

1128)

2ej

(2)

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA

DIFERENTES MECANISMOS ELECTROFISIOLÓGICOS EN LA GENERACION
DE CONTRACCION EN EL MUSCULO CIRCULAR
DEL COLON DE PERRO

TESIS PARA OBTENER EL GRADO
DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS,
AREA FISILOGIA

PRESENTA:

CARLOS BARAJAS LOPEZ
MEDICO CIRUJANO
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
(AREA FISILOGIA)

ASESORES:

CRUZ REYES VAZQUEZ
DOCTOR EN CIENCIAS
PROFESOR TITULAR "A"
U N A M

JAN D. HUIZINGA
DOCTOR EN CIENCIAS
PROFESOR ASOCIADO
McMASTER UNIVERSITY

MEXICO, D.F., SEPTIEMBRE DE 1988.

FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

| | |
|---|-------|
| DEDICATORIAS..... | 4 |
| PROLOGO..... | 5-6 |
| RESUMEN..... | 7 |
| SUMMARY..... | 8 |
| INTRODUCCION..... | 9-14 |
| 1. Hipótesis | |
| 2. Objetivos | |
| METODOS..... | 15-23 |
| 1. Preparación del tejido. | |
| 2. Registro de las actividades eléctrica y mecánica. | |
| 3. Soluciones y drogas. | |
| 4. Análisis de los datos. | |
| RESULTADOS..... | 24-57 |
| 1. Actividades eléctrica y mecánica en solución de Krebs normal. | |
| 1.1. Actividad eléctrica espontanea de las células de la superficie submucosa. | |
| 1.2. Actividad eléctrica espontanea de las células de la superficie mientérica. | |
| 1.3. Correlación entre las actividades eléctrica y mecánica. | |
| 2. Efectos del D600 sobre las actividades eléctrica y mecánica del músculo circular. | |
| 2.1. Efectos del D600 sobre la actividad eléctrica intracelular de ambas superficies. | |
| 2.2. Correlación entre la actividades eléctrica y mecánica del músculo circular en la presencia y ausencia de D600. | |
| 3. Efectos del carbacol sobre las actividades eléctrica y mecánica del músculo circular. | |

- 3.1. Efectos del carbacol ($10^{-7}M$) sobre la actividad eléctrica de las células de la superficie submucosa.
- 3.2. Efectos del carbacol ($10^{-7}M$) sobre la actividad eléctrica de las células de la superficie del plexo mientérico.
- 3.3. Correlación entre la actividades eléctrica y mecánica del músculo circular en presencia de carbacol.
- 3.4. Determinación del "umbral" mecánico.
- 3.5. Mecanismos de acción de carbacol.
- 4. Efectos del TEA sobre las actividades eléctrica y mecánica del músculo circular.
 - 4.1. Efectos del TEA sobre la actividad eléctrica de células de ambas superficies.
 - 4.2. Correlación entre la actividad eléctrica de ambas superficies y la contracción del músculo circular.

DISCUSION.....58-70

REFERENCIAS.....71-74

APENDICE "A".....75-107

- 5. "Pacemaker generation in colonic smooth muscle. I. Role of the sodium pump."

APENDICE "B".....108-137

- 6. "Pacemaker generation in colonic smooth muscle. II. Ionic basis."

DEDICATORIAS

A MI ESPOSA:

ROSA

A MIS PADRES:

CONSUELO Y CARLOS

A MIS HIJOS:

ALMA ROSA, JUAN CARLOS Y GERARDO

A MIS HERMANOS:

GERARDO Y FRANCISCO

A MIS MAESTROS:

CRUZ REYES-VAZQUEZ Y HECTOR BRUST-CARMONA

GRACIAS POR SU APOYO, DEDICACION Y PACIENCIA.

PROLOGO

Los factores que controlan la motilidad del intestino grueso son complejos y aún incomprendidos. Al igual que la motilidad de otras porciones del tubo digestivo, la del colon está influenciada por al menos 3 factores: a) las propiedades intrínsecas del músculo liso, propiedades miogénicas; b) el sistema nervioso, tanto intrínseco como extrínseco; y c) por factores humorales, tanto hormonales como sustancias liberadas localmente. Estos dos últimos factores actúan modificando las propiedades miogénicas de las células musculares.

Dentro de las propiedades miogénicas que regulan la contracción del músculo liso del tubo digestivo están las fluctuaciones del potencial de membrana. Se distinguen dos tipos de oscilaciones espontáneas del potencial de membrana, las ondas lentas y los potenciales espiga. Estas oscilaciones propician el ingreso de calcio hacia el interior de las células, desencadenando la contracción del músculo liso.

La presencia de ondas lentas en la capa circular del colon canino fue descrita en numerosos estudios, los cuales emplearon diferentes técnicas de registro. Sin embargo, la presencia de espigas en esta capa muscular es motivo de discusión. El presente estudio termina con tal controversia. El músculo circular del colon muestra espigas y ondas lentas, generando ambas contracciones. Los potenciales de espiga son observados en las células musculares de la superficie del plexo mientérico, fundamentalmente durante la estimulación con carbacol o

tetraetilamonio. Mientras, ondas lentas de gran amplitud están presentes siempre en células de la superficie submucosa de la capa circular.

El material descrito en el texto principal forma parte de dos artículos que se encuentran en prensa (Barajas-López y Huizinga, 1988a,b) y un resumen publicado (Barajas-López y Huizinga, 1987).

Los mecanismos electrofisiológicos que generan las ondas lentas son analizados en los apéndices "A" y "B".

RESUMEN

DIFERENTES MECANISMOS ELECTROFISIOLÓGICOS EN LA GENERACION DE CONTRACCION EN EL MUSCULO CIRCULAR DEL COLON DE PERRO. Barajas-López Carlos. Tesis Doctoral.

Diferencias marcadas fueron observadas en la actividad eléctrica intracelular tanto espontánea como inducida por la presencia de carbacol o tetraetilamonio, al comparar las superficies submucosa y la del plexo mientérico de la capa de músculo circular del colon canino. Las características distintivas de las células de la superficie mientérica fueron: a) un potencial de membrana menor (-10 mV), b) una onda lenta de menor amplitud y c) la ocurrencia de potenciales espigas. Además de las ondas lentas pequeñas observadas en esta superficie, se registraron ondas lentas con grandes depolarizaciones iniciales (-2.5 veces más grandes que la amplitud de la meseta) en ~35% de las preparaciones. Esta gran depolarización fue dependiente de un cambio regenerativo en el potencial de membrana (una espiga) durante la propagación pasiva de las ondas lentas hacia las células de la superficie del plexo mientérico. Tal espiga es dependiente del flujo de iones de calcio y fue provocada o reforzada por la aplicación de pulsos eléctricos, por la presencia de carbacol en el medio de perfusión o después de bloquear una conductancia al potasio sensible al tetraetilamonio. El potencial de membrana umbral para la generación de contracción (umbral mecánico) fue -44 mV. No se observó gradiente alguno en el umbral mecánico entre las células de las superficies submucosa y del plexo mientérico. Este umbral fue rebasado durante la depolarización inicial y la fase de meseta de las ondas lentas espontáneas de la superficie submucosa y por las espigas de suficiente amplitud que ocurrieron en la superficie del plexo mientérico. El carbacol produjo cambios específicos en las actividades tanto eléctrica como mecánica los cuales fueron inhibidos por el bloqueo con D600 del flujo de calcio: a) el incremento en la duración de las ondas lentas; b) el incremento en la depolarización durante la fase de meseta; c) el reforzamiento de la actividad espiga; y d) el incremento en la fuerza de contracción. El bloqueo de estos efectos del carbacol con D600 muestra que la conductancia al calcio se incrementa significativamente en la presencia de carbacol en células de ambas superficies de la capa circular. El incremento en la conductancia al calcio puede ser resultado de una acción directa del carbacol sobre la corriente de calcio o, al menos parcialmente, ser mediada por una disminución en la corriente saliente. La última sugerencia se apoya en el hecho de que la depolarización inducida por el carbacol se asoció a un incremento en la resistencia de la membrana y ambas no fueron sensibles al D600. Además, el empleo de un bloqueador de la corriente saliente, el tetraetilamonio, produjo efectos similares sobre las actividades eléctrica y mecánica que los inducidos por el carbacol. Los resultados muestran que un estímulo excitador incrementa la fuerza de contracción del músculo circular a través de diferentes mecanismos electrofisiológicos en células de una y otra superficie de la capa circular del colon. En conclusión, al menos dos tipos de células existen en esta capa muscular, con marcadas diferencias en sus propiedades electrofisiológicas. Las ondas lentas se generan en la superficie submucosa y se propagan hacia las capas celulares internas, donde estas inducen espigas.

INTRODUCCION

El colon recibe material semilíquido el cual es transportado de su porción proximal hasta el recto. En el curso de este movimiento, el intestino grueso extrae agua y electrólitos cambiando su contenido a una masa relativamente sólida. El recto y la porción distal del colon evacúan periódicamente su contenido (Szurszewski, 1987).

Las funciones de mezcla y almacenamiento ocurren principalmente en el colon proximal y distal, respectivamente. Cannon (1902) estudió los patrones de contracción que sustentan dichas funciones, usando técnicas radiográficas en el gato. Este autor, describió los movimientos peristálticos característicos del colon ascendente derecho y de la porción derecha del colon transversal, además de las contracciones circulares y tónicas de la porción izquierda. Cannon (1902) también describió la presencia de una contracción fuerte y extensa que mueve el contenido colónico de su porción izquierda hasta el canal anal. Posteriormente, Barcroft y Sterggerda (1929) mostraron la presencia de movimientos similares en el colon exteriorizado de perro.

Todos estos movimientos colónicos son consecuencia de los cambios de potencial eléctrico observados en las células del músculo liso de las capas circular y longitudinal, las cuales conforman la capa muscular externa del intestino grueso (Bowes et al., 1978; Szurszewski, 1987).

Existe una amplia diferencia entre los tipos de actividad

SUMMARY

DIFFERENT ELECTROPHYSIOLOGICAL MECHANISMS OF CONTRACTION GENERATION IN CIRCULAR MUSCLE OF THE DOG COLON. Barajas-López Carlos. Doctoral Thesis.

