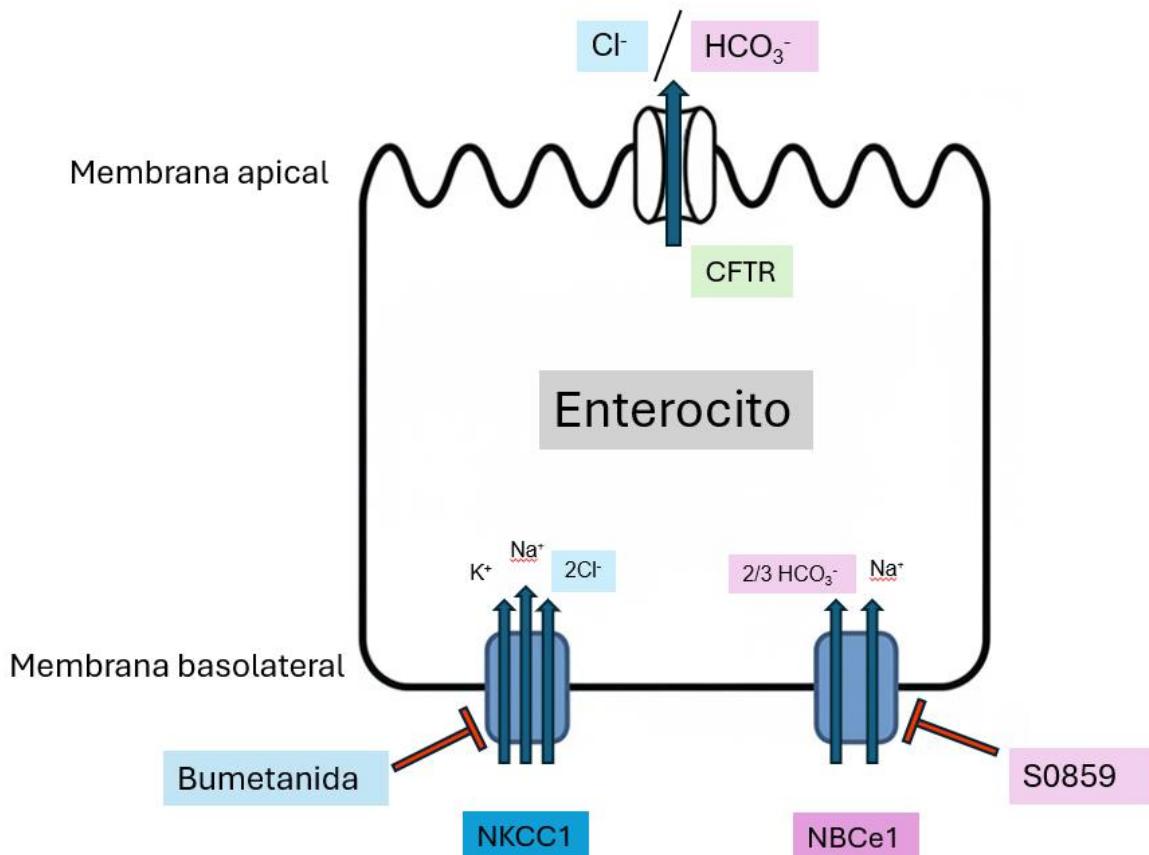
en la activación de la enzima adenilato ciclase, la cual provocará un aumento de AMP cíclico dentro de la célula, que activará la proteína kinasa A (PKA), que permitirá la fosforilación y posterior activación del canal regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), permitiendo entonces la salida de cloruro y bicarbonato. (Irie et al., 1993; An et al., 2021; Ghigo et al., 2023)

El carbacol es un agonista colinérgico que activa los receptores muscarínicos. Estos receptores son acoplados a proteínas G, que, al ser activados, inducen un aumento de inositol trifosfato, el cual provoca un aumento de liberación de calcio intracelular por parte del retículo endoplasmático. El calcio es capaz de activar isoformas de la enzima adenilato ciclase y, por consiguiente, el aumento de AMP cíclico y de PKA. A su vez, es capaz de activar un complejo de proteínas denominado Pyx/Src, que tiene la capacidad de fosforilar el canal CFTR para inducir su actividad (Billet y Hanrahan, 2013). Adicionalmente, el carbacol es capaz de modular la actividad de la familia de los transportadores de membrana NBC, responsables del movimiento de iones de sodio y de bicarbonato. (Yang et al., 2010)

Existe un grupo de transportadores de la familia SLC4, entre los cuáles se encuentra el cotransportador NBCe1 o SLC4A4 (transportador de sodio y bicarbonato electrogénico), que tiene como función el cotransporte de sodio e iones bicarbonato, y que se encuentran ubicados en la membrana basolateral de células epiteliales (**Figura 1**), como las del intestino y las vías aéreas. La actividad de NBCe1 se acopla a transportadores de la membrana apical como lo es el canal CFTR para la secreción de iones bicarbonato, por lo que juega un rol en el mantenimiento en la integridad de la mucosa (Gustafsson et al., 2012; Husain et al., 2025). Se ha demostrado también que el transportador NBCe1 es importante en la secreción de bicarbonato en las vías aéreas, ya que su excreción es disminuida al utilizar el inhibidor S0859, y también al silenciar el gen SLC4A4. (Saint-Criq et al., 2022)

En el intestino, la salida de cloruro en la membrana apical está mediada por transporte transcelular, principalmente protagonizado por CFTR, mientras que la entrada de cloruro en la membrana basolateral es producto de la actividad del cotransportador  $K^+-Na^+2Cl^-$  (NKCC1), por lo que el transporte y secreción de fluidos es también regulado de manera indirecta por NKCC1 (Reynolds et al., 2007). También se ha encontrado que NKCC1 se encuentra altamente expresado en las células goblet, las células encargadas de la producción y liberación de mucinas, y, además, se ha encontrado que la inhibición de NKCC1 con bumetanida reduce la estimulación en la secreción de moco por parte de la PGE<sub>2</sub> y la serotonina (5-HT), lo que sugiere un rol de NKCC1 en la hidratación del mucus intestinal. (Garcia et al., 2009; Jakab et al., 2010)