Marked differences were observed in the intracellular electrical activities (spontaneous, and carbachol and tetraethylammonium induced) comparing the submucosal and myenteric plexus surfaces of the circular muscle of the dog colon. Distinct characteristics of the cells at the myenteric plexus surface were: a less (10 mV) polarized membrane, a lower amplitude slow wave, and the occurrence of burst type spiking activity. However, slow waves with a high upstroke amplitude (~ 2.5 times higher than the plateau) were observed in ~ 35% of the preparations. This high upstroke amplitude was dependent on the occurrence of a regenerative membrane potential change (a spike) during the slow wave propagation into the myenteric plexus surface. Such a spike was mediated by calcium influx and could be evoked or enhanced by electrical pulses, carbachol or by blocking a tetraethylammonium-sensitive potassium conductance. In the presence of carbachol or tetraethylammonium the spikes occurred in burst. Smooth muscle cells from the circular muscle layer of the dog colon showed a mechanical threshold of -44 mV. No gradient in mechanical threshold was measured between the cells from the submucosal and myenteric plexus surface. The threshold was passed during the upstroke and the plateau phase of the spontaneous slow wave activity from cells at the submucosal surface, and by spikes of sufficient amplitude occurring in cells at the myenteric plexus surface. Carbachol induced specific changes in electrical and mechanical activities which were inhibited by calcium influx blockade: a) increase in slow wave duration; b) increase in plateau depolarization; c) enhancement of spiking activity; d) increase in contractility. This shows that calcium conductance was significantly increased in the presence of carbachol in cells at both surfaces of the circular muscle layer. The increase in calcium current could be the result of a direct action by carbachol on the calcium current or could, at least in part, be mediated by an decrease in outward current. The latter is suggested by the carbachol induced membrane depolarization, associated with a decrease in the input membrane resistance, which were both D600 insensitive. The results show that an excitatory stimulus generates contraction of the circular muscle at both sides of the muscle layer via different electrophysiological activities. In addition, the patterns of spontaneous electrical activity and the different responses to carbachol stimulation provide further information about the heterogeneous nature of the electrical activities within this muscle layer. The slow waves are generated in the submucosal surface and propagated to the cells of the myenteric plexus surface, where they evoke spikes.

INTRODUCCION

El colon recibe material semilíquido el cual es transportado de su porción proximal hasta el recto. En el curso de este movimiento, el intestino grueso extrae agua y electrólitos cambiando su contenido a una masa relativamente sólida. El recto y la porción distal del colon evacúan periódicamente su contenido (Szurszewski, 1987).

Las funciones de mezcla y almacenamiento ocurren principalmente en el colon proximal y distal, respectivamente. Cannon (1902) estudió los patrones de contracción que sustentan dichas funciones, usando técnicas radiográficas en el gato. Este autor, describió los movimientos peristálticos característicos del colon ascendente derecho y de la porción derecha del colon transversal, además de las contracciones circulares y tónicas de la porción izquierda. Cannon (1902) también describió la presencia de una contracción fuerte y extensa que mueve el contenido colónico de su porción izquierda hasta el canal anal. Posteriormente, Barcroft y Sterggerda (1929) mostraron la presencia de movimientos similares en el colon exteriorizado de perro.

Todos estos movimientos colónicos son consecuencia de los cambios de potencial eléctrico observados en las células del músculo liso de las capas circular y longitudinal, las cuales conforman la capa muscular externa del intestino grueso (Boves et al., 1978; Szurszewski, 1987).

Existe una amplia diferencia entre los tipos de actividad

eléctrica espontánea, y por consiguiente en los patrones mecánicos, registrados en las capas longitudinal y circular del colon del perro (Chambers et al., 1984; Chow y Huizinga, 1987; El-Sharkawy, 1983).

Chow y Huizinga (1987) mostraron que el potencial de membrana de las células musculares longitudinales del colon canino es de -50 mV. Estos investigadores mostraron también que estas células presentan descargas de espigas en ráfagas, las cuales ocurren en frecuencias de 0.7 por minuto y duran 27 segundos en promedio. Las espigas de cada ráfaga, se presentan en frecuencias de 20 cpm, con amplitudes que oscilan de 9 a 24 mV y con una duración promedio de 1.1 s. Este tipo de actividad en ráfagas, provocan la contracción del músculo longitudinal (Chow y Huizinga, 1987).

En contraste, las células musculares de la capa circular del colon canino, poseen un potencial de membrana de -72 mV, el cual es más negativo que el registrado en las células musculares longitudinales (Barajas-López y Huizinga, 1987). Además, diferentes grupos de investigadores describieron la presencia de cambios de voltaje en forma de ondas lentas que ocurren espontáneamente en el músculo circular colónico del perro (El-Sharkawy, 1983; Chambers et al., 1984; Chow y Huizinga, 1987; Smith et al., 1987a).

Estas ondas lentas son oscilaciones miogénicas espontáneas del potencial de membrana, las cuales no se observan en las células de la capa longitudinal (El-Sharkawy, 1983; Durdle et

al., 1985; Chow y Huizinga, 1987). Las ondas lentas fueron registradas en las células superficiales del lado de la submucosa del músculo circular. Estas se caracterizan por una rápida depolarización con amplitud de -35 mV, seguida inmediatamente por una repolarización parcial (-5 mV) y entonces por una meseta (El-Sharkawy, 1983; Durdle et al., 1985; Chow y Huizinga, 1987). Las ondas están asociadas con la contracción del músculo circular y muestran una duración similar y una frecuencia idéntica a la de la actividad mecánica fásica del músculo circular.

Los estímulos farmacológicos al inducir cambios sobre las ondas lentas, alteran la actividad motora del colon canino. Así, sustancias excitadoras, tales como la sustancia P, pentagastrina, acetilcolina y su análogo carbacol, incrementan la duración de las ondas lentas en el colon de perro (Huizinga et al., 1984a,b). Este incremento se correlaciona con una reducción en la frecuencia de las ondas lentas y por consiguiente en la de la actividad mecánica.

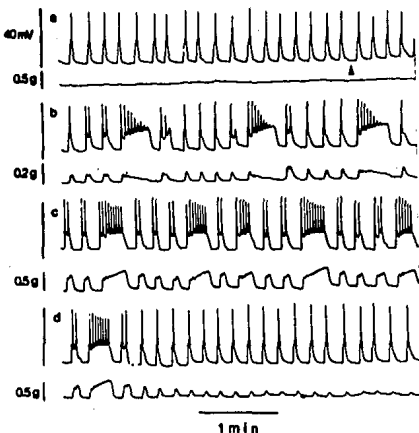


Figura 1. Actividad espiga en el músculo circular colónico registrada con la técnica de trampa de sacarosa. En cada tablero, los trazos superiores representan la actividad eléctrica (mV) y los inferiores la actividad mecánica (g). a, actividad espontánea, nótese la presencia de ondas lentas con una espiga sobreimpuesta. La flecha indica la adición de carbacol ($2 \times 10^{-7} M$). b y c, trazos obtenidos después de 5 y 15 min de iniciar la perfusión con el carbacol. Nótese la aparición de ondas lentas de mayor duración y sobre éstas, ráfagas de espigas. d, 5 min después de retirar el carbacol (Huizinga et al., 1984a).

Adicionalmente, Huizinga et al. (1984ab), usando la técnica de trampa de sacarosa, encontró que durante la prolongación de la fase de meseta, lo cual significa una depolarización prolongada muscular, aparecen espigas que generan contracciones prolongadas y fuertes (figura 1). Sin embargo, estudios intracelulares no mostraron la presencia de espigas en las células de la capa circular. Por lo que varios autores sugieren que este tipo de actividad no existe en esta capa circular (Smith et al. 1987a). Por ejemplo, Hara y Szurszewski (1981ab), no encontraron estas espigas aun después de añadir carbacol. Aunque, los estudios de registro intracelulares realizados por estos autores, analizaron únicamente la actividad eléctrica en células musculares de la superficie submucosa.

Posiblemente el empleo de la técnica de trampa de sacarosa prodria detectar la presencia de tales espigas en células profundas, puesto que esta técnica permite registrar la actividad eléctrica de una gran población de células, incluyendo aquellas cercanas a la superficie del plexo mientérico de la capa circular colónica. Estos estudios sugieren que las espigas registradas en esta capa, podrian ser generadas únicamente en las células musculares más profundas de la capa muscular y no en las células superficiales del lado de la submucosa. Tal situación explicaría la incapacidad de los estudios intracelulares para detectar la presencia de estas espigas.

Los resultados descritos sugieren que las células musculares de la superficie del plexo mientérico de la capa circular

colónica tienen características eléctricas intrínsecas diferentes de aquellas observadas en las células de su superficie submucosa.

Por lo tanto, es probable que varios mecanismos electrofisiológicos contribuyan a generar la actividad contractil en el músculo circular del colon canino. También es probable que el potencial de membrana podría rebasar el nivel umbral para generar contracción durante la fase de meseta de las ondas lentas, tal como ocurre en el estómago (Szurszewski, 1987), o bien que esta contracción podría ser mediada por los potenciales espigas.

El estudio de la heterogeneidad de las propiedades eléctricas del músculo circular proporcionará información básica sobre los mecanismos de generación de la actividad mecánica y además sobre el acoplamiento funcional entre las diversas células del músculo circular. Los resultados de estos estudios aumentarán nuestra información sobre el sistema de control miogénico, fundamental para la motilidad gastrointestinal.

1. HIPOTESIS:

- a) Las propiedades eléctricas de las células musculares de la superficie del plexo mientérico poseen características eléctricas distintas de aquellas observadas en células de la superficie submucosa de la capa circular del colon canino.
- b) Las espigas registradas en el músculo circular del colon durante la estimulación con carbacol son generadas en las células de la superficie del plexo mientérico.

- c) El carbacol incrementa la fuerza y la duración de las contracciones del músculo circular principalmente al incrementar la conductancia de la membrana al calcio. Este efecto podría ser resultado de una acción directa del carbacol sobre la conductancia al calcio o el resultado de un decremento de la corriente saliente.
- d) Tanto las ondas lentas como las espigas generan contracción en el músculo circular del colon de perro.

2. OBJETIVOS:

- a) Investigar las características de la actividad eléctrica espontánea de las células de ambas superficies del músculo circular del colon canino.
- b) Estudiar los efectos del carbacol sobre la actividad eléctrica intracelular de las células de las dos superficies de la capa circular del colon del perro.
- c) Analizar el mecanismo de acción que utiliza el carbacol para modificar la actividad eléctrica de las células del músculo circular.
- d) Investigar las relaciones funcionales entre la actividad eléctrica intracelular y su contracción de las células de ambas superficies del músculo circular.

METODOS

1. Preparación del tejido.

Perros de cualquier sexo fueron anestesiados con pentobarbital i.v. (35 mg/Kg). El colon fue expuesto mediante una incisión abdominal, extrayendose un segmento de 10 a 12 cm del colon proximal 5 cm distal a la unión ileocecal. El segmento se colocó en solución de Krebs y cortó por su borde mesentérico. El tejido se fijó mediante alfileres al "Sylgard" localizado en el fondo de una caja de petri, la cual se mantuvo llena con solución de Krebs aerada constantemente (95% O₂ y 5% CO₂). En esta situación se removió la mucosa. El músculo liso longitudinal fue cuidadosamente separado totalmente del músculo circular con la ayuda de una aguja y de un microscopio de disección. El análisis histológico de este tipo de preparación muestra la presencia de parte del plexo mientérico y la ausencia de células muscular longitudinales.

2. Registro de las actividades eléctrica y mecánica.

La mayoría de preparaciones consistieron en tiras de músculo de capa circular de 15 mm de longitud obtenidas mediante cortes paralelos a las bandas musculares. Las tiras de 1.5-2 mm de ancho fueron montadas en una cámara de estimulación dividida (Abe y Tomita, 1968; figura 2). La longitud del tejido dentro del compartimiento de estimulación fue de 8 a 10 mm (Bywater and Taylor, 1980) su borde distal fue atado a un transductor de fuerza (miógrafo). La cámara de estimulación dividida tiene 6 ml de capacidad y se perfundió con solución de Krebs a flujo

constante. La velocidad de perfusión fue de 3-10 ml/min.

El registro de la actividad eléctrica se realizó únicamente en las células más superficiales de la cara submucosa o de la cara del plexo mientérico. Para registrar estas células, se colocaron las tiras musculares con la superficie submucosa o la del plexo mientérico hacia arriba. Entonces, el microelectrodo penetró la tira de músculo en dirección perpendicular en etapas de -5 μ m, hasta 0.1 mm por debajo de la superficie de la tira. La identificación de la superficie se realizó por la ocurrencia de un potencial de "punta" transitorio. En cada etapa una oscilación corta (-20 ms) del amplificador permitió la penetración de las células.

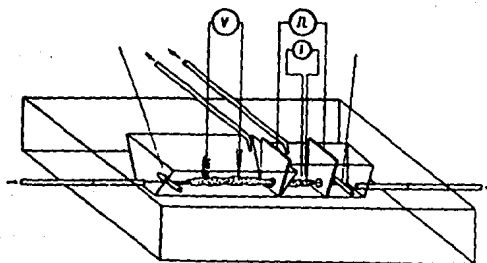


Figura 2. Esquema de la cámara de estimulación dividida. Una de las placas de estimulación divide a la cámara en dos porciones. A la derecha se muestra el compartimiento de estimulación y a la izquierda se observa el compartimiento de registro (Abe y Tomita, 1968).

Los microelectrodos se prepararon con capilares de vidrio de 1.2 mm de diámetro externo (WPI). Las resistencias de los microelectrodos oscilaron entre 25 a 50 MX, cuando fueron llenados con una solución de KCl 3M. El microelectrodo se conectó a la sonda de un electrómetro de alta impedancia (M-707A, WPI), la salida del cual, fue conectada a un osciloscopio de memoria (Gould, 1425) y a un reproductor en papel (2800S, Gould).

Se estimuló a las tiras de músculo con un generador de pulsos (Grass S88) conectado a los electrodos de estimulación a través de una unidad de aislamiento (SIU5, Grass). El gradiente de voltaje en el compartimiento de estimulación (intensidad de campo eléctrico) se midió con dos electrodos de plata colocados 2 mm aparte y localizados a la mitad del compartimiento de estimulación. A su vez, este compartimiento consistía en dos placas de plata colocadas 10 mm aparte (figura 1). Tanto las placas de plata como los electrodos para el registro de la intensidad de campo, se cubrieron cuidadosamente con cloruro de plata, usando para éllo una solución de 0.1 M de HCl y el estimulador Grass.

Para aislar la superficie del electrodo de estimulación orientada hacia el compartimiento registro, está se cubrió con una capa de enamel. Los potenciales electrotónicos se indujeron con pulsos de corriente con una duración de 1.5 a 3 s y con una amplitud entre 8 y 25 V.

Para medir el potencial de membrana al cual el músculo comienza a contraerse ("umbral mecánico") en células de ambas

superficies de la capa circular colónica, dos diferentes tiras musculares (15 x3 mm) fueron preparadas. Una porción de las tiras (5 mm de largo) contenía a la capa circular completa, la segunda porción (10 mm de longitud) contenía una banda de músculo circular, de la superficie submucosa (preparación "submucosa") o de la superficie del plexo mientérico (preparación "mientérica"). Las preparaciones submucosas (n=8) se prepararon mediante la extirpación del 60 ± 5 % (determinado histológicamente) del músculo circular adyacente a la superficie del plexo mientérico (véase figura 14). Las preparaciones mientéricas (n=4) se prepararon removiendo el 50 ± 8 % del músculo circular adyacente a la superficie submucosa (véase figura 15). Estas preparaciones se fijaron en la cámara de registro antes descrita, la cual carecía de las placas de estimulación. El extremo más delgado de las preparaciones se ató al transductor de fuerza. La porción completa de músculo circular se sujeto con alfileres y se empleó para el registro de la actividad eléctrica intracelular, ya sea de células de la superficie submucosa o del plexo mientérico en las preparaciones submucosas o mientéricas, respectivamente. Para determinar las relaciones de fuerza-voltaje, las actividades eléctrica y mecánica se registraron simultáneamente, mientras el músculo era depolarizado hasta diferentes niveles incrementando la concentración de KCl en el medio de perfusión. Las concentraciones de KCl en el baño se incrementaron hata 25.9, 30.9, 35.9, 40.9, o 45.9 mM.

Las preparaciones se equilibraron en la cámara de registro

por la menos 2 horas o hasta que los siguientes criterios se observaron: a) en la superficie submucosa, las ondas lentas tenían una duración promedio mínima de 3 s, esto se alcanzó después de 2 horas en 12 de 14 preparaciones, y dentro de la tercer hora en las otras 2 restantes; b) en células del plexo mientérico, las ondas lentas tenían una amplitud mínima de 5 mV, lo cual se alcanzó a las 2 horas en la mayoría de las preparaciones (25 de 33) y dentro de los siguientes 90 min en el resto. Antes de que estos criterios se alcanzaran, los potenciales electrotónicos eran de muy baja amplitud (<8 mV/[V/cm]) o estaban ausentes (figura 3). Cuando los criterios se alcanzaron también la amplitud de los potenciales electrotónicos se incrementó hasta -20 mV/[V/cm]. Esto sugiere un periodo transitorio de bajo acoplamiento eléctrico entre las células de dichas preparaciones.

En la superficie del plexo mientérico, este acoplamiento eléctrico pobre se asoció con células que no presentaban oscilaciones del potencial de membrana (5 preparaciones) o con células que mostraban oscilaciones de mayor frecuencia (10-20 cpm) que las ondas lentas. Este tipo de oscilaciones no se correlacionaron con la generación de contracciones fásicas (figura 3; 3 preparaciones). En 3 de las 5 preparaciones de células sin oscilaciones, las ondas lentas aparecieron gradualmente. En las otras 2, oscilaciones de alta frecuencia del potencial de membrana aparecieron transitoriamente, las cuales alcanzaron amplitudes de hasta 30 mV. La frecuencia de las

oscilaciones se decrementó gradualmente hasta alcanzar la frecuencia característica de las ondas lentas (~4-7 cpm). Paralelamente, se desarrolló el patrón característicos de estas ondas lentas, así como su sincronización con la actividad mecánica fásica del músculo circular (figura 3). Además siempre se observó un incremento significativo en la amplitud de los potenciales electrotónicos concomitante con la aparición de ondas lentas. El potencial de membrana no fue diferente durante este periodo de bajo acoplamiento eléctrico. Fue posible observar todos estos cambios pudieron ser observados en registros continuos dentro de una misma célula (figura 3).

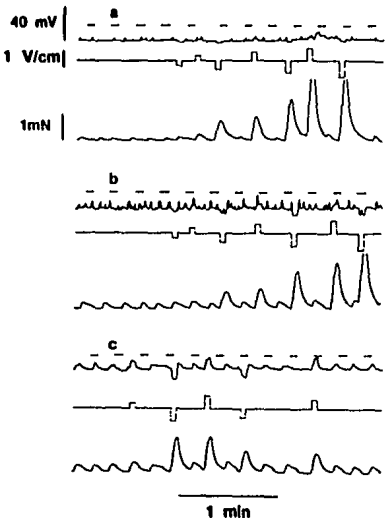


Figura 3. Actividad eléctrica del plexo mientérico bajo condiciones de pobre acoplamiento eléctrico. El trazo superior (mV) de cada tablero representan porciones del registro de la actividad eléctrica espontánea de la misma célula. En estas y las siguientes figuras las líneas discontinuas indican un potencial de membrana de -40 mV. Los trazos intermedios (V/cm) representan el potencial de campo medido en el compartimiento de estimulación. Los trazos inferiores (mN) representan la actividad mecánica desarrollada por la tira de músculo circular. En "a" los registros se efectuaron después de permitir a la preparación equilibrarse durante 2 horas. Oscilaciones espontáneas pequeñas del potencial de membrana no se correlacionan con la contracción muscular. Lo cual se asoció con pequeños, casi indistinguibles, potenciales electrotónicos. "b" y "c" son registros realizados 40 y 90 min después de "a".

Posteriormente, en "b" las oscilaciones espontáneas del potencial de membrana ocurrieron no sincronizadas con las contracciones fásicas y se asociaron con pequeños potenciales electrotónicos. En "c", se observan ondas lentas, típicas de la superficie del plexo mientérico. Las cuales están sincronizadas con la actividad mecánica y con los potenciales electrotónicos máximos.