Se sabe también que los transportadores NKCC1 y NBCe1 están distribuidos en las vellosidades y las criptas a lo largo de todo el intestino, tanto en humanos como en ratones. Además, se ha observado al transportador NBCe1 en el lado basolateral de la membrana de los enterocitos. Aunque cabe destacar que NBCe1 no se encuentra expresado en las células goblet a comparación de NKCC1, el cuál es el transportador que se expresa más en este tipo de células (Jakab et al., 2010). Se ha encontrado que la disfunción de NBCe1 está asociado al mal funcionamiento de la barrera mucosa en el colon debido a la disminución de la secreción de bicarbonato acoplado a CFTR, lo que lo asocia directamente con patologías como la colitis ulcerosa, que se caracteriza por inflamación del intestino, disfunción de la barrera mucosa y disbiosis de la microbiota. (He et al., 2025)



**Figura 1. Representación esquemática de un enterocito.** En el enterocito, el transportador basolateral NKCC1 transporta K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> y 2Cl<sup>-</sup> hacia el interior del enterocito y es inhibido por bumetanida, mientras que el transportador basolateral NBCe1 ingresa Na<sup>+</sup> y 2 iones de bicarbonato (o 3 iones de bicarbonato, dependiendo de la estequiometría de la proteína) hacia el interior de la célula y es inhibido por S0859. Ambos transportadores están acoplados a CFTR como parte de la secreción aniónica apical.

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad multisistémica que, cuyos efectos a nivel del sistema respiratorio han sido los más estudiados debido a su mortalidad y morbilidad. Este es generado por la disfunción del canal CFTR cuyo papel es el transporte de los iones cloruro y bicarbonato en la membrana apical de las células, el cual mantiene el mucus del tejido respiratorio hidratado. Una de las complicaciones más estudiadas tiene que ver con el sistema digestivo, especialmente en pacientes pediátricos, donde en ellos se manifiesta principalmente con problemas de absorción y obstrucción intestinal, como lo es el

meconio ileal (Zuloaga et al., 2021), y el síndrome de obstrucción intestinal distal en adultos con FQ. (Gustafsson et al., 2012)

En trabajos anteriores, se ha estudiado el mucus de ratones con la mutación DF508, donde se ha encontrado que el fenotipo del mucus en tejido del íleon del ratón con FQ es más denso y difícil de remover comparado con sus hermanos normales. Este fenotipo pudo ser replicado al inhibir la secreción de iones bicarbonato en ratones normales y luego restituido por la adición de iones bicarbonato, normalizando la mayor parte de las propiedades del mucus alterado, lo que sugiere que la función del mucus depende del suministro de bicarbonato por parte de los transportadores basolaterales de las células (Gustafsson et al., 2012).

La evidencia indica que la presencia de bicarbonato puede restaurar la función del mucus intestinal, (Gustafsson et al., 2012), y que la secreción de cloruro y bicarbonato por parte de CFTR influyen en la secreción de moco (Jakab et al., 2010; Gustafsson et al., 2012). Todos estos estudios están mayormente descritos en tejidos de duodeno, yeyuno, colon y en el ciego, en caso de modelos murinos. Aún faltan más estudios por comprender el impacto que tienen los transportadores basales en la secreción de aniones y, por consiguiente, en la mantención de la función normal del mucus, específicamente en el íleon, esta zona siendo de importancia debido a que es en esta zona donde se generan obstrucciones tanto en infantes como en adultos. Es importante también tener una visión completa de la sinergia entre los transportadores basolaterales y apicales para poder generar un modelo definitivo que pueda explicar las patologías que involucran el movimiento aniónico y la función del mucus, que sucede tanto en enfermedades inflamatorias como en FQ. Finalmente, evaluar la respuesta de los agonistas PGE<sub>2</sub> y carbacol en el tejido del íleon abre las puertas a la búsqueda de terapias dirigidas a la restauración de mucus, usando como estrategia la estimulación de los transportadores mediante vías de señalización colinérgicas para favorecer la secreción aniónica y así, restaurar la función del mucus.

## **Pregunta de investigación**

¿Cuál es el aporte de aniones otorgados por NBCe1 y NKCC1 en la secreción luminal de cloruro y bicarbonato estimulado por PGE<sub>2</sub> y carbacol?

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Medir la actividad de los canales iónicos a partir de la medición de la corriente corto circuito ( $I_{sc}$ ) de un tejido de íleon distal murino en cámara Ussing.

### **Objetivos específicos**

- 1) Obtener tejido del íleon distal de ratones wild type, y montarlo en un sistema de cámara Ussing, previo a la remoción de la capa seromuscular externa.
- 2) Medir la  $I_{sc}$  al agregar sustancias que estimulan la secreción aniónica mediante AMP cíclico y calcio, usando PGE<sub>2</sub> y carbacol respectivamente.
- 3) Medir y comparar la  $I_{sc}$  restante al añadir carbacol tras el uso de un inhibidor de NKCC1 o NBCe1, siendo bumetanida y S0859 respectivamente.

## **Materiales y métodos**

### **Animales utilizados en los experimentos**

Los tejidos obtenidos provienen de ratones de la cepa C57BL/6J de la marca “The Jackson Laboratories”, conocidos comúnmente como ratones B6, en condiciones de Specific Pathogen Free (SPF) del Centro de Estudios Científicos (CECs) ubicado en Valdivia, región de Los Ríos, a temperatura ambiente (20-26 °C). Los experimentos cuentan con aprobación del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales del CECs, y hechos previamente a un curso de manejo de animales proporcionado y certificado por el CECs.

## **Reactivos utilizados**

Solución Ussing: CaCl<sub>2</sub> 1,2 mM (CAS 10043-52-4), MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O 1,2 mM (CAS 7791-18-6), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*3H<sub>2</sub>O 0,8 mM (CAS 16788-57-1), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,3 mM (CAS 7778-77-0), NaHCO<sub>3</sub> 25 mM (CAS 144-55-8), NaCl 120 mM (CAS 7647-14-5). Solo para la membrana basolateral, se usó D-(+)-Glucosa 10mM (CAS 50-99-7).