3. Soluciones y drogas.

Todos los experimentos se realizaron utilizando solución de Krebs equilibrada con 95% de O₂ y 5% de CO₂, a una temperatura de 36.5-37.5°C. La composición de la solución de Krebs fue de (en mM): NaCl, 120.3; KCl, 5.9; CaCl₂, 1.2; NaHCO₃, 20.0; NaH₂PO₄, 1.2 y Glucosa, 115. Las soluciones con alto contenido en K fueron obtenidas reemplazando NaCl por cantidades equimolares de KCl. La osmolaridad y PH medidos fueron de 293±2 mOsm/Kg and 7.33±0.02 (n=12), respectivamente. Los registros de la actividad espontánea se realizaron tanto en presencia de tetrodotoxina (5x10⁻⁷M); Sigma Co. USA) como en ausencia de la misma. Esta sustancia, utilizada para bloquear la transmisión neural, fue disuelta previamente en solución de Krebs (Hagiwara, 1983). El metoxiverapamil (D600; donado por Knoll, Alemania Occidental) fue agregado a la solución de Krebs hasta alcanzar una concentración de 10⁻⁶M. La relación dosis respuesta para el carbacol (Sigma Co.) en colon canino fue previamente investigada con técnicas de registro extracelular (Huizinga et al., 1984a). El presente estudio se realizó con una concentración de 10⁻⁷M para comparar los efectos del carbacol sobre la actividad eléctrica intracelular de una y otra superficie del músculo circular del colon. También se investigaron los efectos del tetraetilamonio (TEA; Kodak Co.) reemplazando NaCl por una cantidad equimolar de TEA-Cl (30 mM). Los experimentos de correlación fuerza-voltaje se realizaron en presencia de TTX (5x10⁻⁷M), ésto con el propósito de bloquear los potenciales de

acción de las fibras nerviosas, cuya excitabilidad estaría aumentada por la depolarización en altas concentraciones de potasio. Este efecto depolarizante sobre las terminales nerviosas rovocaría la liberación de neurotransmisores. Con el propósito de bloquear las acciones muscarínicas de la acetilcolina liberada estos experimentos también se realizaron en presencia de atropina ($10^{-6}M$; Sigma Co.).

4. Análisis de los datos.

Unicamente se analizaron los datos obtenidos de registros intracelulares estables durante al menos 10 min. En el caso de los experimentos con estimulaciones farmacológicas, solo se analizaron aquellos resultados obtenidos de registros intracelulares estables durante al menos 7 min en presencia de los fármacos. Se cuantificaron en periodos de 2 min los siguientes parámetros: el potencial de membrana máximo, la duración y la frecuencia promedio de las ondas lentas, la amplitud de la fase de meseta, el potencial de membrana durante la fase de la meseta, la tasa de cambio promedio durante la depolarización inicial y la amplitud de los potenciales electrotónicos. Estos parámetros se valoraron antes y después de la adición de cada uno de los fármacos. En el esquema de la figura 4 se definen los parámetros eléctricos valorados. La duración fue medida en el momento en que el potencial de meseta alcanzó su valor máximo. Los datos se analizaron comparando los valores obtenidos antes y después de alguna maniobra experimental. Las diferencias estadísticas se

determinaron empleando la prueba t de Student correlacionada cuando los datos a comparar provenían de las mismas preparaciones. En el caso contrario las diferencias se determinaron con la prueba t de Student no correlacionada. Una diferencia fue considerada significativa cuando $P < 0.05$. Para determinar el umbral mecánico los valores de tensión muscular obtenidos durante las diferentes concentraciones de potasio, se normalizaron considerando la máxima fuerza desarrollada por cada músculo como el 100%. La relación fuerza-voltaje se analizó empleando estos valores normalizados. El potencial de membrana para la fuerza cero fue calculado usando el modelo de regresión lineal.

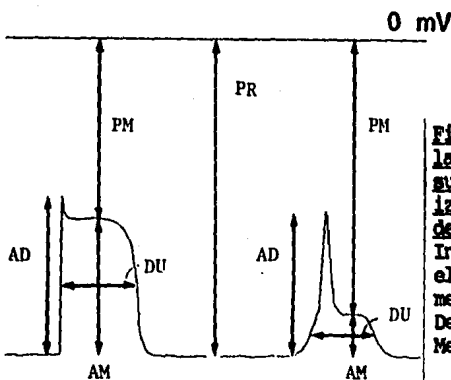


Figura 4. Representación esquemática de la actividad eléctrica observada en las superficies submucosa (trazo a la izquierda) y del plexo mientérico (a la derecha) de la capa circular colónica. Indicados están algunos de los parámetros eléctricos medidos. PR, Potencial de membrana de Reposo; AD, Amplitud de la Depolarización inicial; PM, Potencial de Meseta; AM, Amplitud de la Meseta; DU, Duración de las ondas lentas.

RESULTADOS

1. Actividades eléctrica y mecánica en solución de Krebs normal.1.1. Actividad eléctrica espontánea de las células de la superficie submucosa.

Como fue descrito previamente (El-Sharkawy, 1983; Chow y Huizinga, 1987; Durdle et al., 1984; Smith et al, 1987a). Las células de esta superficie poseen una prominente actividad de onda lenta (figura 5a,b). En nuestros registros el potencial de membrana máximo varió entre las distintas preparaciones desde -62 hasta -84 mV ($\bar{X} \pm \text{EE} = -71 \pm 1.0$ mV; n=20 preparaciones). Las ondas lentas fueron iniciadas por una "rápida" depolarización de 110 ± 9 mV/s con una amplitud promedio de 39 ± 1.5 mV, con un rango de 30 a 50 mV entre las distintas preparaciones. Esta depolarización fue seguida por una repolarización parcial (4.5 ± 0.4 mV) y entonces por un potencial de meseta. El potencial de membrana durante la meseta (potencial de meseta) se mantuvo relativamente constante (-37 ± 1.0 mV). La frecuencia de las ondas lentas y su duración variaron de 3 a 7 cpm (4.8 ± 0.1 cpm) y de 3 hasta 12 s (5.1 ± 0.4 s), respectivamente.

1.2. Actividad eléctrica espontánea de las células de la superficie mientérica.

Las células superficiales de esta cara mostraron un potencial de membrana de reposo significativamente menor ($P < 0.001$) con respecto a las células de la superficie submucosa. Su potencial varió de -48 hasta -75 mV (-60 ± 1.4 mV; n=33 preparaciones; figura 5c,d). Las ondas lentas ocurrieron con una frecuencia (4.5 ± 0.1

cpm) y una duración (4.9 ± 0.5 s) similar a las de la superficie submucosa. En este caso la amplitud de la depolarización inicial (15 ± 2 mV), la tasa de cambio promedio (15.2 ± 2.2 m/s) y la amplitud de la meseta (9 ± 0.7 mV), fueron significativamente menores ($P < 0.001$) que aquellos valores registrados en las células de la superficie opuesta. El potencial de meseta ocurrió a un nivel más polarizado, -51 ± 1.3 mV ($P < 0.001$).

La morfología de las ondas lentas fue variable entre las distintas preparaciones. En 8 de las 33 preparaciones, se registró una onda lenta de pequeña amplitud (de 5 a 15 mV) con una tasa de cambio promedio baja (de 4 a 10 mV/s). En las preparaciones restantes (25) se observó un componente tipo espiga durante la depolarización inicial de las ondas lentas. Este componente se distinguió por la presencia de un punto de inflexión durante la depolarización (figura 6b). La amplitud de la espiga fue variable (de 5 a 30 mV) y alcanzó un valor mayor a 10 mV en 10 de las 25 preparaciones (17.5 ± 1.6 mV), con una tasa de depolarización promedio de 40.5 ± 6.0 mV/s y una duración promedio de 1.7 ± 0.3 s (figuras 5d y 6b). Las espigas fueron provocadas o aumentadas en amplitud por la aplicación de corriente depolarizante o durante la apertura de pulsos de corriente hiperpolarizantes (figura 7). Estas espigas no se modificaron por la presencia de tetrodotoxina, un bloqueador de los canales de sodio (Hagiwara, 1983). La amplitud de tales espigas y su insensibilidad a la tetrodotoxina, sugieren que ésta provocada por un incremento en la conductancia al calcio.

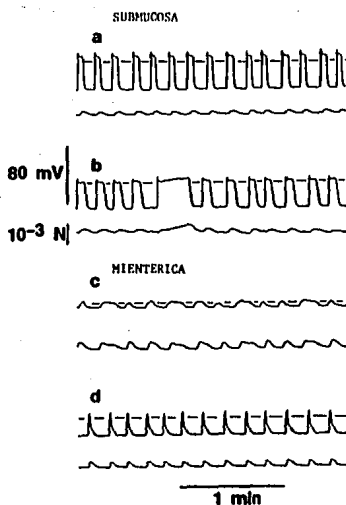


Figura 5 Registro intracelular de la actividad eléctrica de ambas superficies y la contracción asociada del músculo circular.

Los trazos superiores e inferiores ("a"- "d") representan los registros simultáneos del potencial de membrana (mV) y la tensión (mN) del músculo circular, respectivamente. "a" y "b" son registros típicos provenientes de células de la superficie submucosa. "c" y "d" muestran dos distintas formas de ondas lentas observadas en la superficie del plexo mientérico. En "d" la meseta de la onda lenta está únicamente representada por un punto de inflexión durante la repolarización. La actividad de onda lenta de ambas superficies muestra la misma frecuencia y una duración similar que la actividad mecánica fásica. Las líneas entre las ondas de membrana de -40 mV en esta y las figuras siguientes.

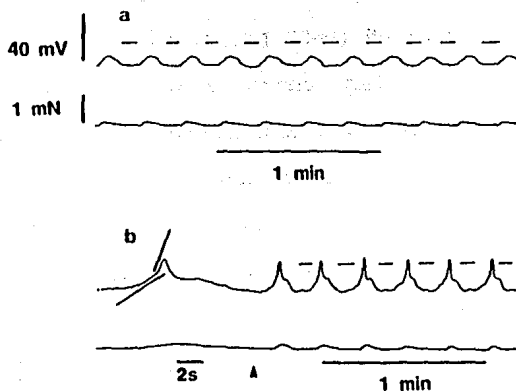


Figura 6 La actividad de onda lenta en la superficie del plexo mientérico muestra un componente espiga. Los trazos superiores en "a" y "b" (mV) muestran los cambios espontáneos en el potencial de membrana (ondas lentas) de células de la superficie del plexo mientérico provenientes de dos diferentes tiras musculares. Los trazos inferiores representan la actividad mecánica asociada (mN) del músculo circular. En "a", se muestra la actividad de onda lenta, característicamente de amplitud baja, donde la depolarización inicial es indistinguible de la amplitud de la meseta. En "b", dos pendientes pueden ser distinguidas durante la depolarización inicial, mostrando la existencia de dos componentes: el primero similar a las ondas lentas observadas en "a" y sobreimpuestas en ésta, una espiga.

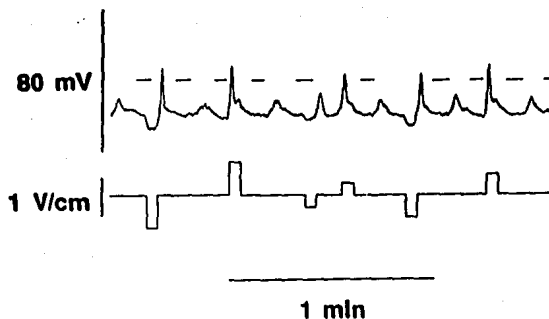


Figura 7. Cambios regenerativos en el potencial de membrana en la superficie del plexo mientérico son provocados por la inyección de corriente. Los trazos superior e inferior representan la actividad eléctrica intracelular (mV) y la intensidad de campo eléctrico (V/cm), respectivamente. Ondas lentas de amplitud baja se observaron espontáneamente en esta preparación. La estimulación eléctrica provocó cambios regenerativos en el potencial de membrana y por consiguiente ondas lentas con grandes depolarizaciones iniciales. Estos cambios se observaron con pulsos depolarizantes o durante la apertura de pulsos hiperpolarizantes.

1.3. Correlación entre las actividades eléctrica y mecánica.

El músculo circular presentó contracciones fásicas espontáneas de una amplitud promedio de 0.19 ± 0.02 mN ($n=53$ preparaciones). Estas ocurrieron en asociación con las ondas lentas de ambas superficies, por lo cual presentaron la misma frecuencia (figuras 5,6). La duración de estas contracciones fásicas fue similar a la de las ondas lentas, encontrándose una buena correlación entre ambas en todas las preparaciones (coeficientes de correlación >0.8).

2. Efectos del D600 sobre las actividades eléctrica y mecánica del músculo circular.

2.1. Efectos del D600 sobre la actividad eléctrica registrada intracelularmente de ambas superficies.

El cuadro I sintetiza los efectos del D600 ($10^{-6}M$) sobre 5 preparaciones cuyas células de la superficie del plexo mientérico mostraron espigas grandes (figura 8). El D600 inhibió completamente a las espigas sin afectar la amplitud de la meseta. Por consiguiente, La amplitud de la depolarización inicial fue disminuida en un promedio de 18 mV (60% de su amplitud máxima), mientras que en la superficie submucosa ésta fue inhibida en solo un 23% (9 mV); conjuntamente, la tasa de depolarización promedio disminuyó. El D600 disminuyó la duración e incrementó la frecuencia de las ondas lentas en ambas superficies. En la superficie submucosa este fármaco disminuyó la amplitud e incrementó el potencial de la meseta. En la superficie del plexo mientérico ningún cambio se observó en estos parámetros. El

potencial de membrana no se modificó.

2.2. Correlación entre las actividades eléctrica y mecánica del músculo circular en presencia y ausencia de D600.

Los cambios sobre la actividad eléctrica en células de ambas superficies inducidos por el D600 se acompañaron por una disminución en la fuerza de la contracción. Este decremento ocurrió desde 0.18 ± 0.03 hasta 0.02 ± 0.01 mN (figura 8). Una inhibición completa de la actividad mecánica se presentó en 3 de 11 preparaciones.

3. Efectos del carbacol sobre las actividades eléctrica y mecánica del músculo circular.

3.1. Efectos del carbacol ($10^{-7}M$) sobre la actividad eléctrica de las células de la superficie submucosa.

El carbacol provocó una disminución significativa ($P 0.001$) en el valor del potencial máximo de membrana (desde -71.9 ± 1.8 hasta -67.8 ± 1.8 mV; $n=26$ células, 14 preparaciones; figura .9.) y en el potencial de meseta (desde -37.4 ± 1.0 hasta 33.6 ± 1.1 mV). La duración de las ondas lentas se incrementó desde 4.7 ± 0.4 hasta 7.2 ± 0.6 s. La frecuencia de estas ondas disminuyó desde valores controles de 4.8 ± 0.2 hasta 4.4 ± 0.2 cpm ($P 0.01$). Ningun cambio significativo se observó en la amplitud de la meseta (de 34.6 ± 1.7 hasta 34.3 ± 1.7 mV), en la amplitud de la depolarización inicial (desde 39.0 ± 1.9 hasta 39.5 ± 1.9 mV) en la tasa de cambio promedio de la depolarización inicial (desde 129.6 ± 19.4 hasta 125.4 ± 35 mV/s). En presencia del carbacol, en algunas de las preparaciones, se observó un patron de onda lenta caracterizado

por ondas de gran duración (>10 s) alternadas con 1 a 3 ondas de menor duración. Se presentaron en forma espontánea o en presencia de carbacol, oscilaciones pequeñas en el potencial de membrana (<5 mV) sobreimpuestas sobre la fase de meseta y con una frecuencia entre 40 y 70 cpm. El carbacol también produjo la aparición esporádica de actividad espiga, tan en solo 2 de 14 preparaciones.

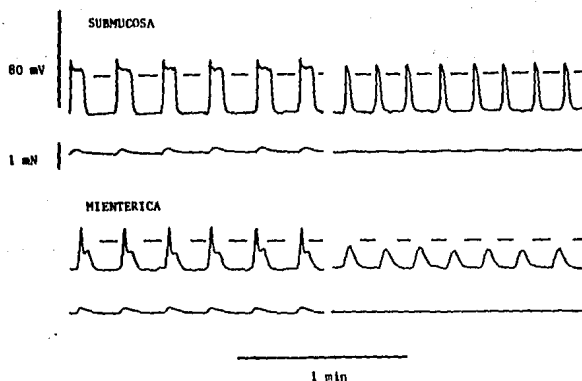


Figura 8. Efectos del bloqueo del flujo de calcio (con D600) sobre las actividades eléctrica y mecánica de ambas superficies. Los trazos superiores e inferiores representan el potencial de membrana (mV) y la actividad mecánica (mN), respectivamente. Los registros a la izquierda representan registros control y a la derecha se encuentran registros efectuados después de 10 min en D600 ($10^{-6}M$). Los registros de la actividad eléctrica son de las mismas células. En la superficie submucosa, D600 disminuyó la duración de las ondas lentas y la amplitud de la meseta y la depolarización inicial. En la otra superficie, D600 disminuyó la duración y la amplitud de la depolarización inicial, lo último al inhibir el componente espiga.

C U A D R O IPARAMETROS DE LA ACTIVIDAD ELECTRICA DE CELULAS
DE AMBAS SUPERFICIES ANTES Y DURANTE LA PRESENCIA DE D600

| | S u b m u c o s a (n=6) | | M i e n t é r i c a (n=5) [®] | |
|---------|-------------------------|-------------|--|-------------|
| | Control | En D600 | Control | En D600 |
| PR mV | -70.0 ± 1.4 | -70.3 ± 1.6 | -60.8 ± 1.5 | -60.4 ± 1.7 |
| P< | | NS | | NS |
| FR cpm | 4.0 ± 0.2 | 4.8 ± 0.2 | 4.3 ± 0.3 | 5.5 ± 0.3 |
| P< | | 0.05 | | NS |
| AD mV | 39.5 ± 2.4 | 30.5 ± 3.7 | 29.8 ± 1.9 | 11.8 ± 1.1 |
| P< | | 0.005 | | NS |
| TC mV/s | 95.0 ± 10.6 | 41.7 ± 13.5 | 26.8 ± 2.3 | 7.2 ± 1.2 |
| P< | | 0.01 | | 0.005 |
| PM mV | -35.9 ± 1.8 | -42.2 ± 2.8 | -47.8 ± 1.6 | -50.6 ± 3.0 |
| P< | | 0.005 | | 0.01 |
| AM mV | 34.1 ± 1.5 | 28.1 ± 3.1 | 13.0 ± 0.4 | 11.8 ± 1.1 |
| P< | | 0.005 | | 0.05 |
| DU s | 6.9 ± 1.0 | 2.8 ± 0.5 | 6.5 ± 1.0 | 3.4 ± 0.2 |
| P< | | 0.05 | | 0.05 |

[®], Datos obtenidos de preparaciones que mostraron ondas lentas con grandes depolarizaciones iniciales en la superficie del plexo mientérico.

PR, Potencial de membrana de Reposo.

FR, Frecuencia de las ondas lentas.

AD, Amplitud de la Depolarización inicial.

TC, Tasa de Cambio promedio.

PM, Potencial de Meseta.

AM, Amplitud de la Meseta.

DU, Duración de las ondas lentas.

P, Valores obtenidos con la prueba t correlacionada.

n = número de preparaciones.

3.2. Efectos del carbacol ($10^{-7}M$) sobre la actividad eléctrica de las células de la superficie del plexo gástrico.

El carbacol provocó una disminución significativa ($P < 0.001$) en el potencial de membrana máximo, éste descendió desde -60 ± 1.2 hasta -48.8 ± 1.4 mV ($n=29$ células, 15 preparaciones; figura 10). Al mismo momento de dicha depolarización, se observaron ráfagas de espigas en 21 células provenientes de 12 de las 15 preparaciones. La amplitud promedio de estas espigas fue de 19.1 ± 2.2 mV (variando desde 5 hasta 38 mV), su duración fue 1.5 ± 0.1 s (desde 1 hasta 3 s), su tasa de cambio promedio de depolarización fue 33.2 ± 5.1 mV/s; su frecuencia dentro de cada ráfaga fue de 21 ± 0.5 cpm; y la duración y la frecuencia de las ráfagas de espigas fue de 10.4 ± 1.1 s y 4.0 ± 0.3 cpm, respectivamente.