Inhibidores y agonistas: Bumetanida (CAS 28395-03-1), Prostaglandina E<sub>2</sub> (CAS 363-24-6), S0859 (CAS 1019331-10-2), Carbacol (CAS 51-83-2).

## **Obtención y montaje del tejido de íleon en la cámara Ussing**

### **Eutanasia del animal**

Para la eutanasia de los ratones, se inició utilizando isoflurano como anestésico inhalatorio, del cual se depositaron 200 µL del anestésico en un filtro dentro una cámara de inducción durante 5 minutos. Posteriormente, se aplicó presión interdigital y al extremo de la cola del ratón para comprobar la efectividad de la anestesia. Una vez comprobado, se posicionó al ratón en decúbito dorsal y se realizó una incisión longitudinal desde el abdomen hasta el tórax con el fin de exponer los órganos peritoneales. Se puncionó el diafragma y luego se realizó exanguinación a través de un corte en la vena cava inferior. Una vez terminada la eutanasia se procedió a la obtención del tejido.

### **Obtención del tejido**

Para obtener el tejido, se separó el intestino del mesenterio y se realizó un corte en la zona donde se une el íleon con el ciego. Luego, se realizó otro corte para la obtención de 10cm de íleon, el cual se sumergió en una solución de PBS 1X. De este trozo de íleon, se cortó una porción de entre 1cm – 1,5cm de largo, que se ubicó en una placa Petri con silicona Sylgard, que junto con una lupa estereoscópica, se utilizó para la remoción de la capa seromuscular externa del lado basal del intestino mediante la técnica de “blunt dissection”, que consiste en el corte transversal del tejido con un objeto desafilado (en este caso, un bisturí con una hoja desgastada), para poder separar las capas y así remover selectivamente la capa muscular. De este modo, se obtiene acceso a los transportadores

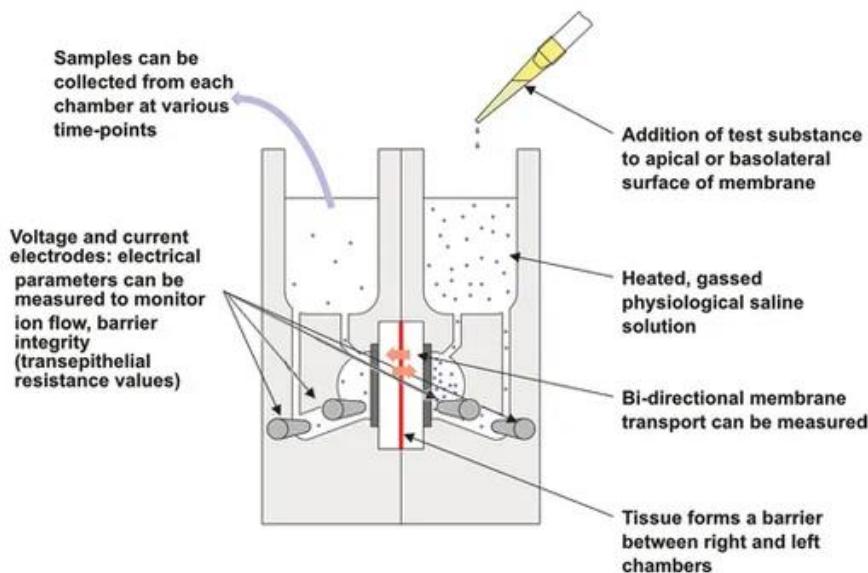
basolaterales que queremos estudiar y además reduce la influencia del sistema neuromuscular en las mediciones. (Clarke, 2009)

### **Seteo y montaje de la cámara Ussing**

Antes de realizar la eutanasia y obtención del tejido, se setteó la cámara Ussing para eliminar los errores que se producen al medir parámetros eléctricos, de los cuáles el fluido y la temperatura pueden influir en gran medida. Para ello, se encendió el Clamp de corriente/voltaje junto con un baño maría a 37° grados y se dejó al menos 20 minutos para que se estabilicen los equipos. Durante estos minutos, se montó la cámara Ussing, colocando y conectando los electrodos de corriente y voltaje, y se montó un slider P2302 sin tejido para el seteo, y se llenó la cámara Ussing con 8 mL de solución Ussing, el cuál es una solución tipo Ringer carbonatada para proveer los iones a la muestra.

Una vez pasados los 20 minutos, se procedió a nulificar la diferencia de voltaje utilizando un offset, y posterior a ello se compensó la resistencia del fluido. Finalmente, se deja el clamp de voltaje/corriente en closed hasta el montaje del tejido. En este punto es cuando se realiza la obtención del tejido. (Clarke, 2009)

Una vez obtenido el tejido, este se montó en un slider P2303 (área de exposición 0,1 cm<sup>2</sup>), en donde la membrana basolateral del tejido está orientado mirando hacia la mitad de color blanco del slider. Se desconectaron los electrodos, se descartó la solución Ussing, y se insertó el slider en la cámara Ussing con la membrana basolateral mirando hacia la derecha (**Figura 2**), luego se adicionó solución Ussing fresca, 4mL en cada lado de la cámara. De manera inmediata, se provee de carbógeno a la cámara entera (95% O<sub>2</sub> / 5% Co<sub>2</sub>) y además se añadió 10 mM de glucosa en basolateral. Finalmente, se conectaron los electrodos y se configuró el Clamp voltaje/corriente en “open”, en donde se visualizó en el programa Acquire and Analize 2.3 (AA 2.3) que el voltaje tuviera un valor negativo y la resistencia con un valor idealmente de >45-50 Ohms, para comprobar que el tejido era ideal para el experimento.



**Figura 2. Representación esquemática de una cámara Ussing.** Se añadió en la membrana basolateral 10mM de glucosa para otorgar al tejido una fuente de energía. Para los experimentos, se utilizó en basolateral: 10  $\mu\text{M}$  de PGE<sub>2</sub>, 30  $\mu\text{M}$  de bumetanida, 50  $\mu\text{M}$  de S0859 y 100  $\mu\text{M}$  de carbacol según el protocolo. Adaptado de *Physiologic Instruments Ussing Chambers*. (n.d.). Retrieved November 27, 2025, from <https://physiologicinstruments.com/collections/ussing-chamber-systems>

## Protocolo experimental

Al iniciar el experimento, se visualizó en todo momento la corriente corto circuito calculada ( $I_{sc}$ ) en tiempo real en el programa AA 2.3. Antes de comenzar el protocolo, se esperó que el tejido y los parámetros se estabilizaran durante al menos 5 minutos después de haber agregado la glucosa. De ser posible, se trabajaron 2 tejidos en paralelo, idealmente uno siendo un tejido control y el otro un tejido siendo tratado con un inhibidor.