En presencia del carbacol, las ondas lentas se distinguieron únicamente en 4 de las 15 preparaciones (figura 10). Se propuso que las ondas lentas son generadas en la superficie submucosa y propagadas pasivamente hacia la superficie del plexo submucoso (Smith et al., 1987a). Consistente con esta hipótesis fue la observación de que el carbacol cambió las ondas lentas de una manera similar a la observada en la superficie submucosa. El potencial de meseta y la frecuencia de onda lenta disminuyeron significativamente ($P < 0.05$; $n=10$ células, 4 preparaciones) desde -51.4 ± 1.2 hasta -47.0 ± 1.0 mV y desde 4.7 ± 0.1 hasta 4.1 ± 0.2 cpm, respectivamente. Mientras que la duración de las ondas lentas se incrementó desde 5.7 ± 0.5 hasta 8.5 ± 0.4 s.

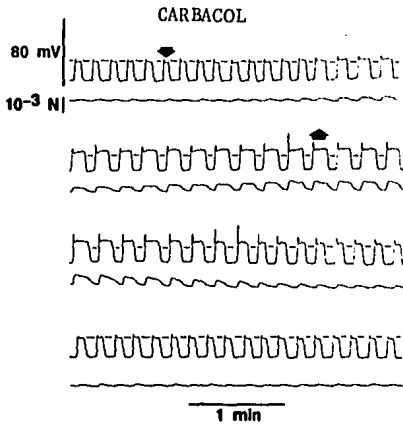


Figura 9. Cambios inducidos por el carbaccol sobre la actividad eléctrica registrada intracelularmente en la superficie submucosa. Registro continuo del potencial de membrana (mV) y la fuerza muscular (mN) de la tira de músculo circular. El carbaccol disminuyó el potencial de membrana máximo y el potencial de meseta, incremento la duración de las ondas lentas y disminuyó su frecuencia. El incremento en la duración de la fase de meseta se asoció con una mayor duración de las contracciones fásicas. La depolarización de la fase de meseta se correlacionó con un incremento en la fuerza de la segunda parte de la contracción. Ambas actividades se recuperaron completamente después de retirar el carbaccol.

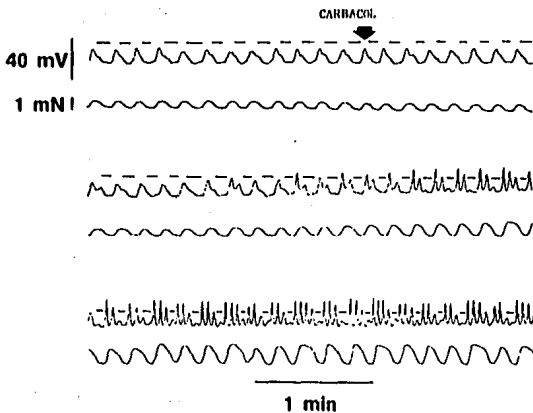


Figura 10. La presencia de carbaccol provocó la aparición de ráfagas de espigas en la superficie del plexo mientérico. El carbaccol disminuyó el potencial de membrana y concomitantemente indujo la aparición de espigas. Estas aparecieron sobreimpuestas sobre las ondas lentas y se correlacionaron con las contracciones fásicas del músculo circular.

En preparaciones que no presentaron ondas lentas debido a la presencia del carbacol, estas aparecieron cuando el tejido se repolarizó hasta un nivel aproximado al potencial de membrana máximo original (figura 11a; 5 preparaciones). Cuando la depolarización inducida por carbacol fue simulada por inyección de corriente, las ondas lentas fueron igualmente indistinguibles y ráfagas de espigas aparecieron (figura 11b). Sin embargo, las espigas inducidas por corriente mostraron una amplitud significativamente menor (9.4 ± 2.9 mV) que las espigas inducidas por la estimulación con carbacol (21.0 ± 3.2 mV; $P < 0.05$; 5 preparaciones).

3.3. Correlación entre la actividades eléctrica y mecánica del músculo circular en presencia de carbacol.

Las ondas lentas registradas en una u otra superficie, y las contracciones fásicas del músculo circular mostraron una duración y frecuencia similares (figuras 5,6,9,8,10). Se observó una correlación buena entre la duración de las ondas lentas y la de las contracciones, tanto en ausencia como en presencia del carbacol (coeficiente de correlación > 0.8). Una correlación también buena se observó entre la duración de las ráfagas de espigas, en la superficie del plexo mientérico, y la duración de las contracciones (figuras 10,12b).

Los cambios en la actividad eléctrica inducidos por el carbacol se asociaron con un incremento marcado en la fuerza de las contracciones, la cual se modificó desde su valor control de 0.20 ± 0.02 hasta 1.4 ± 0.1 mN en la presencia de carbacol (29

preparaciones). Adicionalmente, en 14 de 29 preparaciones un incremento significativo en el tono se presentó (0.43 ± 0.01 mN). Este desarrollo de tono no se correlacionó con alguna actividad eléctrica en las células de la capa submucosa (figura 12), puesto que el valor del potencial de membrana entre las ondas lentas permaneció muy por debajo del "umbral mecánico" (umbral mecánico = -44 mV; vease más adelante). En contraste, en las células de la superficie del plexo mientérico, el valor del potencial de membrana entre las ráfagas de espigas se mantuvo cerca del nivel del "umbral mecánico" y ocurrieron pequeñas oscilaciones en el potencial de membrana las cuales rebasaron este umbral (figura 12). El potencial de membrana en la parte superior de estas oscilaciones fue de -41 ± 1 mV.

Durante la estimulación con carbacol las contracciones de 19 de las 29 preparaciones registradas, fueron bifásicas. La primera parte de la contracción se correlacionó temporalmente con la presencia de la depolarización inicial, mientras que la segunda parte se correlacionó con la fase de meseta de la onda lenta (figuras 9,13). La fuerza de la segunda parte de la contracción fásica se correlacionó linealmente con el potencial de membrana durante la fase de meseta, con un coeficiente de correlación entre 0.73 y 0.96 (figura 13). Usando los datos de estas correlaciones, el potencial de membrana calculado durante un desarrollo de tensión cero fue de -38.0 ± 1.0 (5 preparaciones).

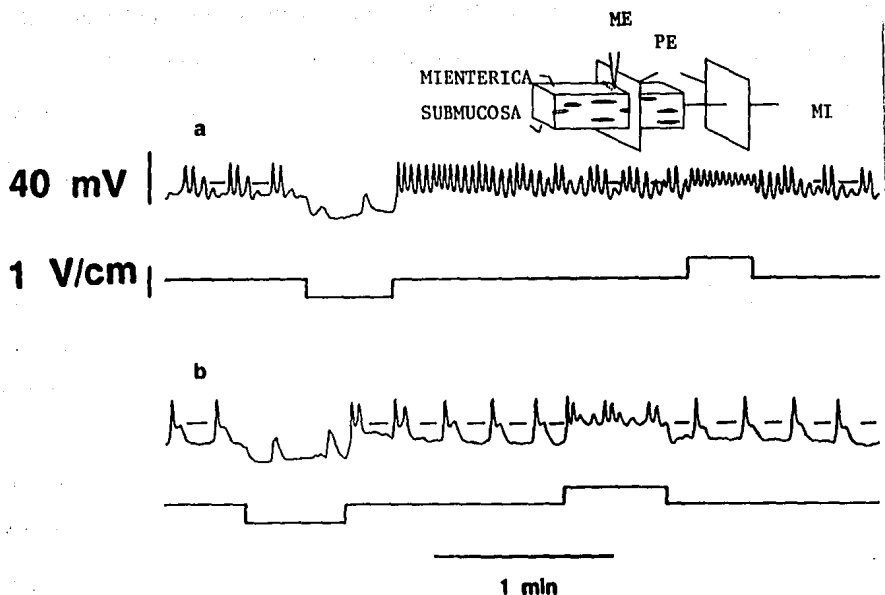


Figura 11. La actividad de onda lenta y las espigas son dependientes del potencial de membrana. Los trazos superiores e inferiores en "a" y "b" representan registros simultáneos del potencial de membrana (mV) y del potencial de campo (V/cm), respectivamente. Ambos registros del potencial de membrana fueron realizados en la misma célula de la superficie del plexo mientérico. "a" se realizó en presencia de carbacol ($10^{-7}M$) y "b" 8 minutos después de retirar el carbacol. Las ondas lentas no son distinguibles cuando la membrana es depolarizada por pulsos de corriente depolarizantes ("b") o por la presencia de carbacol ("a"), pero aparecen cuando la célula es hiperpolarizada por la inyección de corriente. Las espigas desaparecen cuando la tira muscular fue hiperpolarizada y aparece en ráfagas durante la aplicación de pulsos depolarizantes o en la presencia de carbacol. El esquema superior representa la preparación y las placas de estimulación (PE). ME, microelectrodo; MI, miógrafo.

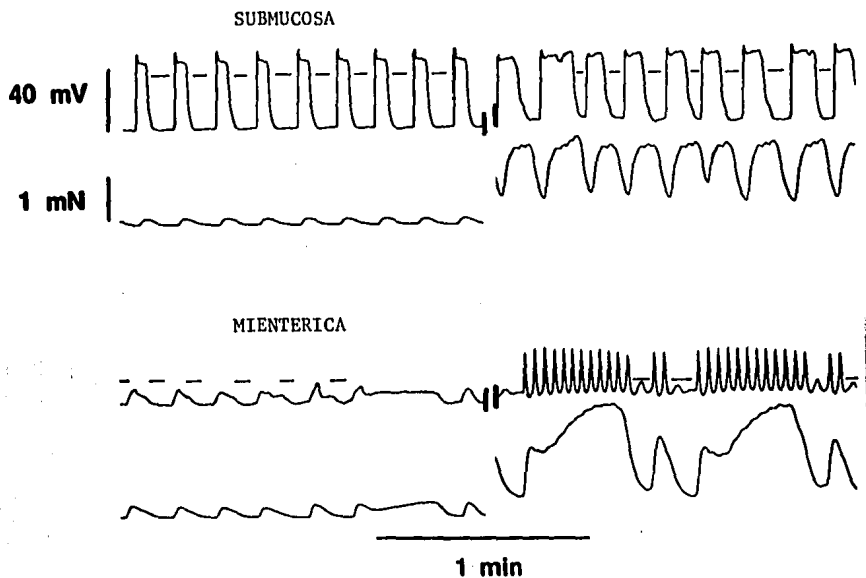


Figura 12. La actividad eléctrica en la superficie del plexo miéntérico genera contracciones fásicas y tónicas. Los trazos superiores e inferiores en "a" y "b", representan la actividad eléctrica intracelular (mV) y la actividad mecánica del músculo circular (mN), respectivamente. Los registros a la izquierda representan las actividades control y los de la derecha, las actividades después de 5 minutos de haber iniciado la perfusión de carbacol ($10^{-7}M$). Los cambios en la actividad eléctrica se asociaron estuvieron asociados con un incremento en la fuerza y la duración de las contracciones. Oscilaciones pequeñas de la tensión durante las contracciones fásicas no se correlacionaron con alguna actividad eléctrica en la superficie submucosa. Oscilaciones en la tensión con una frecuencia similar, son generadas por las espigas registradas en la superficie del plexo miéntérico. El carbacol incrementó el tono en las dos preparaciones. En la superficie submucosa el potencial de membrana entre las ondas lentas esta lejos del "umbral mecánico" (-44 mV; las líneas entre las ondas lentas representan un potencial de membrana de -40 mV). Sin embargo, el potencial de membrana entre las ráfagas de espigas muestra oscilaciones pequeñas, las cuales alcanzan este umbral, permitiendo así la generación de tono.

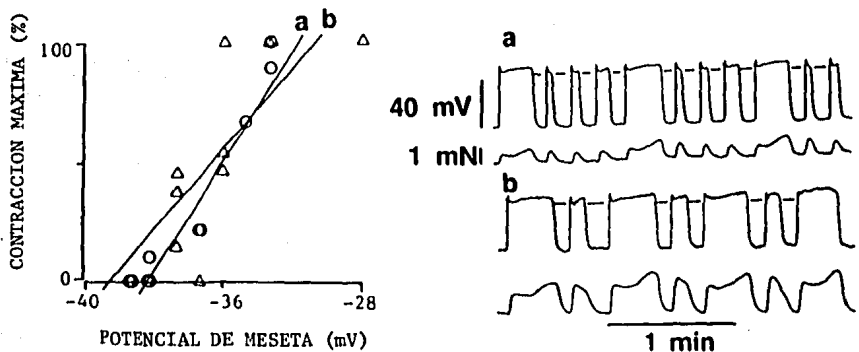


Figura 13. La depolarización durante la fase de meseta estuvo correlacionada con la fuerza de contracción. Los trazos superiores e inferiores en "a" y "b" (diferentes preparaciones), muestran la actividad eléctrica (mV) y mecánica (mNI), respectivamente. Los presentes registros se realizaron durante la presencia de carbacol ($10^{-7}M$).

Se observó una correlación importante (coeficiente de correlación, "a", 0.96 y "b" 0.73) entre el potencial de membrana durante la fase de meseta (potencial de meseta) y el porcentaje de la fuerza máxima desarrollada durante la segunda parte de la contracción. Las líneas fueron calculadas utilizando una regresión lineal simple.

Se presentaron oscilaciones pequeñas en la fuerza durante las contracciones fásicas, las cuales se observaron durante la estimulación con carbacol (figura 12). Estas oscilaciones se notaron en aproximadamente el 60% de las preparaciones, cuando la señal mecánica se amplificó adecuadamente. Tales oscilaciones mecánicas se correlacionaron temporalmente con las espigas observadas en la superficie del plexo mientérico y ambas ocurrieron con la misma frecuencia (20-25 cpm). Las oscilaciones mecánicas no se correlacionaron con algún evento electrofisiológico de las células de la superficie submucosa (figura 12).

Tanto la actividad eléctrica como la contractil se recuperaron después de suspender la perfusión con carbacol (figura 9). Todos los cambios inducidos por este fármaco fueron prevenidos por la presencia de atropina en el medio de perfusión ($10^{-6}M$; 4 preparaciones). Lo cual sugiere que los efectos del carbacol sobre la actividad miogénica de la capa circular son mediados por un receptor muscarínico (Bolton, 1979).

3.4. Determinación del "umbral" mecánico.

Los resultados previos sugieren que la actividad contractil del músculo circular es consecuencia tanto de la actividad de onda lenta como de las espigas. Con el propósito de probar esta sugerencia, se determinó el umbral mecánico en las células musculares de una y otra superficie de la capa circular del colon. El potencial de membrana y la fuerza muscular se midieron simultáneamente en presencia de diferentes concentraciones de

KCl, desde 25.9 hasta 45.9 mM (vease métodos y figuras 14,15,16). Las células de ambas superficies mostraron potenciales de membrana similares cuando el medio de perfusión contenía altas concentraciones de K^+ (figura 16B).

La gráfica de la figura 16B, representa el potencial de membrana como una función del logaritmo de la concentración de potasio en el medio extracelular. Esto, tanto en las preparaciones submucosas como en las mientéricas. Teóricamente, si las membranas fueran perfectamente selectivas para potasio, estas curvas tendrían una pendiente de 61 mV (a 37°C; Hille, 1984). Como se puede notar en la figura 16B, la relación entre el potencial de membrana y el logaritmo de la concentración de potasio no es lineal. Al parecer la permeabilidad de las membranas al potasio incrementa con la depolarización. Los valores promedio de las respuestas a concentraciones altas de potasio (desde 25.9 hasta 45.9 mM), se ajustaron con un modelo de regresión lineal. La pendiente de la mejor recta calculada fue de 83 y 65 mV para las preparaciones submucosas y mientéricas, respectivamente. Por debajo de 25.9 mM de potasio extracelular la pendiente es menor para los dos tipos de preparaciones (figura 16B).

En 3 de las 8 preparaciones submucosas y en 2 de las 4 mientéricas, incrementos pequeños en el tono se observaron con una concentración de 25.9 mM KCl, cuando el potencial de membrana era de aproximadamente -46 mV (figura 16). El tono se incrementó en todas las preparaciones cuando éstas se depolarizaron hasta

aproximadamente -41 m, en presencia de 30.9 mM of KCl. Un agudo incremento en el tono se observó cuando las preparaciones se depolarizaron adicionalmente (figuras 16). Ninguna diferencias significativas se observó en el umbral mecánico entre las preparaciones submucosas (-45 ± 1.4 mV; 8 preparaciones) y mientéricas (-42 ± 1 mV; 4 preparaciones). Adicionalmente, un umbral mecánico similar (-44 ± 1.3 mV; 2 preparaciones) se calculó en preparaciones de la capa circular completa. El potencial mecánico en las 14 preparaciones fue de -44 ± 0.9 mV.

3.5. Mecanismos de acción de carbacol.

Los cambios de la actividad eléctrica y mecánica inducidos por el carbacol sugieren que este fármaco provoca un incremento en el flujo de calcio al interior de las células. Por tal razón, decidimos estudiar los efectos de bloquear el flujo de calcio con D600 (10^{-6} M) sobre la actividad eléctrica provocada por carbacol (figura 17). En la superficie submucosa, el D600 disminuyó ($P < 0.05$, 4 preparaciones) la amplitud de la meseta (desde un valor promedio de 39.5 ± 2.1 hasta 30.5 ± 2.7 mV), la amplitud de la depolarización inicial (desde 46.5 ± 2.9 hasta 32.5 ± 2.8 mV), la tasa promedio de la depolarización inicial (desde 110 ± 7 hasta 75 ± 12 mV/s) y la duración de la onda lenta (desde 8.3 ± 0.3 hasta 2.7 ± 0.2 s). Por otro lado se observó un incremento significativo de la frecuencia de las ondas lentas (desde 3.8 ± 0.3 hasta 5.7 ± 0.2 cpm) y del potencial de meseta (desde -32 ± 0.8 hasta 40.0 ± 1.5 mV). Ningún cambio significativo se observó en el potencial de membrana (de -71.5 ± 2.8 a -70.5 ± 3.3 mV).

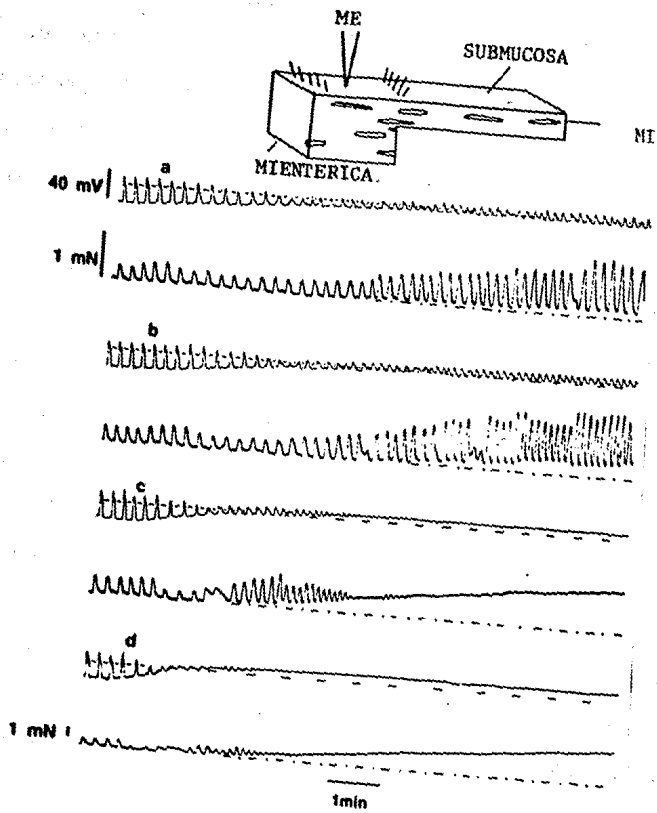


Figura 14. Depolarización celular inducida por potasio en la superficie submucosa y la actividad mecánica asociada. Los trazos superiores e inferiores (e "a"-d") representan el potencial de membrana (mV) y la actividad contractil (mN), respectivamente de una preparación "submucosa". Los registros eléctricos se realizaron en diferentes células. Al inicio de cada trazo empieza la perfusión con una solución de Krebs con distintas concentraciones de potasio ("a", 25.9 "b", 30.9, "c", 40.9; "d", 45.9 mM). El esquema superior representa la preparación "mientérica"; ME, microelectrodo; MI, miógrafo.