Cuando la  $I_{sc}$  se encontró estable, se procedió a agregar PGE<sub>2</sub> 10  $\mu\text{M}$  basolateral a ambos tejidos y se esperaron 5 minutos. Luego, en basolateral se adicionó 1 de 2 de los inhibidores, los cuales eran S0859 30  $\mu\text{M}$  o bumetanida 50  $\mu\text{M}$  dependiendo del experimento, mientras que al grupo control no se le adicionó nada, y se esperaron 5 minutos. Finalmente, a ambos tejidos se les añadió carbacol 100  $\mu\text{M}$  basolateral y se esperaron al menos 5 minutos antes de terminar el experimento.

De este modo, se originaron 3 grupos de experimentos: un grupo control, un grupo al que se le añadió bumetanida (inhibidor de NKCC1), y un grupo al que se le añadió S0859 (Inhibidor de NBCe1).

### **Estadística**

Los datos están representados como la media ( $\bar{x}$ ) ± el error estándar (SEM).  $n$  indica cada tejido utilizado de manera individual. Se utilizó Wilcoxon Signed Ranked test para comparar muestras antes y después de un tratamiento y para sus controles. Se utilizó One Way ANOVA para comparar múltiples grupos de datos antes y después de un tratamiento respecto de un grupo control. Valores  $P < 0,05$  fueron considerados significativos (\* $P < 0,005$ ).

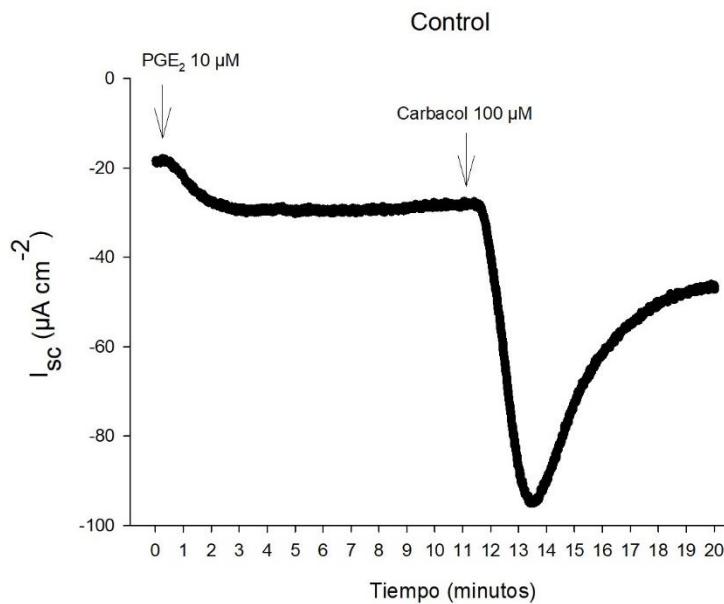
### **Resultados esperados**

Los resultados esperados de los experimentos constan en que, al agregar PGE<sub>2</sub>, se estimulará la secreción de aniones por parte de CFTR mediante la activación de la vía de AMP cíclico. Posteriormente, en los controles, al agregar carbachol, habrá un incremento de la traslocación de CFTR hacia la membrana apical por lo que la salida de aniones debería aumentar nuevamente. En cuanto al uso de inhibidores, se espera que haya 2 resultados posibles: uno siendo la inhibición del efecto estimulador del carbachol por parte del inhibidor, o, por otra parte, que no se observe ninguna diferencia significativa en la  $I_{sc}$ .

### **Resultados**

En los experimentos realizados en cámara Ussing se puede observar en el grupo control que al añadir PGE<sub>2</sub> aumenta la secreción aniónica a través de la estimulación de los receptores EP2 y EP4, que da como resultado el aumento de AMP cíclico, el que se traduce en un aumento de la  $I_{sc}$  negativa hasta que alcanza una señal estable. Posteriormente, al añadir carbachol, la secreción aniónica aumenta nuevamente debido al estímulo de los receptores muscarínicos, el que tiene como consecuencia la liberación de calcio por parte del retículo endoplasmático. Este calcio actúa como segundo mensajero para la activación de la enzima adenilato ciclase, que da origen al aumento de AMP cíclico que da como

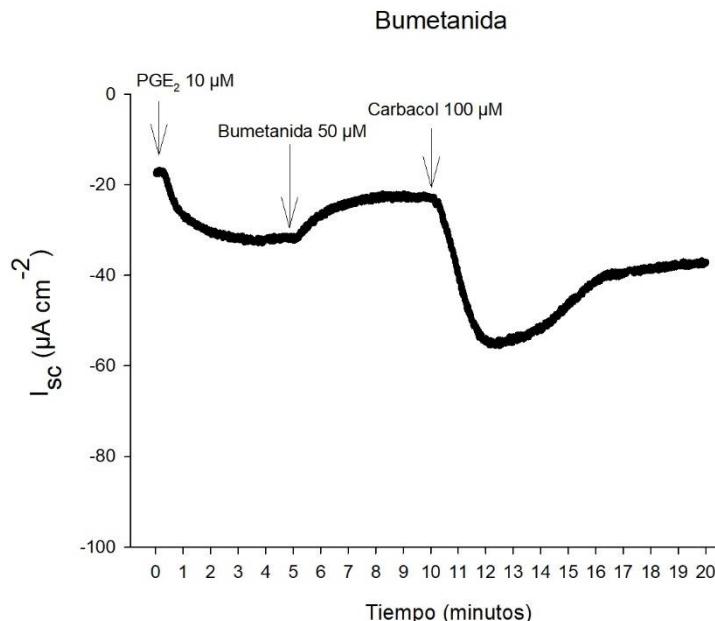
resultado el aumento de la  $I_{sc}$  (**Figura 3**). Se calculó la diferencia entre la  $I_{sc}$  resultante a los 5 minutos y a los 10 minutos tras añadir PGE<sub>2</sub>, y la  $I_{sc}$  basal respectivamente. Estos datos fueron graficados y utilizados como control para su comparación con los grupos tratados con inhibidor ( $P = 0.172$ ) (**Figura 6**). Se calculó el área debajo de la curva de los primeros 2 minutos tras añadir carbachol, el cual se comparará con los grupos tratados con inhibidor (**Figura 7**).



**Figura 3.** Traza representativa de la  $I_{sc}$  en el ileon del ratón estimulado con PGE<sub>2</sub> 10  $\mu\text{M}$  y carbacol 100  $\mu\text{M}$  que corresponde al grupo control ( $n = 7$ ).

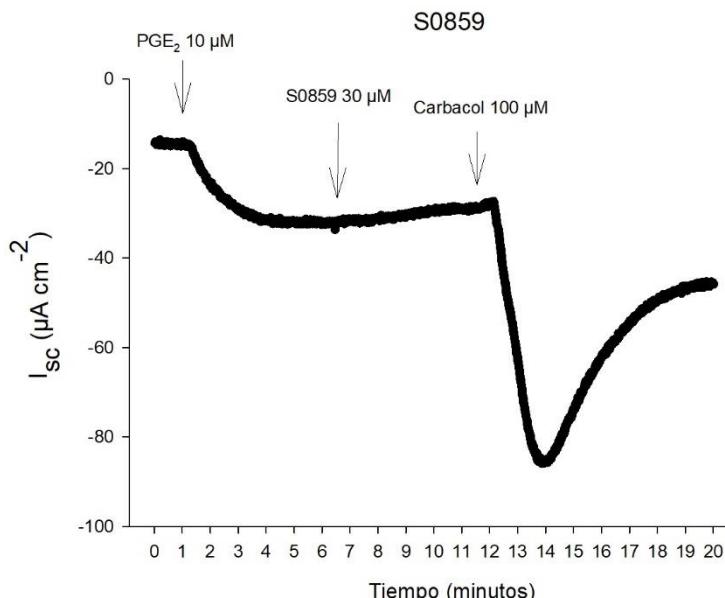
En el grupo que se destinó al tratamiento con bumetanida, al agregar PGE<sub>2</sub> se observó el aumento de secreción aniónica por vía de AMP cíclico. Luego de la estabilización de la  $I_{sc}$ , se añadió bumetanida, y se observó una inhibición de la  $I_{sc}$  inducida por PGE<sub>2</sub> debido a la disminución de la entrada de cloruro hacia el enterocito desde NKCC1. Finalmente, tras la estabilización de la  $I_{sc}$ , se agregó carbachol, donde se observó nuevamente secreción iónica esta vez mediada por calcio intracelular en respuesta a la activación de los receptores muscarínicos por parte del carbachol (**Figura 4**). Se calculó la diferencia entre la  $I_{sc}$  estable tras añadir PGE<sub>2</sub> y tras añadir bumetanida, y la  $I_{sc}$  basal respectivamente (**Figura 6**), y se observó una considerable diferencia entre las señales ( $P = 0.000847$ ). Al igual que el grupo control, se calculó el área bajo la curva de los primeros 2 minutos

después de añadir bumetanida (**Figura 7**), y se observó que la respuesta del carbachol era significativamente menor en comparación al grupo control ( $P = 0,004$ ).

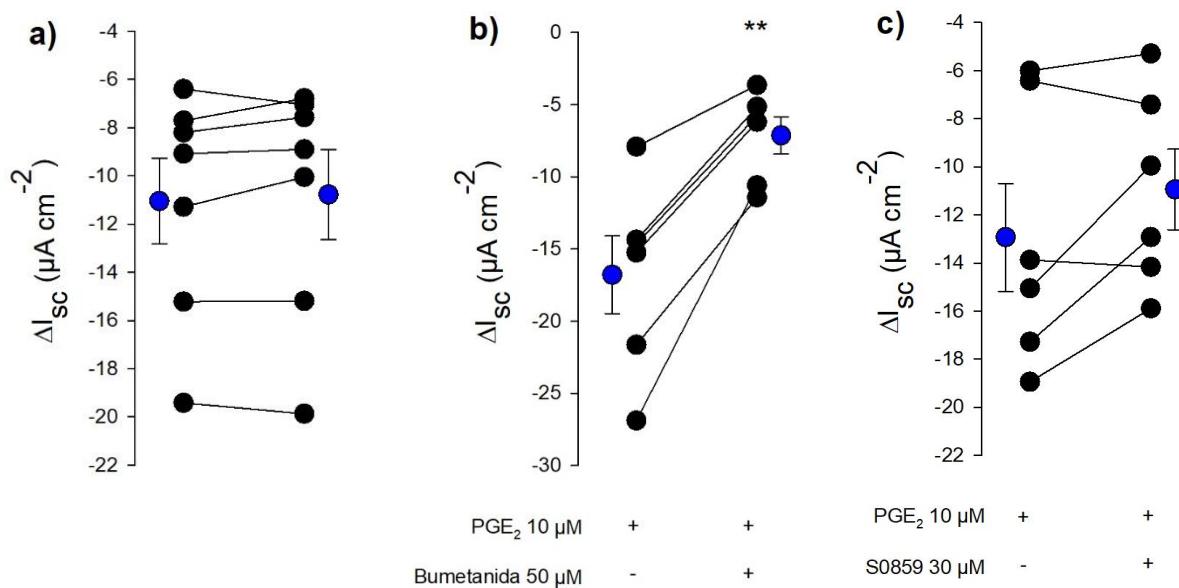


**Figura 4.** Traza representativa de la  $I_{sc}$  en el ileon del ratón estimulado con  $\text{PGE}_2$  10  $\mu\text{M}$ , bumetanida 50  $\mu\text{M}$  y carbachol 100  $\mu\text{M}$  que corresponde al grupo tratado con bumetanida ( $n = 6$ ).

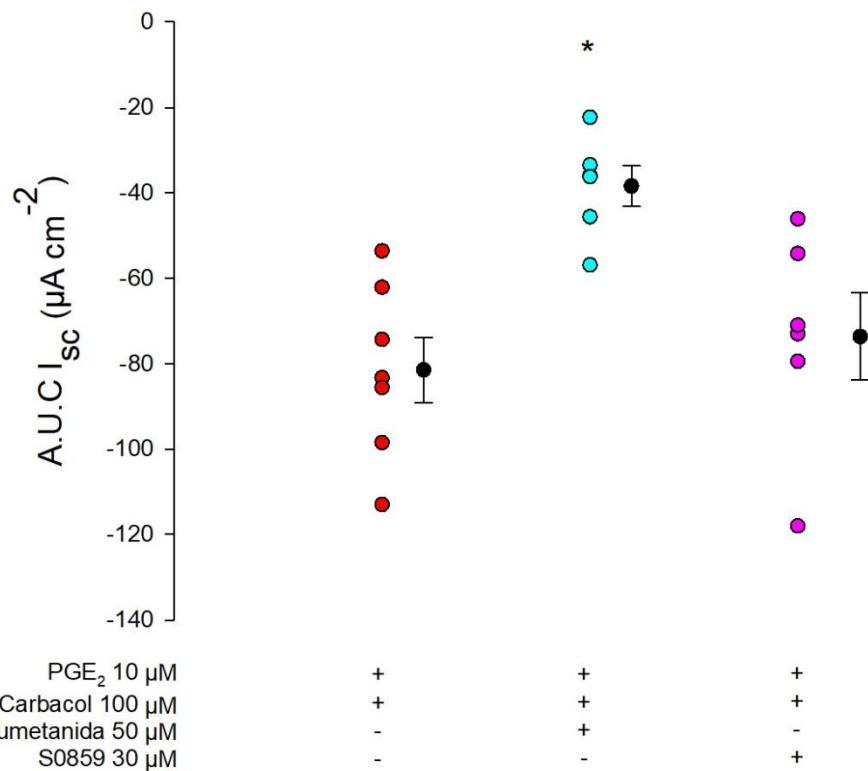
Similar al grupo control, en el tejido que fué tratado con S0859 se observa que al agregar  $\text{PGE}_2$ , aumenta la secreción aniónica dependiente de AMP cíclico. Tras la estabilización de la señal, se agregó el inhibidor S0859, el cual no provocó diferencias significativas de la  $I_{sc}$ . Finalmente, al agregar carbachol, se produce el aumento de la secreción aniónica por la vía de la activación de los receptores muscarínicos (**Figura 5**). Se calculó la diferencia entre la  $I_{sc}$  estable tras añadir  $\text{PGE}_2$  y tras añadir S0859, y la  $I_{sc}$  basal respectivamente, (**Figura 6**) que comparados al grupo control, no se observaron cambios significativos en la señal ( $P = 0.0563$ ). Finalmente, se calculó el área debajo de la curva de los primeros 2 minutos tras añadir S0859, y se concluyó que no hay diferencias significativas en la respuesta al carbachol respecto del control ( $P = 0.0563$ ) (**Figura 7**).



**Figura 5.** Traza representativa de la  $I_{sc}$  en el ileon del ratón estimulado con  $PGE_2$  10  $\mu M$ , S0859 30  $\mu M$  y carbachol 100  $\mu M$  que corresponde al grupo tratado con S0859 ( $n = 6$ ).



**Figura 6. Cuantificación de la diferencia de  $I_{sc}$  antes y después del tratamiento con un inhibidor.** (a) es el grupo control, las columnas corresponden a la diferencia entre la  $I_{sc}$  resultante a los 5 minutos y a los 10 minutos tras añadir  $PGE_2$ , y la  $I_{sc}$  basal respectivamente. (b) y (c) son los grupos tratados con bumetanida o S0859 respectivamente. Las columnas corresponden a la diferencia entre la  $I_{sc}$  estable tras añadir  $PGE_2$  y tras añadir uno de los inhibidores, y la  $I_{sc}$  basal respectivamente. ( $n = 7$ , grupo control;  $n = 6$ , grupo bumetanida;  $n = 6$ , grupo S0859). \* $P < 0,005$ .



**Figura 7. Respuesta del carbacol tras el uso de un inhibidor, correspondiente al cálculo del área bajo la curva (A.U.C) de la  $I_{sc}$  resultante.** La primera columna representa el grupo control ( $n = 7$ ). La segunda columna representa la respuesta del carbacol tras añadir bumetanida ( $n = 6$ ). La tercera columna representa la respuesta del carbacol tras añadir S0859 ( $n = 6$ ). \* $P < 0,005$ .

## Discusión

Basado en los resultados anteriores, es evidente el aumento de la  $I_{sc}$  debidos a los agonistas PGE<sub>2</sub> y carbacol, pues ambos son conocidos activadores del canal CFTR, por lo que se observa finalmente la secreción de iones cloruro y bicarbonato hacia la zona luminal (Grubb y Gabriel, 1997). Al agregar S0859, no hay cambios significativos en la  $I_{sc}$ . No obstante, al agregar bumetanida, se observa una disminución de la respuesta significativa de la  $I_{sc}$  y, por otra parte, se observa un bloqueo en la  $I_{sc}$  resultante al añadir carbacol tras el tratamiento del tejido con bumetanida, ambas explicadas por el impedimento de la entrada de cloruro hacia el interior del enterocito, ya que el canal NKCC1 es una gran fuente de entrada de cloruro hacia el enterocito (Grubb et al, 2000). Esto implicaría que la secreción de cloruro sería menor y, por consiguiente, la secreción de fluidos y de mucus se vería disminuida. (Garcia et al., 2009; Jakab et al., 2010)

Por otra parte, no hay una diferencia significativa en la  $I_{sc}$  al añadir carbacol tras el tratamiento con S0859, las  $I_{sc}$  resultantes se asemejan a las  $I_{sc}$  del grupo control, lo cual podría implicar que el aporte de  $I_{sc}$  aniónica por parte de NBCe1 es bajo, o está acoplado a vías de transporte electroneutro.

En modelos knockout de NKCC1 murino, Se ha demostrado en tejido de yeyuno que la  $I_{sc}$  es dependiente en mayor parte del cloruro, ya que se observó insensibilidad a la respuesta de forskolina al utilizar bumetanida (Grubb et al, 2000). Cabe destacar que la forskolina, a diferencia del carbacol, activa la secreción aniónica mediante AMP cíclico, lo cual indica que la inhibición de la secreción aniónica por parte de la bumetanida es independiente de si la vía activada es dependiente de AMP cíclico o de calcio, considerando que el presente estudio fue hecho con tejido de íleon. En cuanto a NBCe1, se ha observado en ratones knockout del gen SLC4A4 genera una deficiencia en la secreción de cloruro, pero no de bicarbonato (Yu et al., 2016), que se correlaciona con lo observado en los experimentos, pues la obtención de bicarbonato por parte de la célula está mediada también a través de otras vías, lo que explica por qué al usar el inhibidor S0859 no se observa un cambio notable en la  $I_{sc}$ , sin embargo, estos experimentos fueron hechos en ratones recién nacidos. Por otra parte, en estudios de secreción de fluidos realizados con ratones CF con la mutación  $\Delta F508$ , se concluyó que la secreción y funcionamiento del mucus es dependiente de bicarbonato y del canal CFTR (Garcia et al., 2009), por lo que se destaca la importancia de realizar más estudios en ratones knockout SLC4A4 o ratones con la mutación  $\Delta F508$ .

Una de las limitaciones del estudio es que en la cámara de Ussing solo se puede medir la  $I_{sc}$  transepitelial y el transporte de carácter electrogénico (Clarke, 2009), y, por lo tanto, la única manera de evaluar la actividad de transportadores electroneutros es de manera indirecta, al medir su actividad cuando están acoplado a otros transportadores y canales de membrana. Debido a esto, el estudio del tejido de íleon puede ser continuado haciendo uso de ratones knockout

con tal de compararlos con los resultados obtenidos con los ratones wild type tratados con inhibidor.

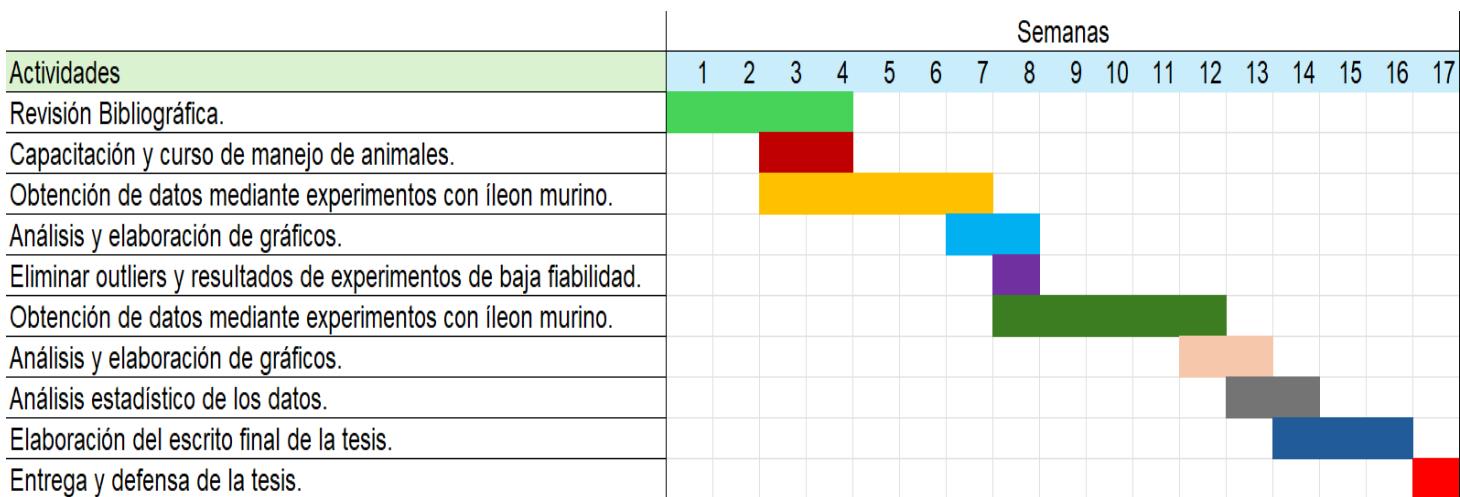
### **Conclusión**

En el presente estudio, se ha logrado observar gracias a los experimentos con cámara de Ussing que la bumetanida es capaz de prevenir de manera significativa la respuesta del tejido del íleon murino al carbacol, debido al impedimento de la entrada de cloruro hacia el enterocito desde la membrana basolateral por parte de NKCC1.

En cuanto a la secreción de bicarbonato acoplado a NBCe1, parece ser mediada por transportes electroneutros que no son posibles de medir con la técnica de cámara Ussing usados en los presentes experimentos, o en su defecto, el aporte aniónico es demasiado bajo para generar un efecto significativo.

Los datos indican que NKCC1 está acoplado a CFTR para la salida de cloruro, pero no se puede demostrar de manera certera que NBCe1 está acoplado a CFTR debido a que no se conoce la distribución de la expresión de estos transportadores en el epitelio del íleon murino y su co-expresión con canales apicales aniónicos como puede ser el canal CFTR.

## **Carta Gantt**



## **Bibliografía**

An, Y., Yao, J., & Niu, X. (2021). The Signaling Pathway of PGE2 and Its Regulatory Role in T Cell Differentiation. *Mediators of Inflammation*, 2021, 9087816. <https://doi.org/10.1155/2021/9087816>

Billet, A., & Hanrahan, J. W. (2013). The secret life of CFTR as a calcium-activated chloride channel. *The Journal of Physiology*, 591(Pt 21), 5273. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2013.261909>

Clarke, L. L. (2009). A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296(6), G1151. <https://doi.org/10.1152/AJPGI.90649.2008>

Damkier, H. H., Nielsen, S., & Praetorius, J. (2007). Molecular expression of SLC4-derived Na<sup>+</sup>-dependent anion transporters in selected human tissues. <Https://Doi.Org/10.1152/Ajpregu.00356.2007>, 293(5), 2136–2146. <https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00356.2007>

Garcia, M. A. S., Yang, N., & Quinton, P. M. (2009). Normal mouse intestinal mucus release requires cystic fibrosis transmembrane regulator-dependent bicarbonate secretion. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(9), 2613. <https://doi.org/10.1172/JCI38662>

Ghigo, A., de Santi, C., Hart, M., Mitash, N., & Swiatecka-Urban, A. (2023). Cell signaling and regulation of CFTR expression in cystic fibrosis cells in the era of high efficiency modulator therapy. *Journal of Cystic Fibrosis*, 22, S12–S16. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2022.12.015>

Grubb, B. R., & Gabriel, S. E. (1997). Intestinal physiology and pathology in gene-targeted mouse models of cystic fibrosis. *The American Journal of Physiology*, 273(2 Pt 1). <https://doi.org/10.1152/AJPGI.1997.273.2.G258>

Grubb, B. R., Lee, E., Pace, A. J., Koller, B. H., & Boucher, R. C. (2000). Intestinal ion transport in NKCC1-deficient mice. *American Journal of Physiology*.

*Gastrointestinal and Liver Physiology*, 279(4).

<https://doi.org/10.1152/AJPGI.2000.279.4.G707>

Gustafsson, J. K., Ermund, A., Johansson, M. E. V., Schütte, A., Hansson, G. C., & Sjövall, H. (2011). An ex vivo method for studying mucus formation, properties, and thickness in human colonic biopsies and mouse small and large intestinal explants. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 302(4), G430. <https://doi.org/10.1152/AJPGI.00405.2011>

Gustafsson, J. K., Ermund, A., Ambort, D., Johansson, M. E. V., Nilsson, H. E., Thorell, K., Hebert, H., Sjövall, H., & Hansson, G. C. (2012). Bicarbonate and functional CFTR channel are required for proper mucin secretion and link cystic fibrosis with its mucus phenotype. *Journal of Experimental Medicine*, 209(7), 1263–1272. <https://doi.org/10.1084/JEM.20120562>

He, J., Wu, J., Tan, J., Yang, P., Bai, T., Song, J., Hou, X., & Zhang, L. (2025). Role of declined electrogenic Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter NBCe1 in mucus barrier impairment and colonic inflammation. *International Immunopharmacology*, 150, 114282. <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2025.114282>

Husain, N., Kumar, A., Anbazhagan, A. N., Gill, R. K., & Dudeja, P. K. (2025). Intestinal Luminal Anion Transporters and their Interplay with Gut Microbiome and Inflammation. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 328(5), C1455. <https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00026.2025>

Irie, A., Sugimoro, Y., Namba, T., Harazono, A., Honda, A., Watabe, A., Negishi, M., Narumiya, S., & Ichikawa, A. (1993). Third isoform of the prostaglandin-E-receptor EP3 subtype with different C-terminal tail coupling to both stimulation and inhibition of adenylate cyclase. *European Journal of Biochemistry*, 217(1), 313–318. <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1993.TB18248.X>

Jakab, R. L., Collaco, A. M., & Ameen, N. A. (2010). Physiological relevance of cell-specific distribution patterns of CFTR, NKCC1, NBCe1, and NHE3 along the crypt-villus axis in the intestine. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 300(1), G82. <https://doi.org/10.1152/AJPGI.00245.2010>

Johansson, M. E. V., Ambort, D., Pelaseyed, T., Schütte, A., Gustafsson, J. K., Ermund, A., Subramani, D. B., Holmén-Larsson, J. M., Thomsson, K. A., Bergström, J. H., van der Post, S., Rodriguez-Piñeiro, A. M., Sjövall, H., Bäckström, M., & Hansson, G. C. (2011). Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMS*, 68(22), 3635. <https://doi.org/10.1007/S00018-011-0822-3>

Lynch, S. v., Goldfarb, K. C., Wild, Y. K., Kong, W., de Lisle, R. C., & Brodie, E. L. (2013). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator knockout mice exhibit aberrant gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes*, 4(1). <https://doi.org/10.4161/GMIC.22430>

*Physiologic Instruments Ussing Chambers*. (n.d.). Retrieved November 27, 2025, from <https://physiologicinstruments.com/collections/ussing-chamber-systems>

Reynolds, A., Parris, A., Evans, L. A., Lindqvist, S., Sharp, P., Lewis, M., Tighe, R., & Williams, M. R. (2007). Dynamic and differential regulation of NKCC1 by calcium and cAMP in the native human colonic epithelium. *The Journal of Physiology*, 582(Pt 2), 507. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2007.129718>

Saint-Criq, V., Guequén, A., Philp, A., Villanueva, S., Apablaza, T., Fernández-Moncada, I., Mansilla, A., Delpiano, L., Ruminot, I., Carrasco, C., Gray, M. A., & Flores, C. A. (2022). Inhibition of the sodium-dependent HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporter SLC4A4, produces a cystic fibrosis-like airway disease phenotype. *ELife*, 11. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.75871>

Yang, D., Shcheynikov, N., & Muallem, S. (2010). IRBIT: It Is Everywhere. *Neurochemical Research*, 36(7), 1166. <https://doi.org/10.1007/S11064-010-0353-6>

Yu, Q., Liu, X., Liu, Y., Riederer, B., Li, T., Tian, D. A., Tuo, B., Shull, G., & Seidler, U. (2016). Defective small intestinal anion secretion, dipeptide absorption, and intestinal failure in suckling NBCe1-deficient mice. *Pflugers Archiv*, 468(8), 1419. <https://doi.org/10.1007/S00424-016-1836-3>

Zuloaga, N., Vivallos, N., Faúndez, R., González, M., Navarro, E., Chávez, E., Araya, M., Zuloaga, N., Vivallos, N., Faúndez, R., González, M., Navarro, E.,

Chávez, E., & Araya, M. (2021). Manifestaciones gastrointestinales en fibrosis quística en una población pediátrica. *Andes Pediatrica*, 92(4), 526–533.  
<https://doi.org/10.32641/ANDESPECIATR.V92I4.2693>