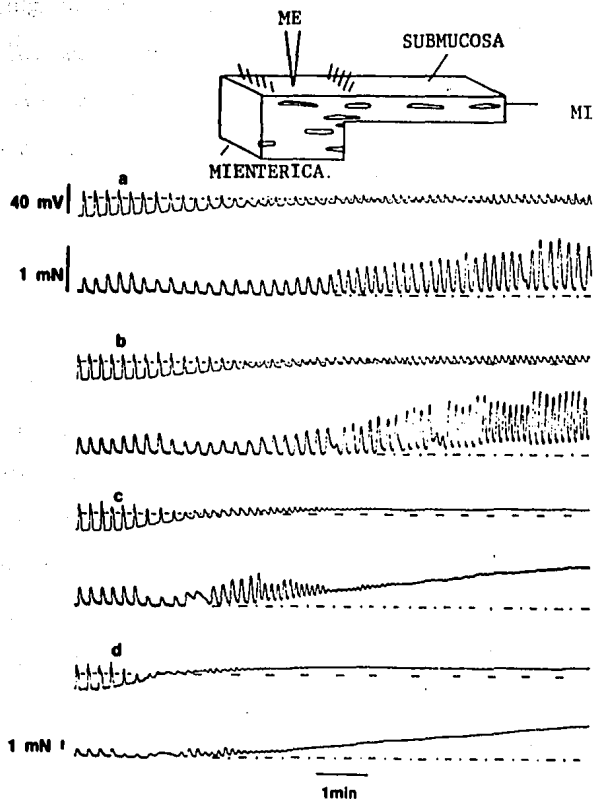


Figura 14. Depolarización celular inducida por potasio en la superficie submucosa y la actividad mecánica asociada. Los trazos superiores e inferiores (en "a"- "d") representan el potencial de membrana (mV) y la actividad contractil (mN), respectivamente de una preparación "submucosa". Los registros eléctricos se realizaron en diferentes células. Al inicio de cada trazo empieza la perfusión con una solución de Krebs con distintas concentraciones de potasio ("a", 25.9; "b", 30.9, "c", 40.9; "d", 45.9 mM). El esquema superior representa la preparación "mientérica"; ME, microelectrodo; MI, miógrafo.

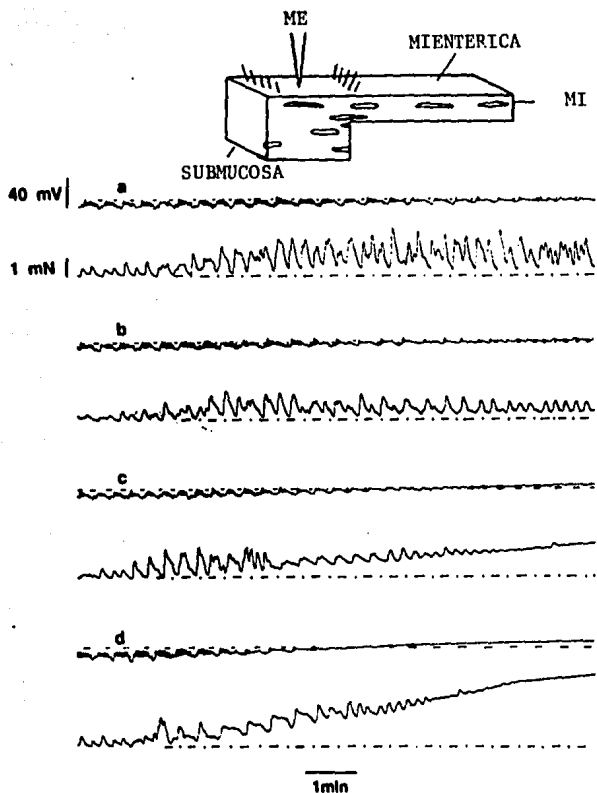


Figura 15. Depolarización celular inducida por potasio en la superficie del plexo mientérico y la actividad mecánica asociada. Los trazos superiores e inferiores (en "a"- "d") representan el potencial de membrana (mV) y la actividad contractil (mN), respectivamente de una preparación "mientérica". Los registros eléctricos se realizaron en la misma célula. Al comienzo de cada trazo se inició la perfusión con solución de Krebs con distintas concentraciones de potasio ("a", 25.9; "b", 30.9, "c", 40.9; "d", 45.9 mM). El esquema superior representa la preparación "submucosa"; ME, microelectrodo; MI, miógrafo.

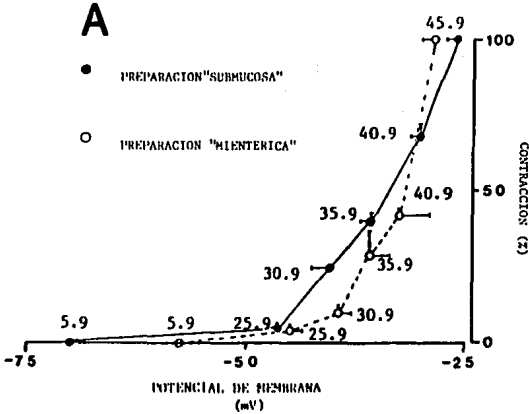
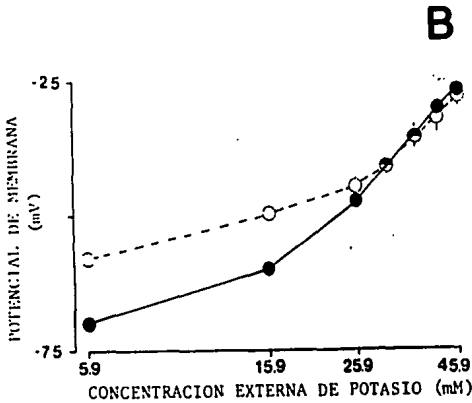


Figura 16. Las relaciones fuerza-tensión en las preparaciones submucosa y mientérica fueron similares. A. muestra la correlación entre el potencial de membrana, en diferentes concentraciones de potasio (valores dentro de la gráfica expresados en mM) y la máxima contracción tónica asociada.

B. Efectos de las concentraciones elevadas de potasio sobre el potencial de membrana de las células de la superficie submucosa y de la del plexo mientérico.

Los círculos representan los valores promedios de 8 preparaciones "submucosas" y 4 mientéricas. Las barras representan el error estandar de la media.



En la superficie del plexo mientérico, la actividad tipo espiga que se observó durante la presencia de carbacol se eliminó completamente por la presencia del D600 (figura 17; 4 preparaciones). La amplitud de la meseta no mostró cambios y la ondas lentas surgieron en preparaciones (n=3) donde previamente eran indistinguibles. Estos datos sugieren que la presencia de espigas enmascara las ondas lentas durante la estimulación con carbacol. El D600 no modificó al potencial de membrana. Las contracciones desaparecieron dentro de los siguientes 15 min después de comenzar la perfusión con el D600 (figura 17).

A excepción de la depolarización el bloqueo del flujo de calcio previno todos los efectos inducidos por el carbacol sobre las actividades eléctrica y mecánica de la preparación (figura 18). La depolarización alcanzó la misma magnitud en ausencia (8.5 ± 1 mV) o en presencia del D600 (7.8 ± 0.7 mV; 4 preparaciones).

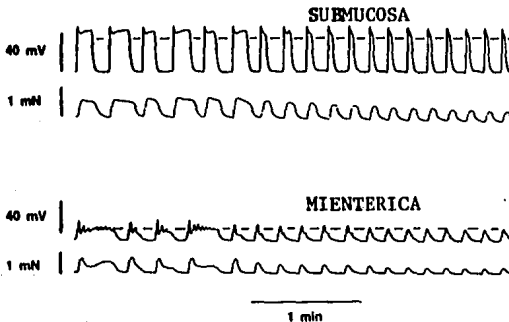


Figura 17. D600 revirtió los cambios en las actividades eléctrica y mecánica inducidos por el carbacol. Los trazos superiores e inferiores representan la actividad eléctrica intracelular (mV) y la actividad mecánica (mN) del músculo circular, respectivamente. Los registros fueron realizados en presencia de carbacol (10^{-7} M). El D600 (10^{-6} M) se agregó al inicio de los trazos.

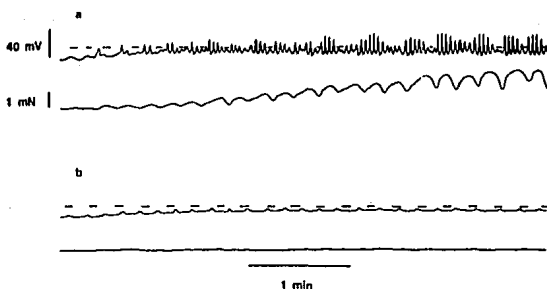


Figura 18. La depolarización inducida por carbaccol no fue prevenida por el bloqueo del flujo de calcio hacia el interior de la célula. Los trazos superiores e inferiores en "a" y "b" representan la actividad eléctrica intracelular (mV) y la actividad mecánica (mN) del músculo circular, respectivamente. Ambos registros muestran los cambios en las actividades eléctrica y mecánica después de agregar el carbaccol ($10^{-7}M$) al principio de los trazos. Los registros provienen de la misma preparación, en Krebs normal ("a") y en presencia de D600 ($10^{-6}M$; "b").

Con el propósito de determinar un posible cambio en la conductancia de la membrana como mecanismo de acción del carbaccol se valoró "resistencia de la membrana" ("membrane input resistance") utilizando las pendientes de las relaciones corriente/voltaje. La corriente se inyectó corriente mediante electrodos extracelulares (Abe y Tomita, 1968). Es importante mencionar que varias fuentes de error, identificadas por Bolton (1976), son comunes en el uso de esta técnica especialmente cuando se trata de músculo espontáneamente activo. Un error particularmente importante es introducido cuando los puntos de registro y de inyección de corriente difieren apreciablemente, en tal situación cualquier incremento en la amplitud de los potenciales electrotónicos es subestimado. Una fuente de error menos importante surge por la posibilidad de un cambio en la resistencia interna (determinada por la suma de resistencias

intercelulares) provocado por el carbacol (Bolton, 1976), lo cual afectaría la cantidad de corriente inyectada, la conducción de los potenciales electrotónicos y por consiguiente, la amplitud de los potenciales electrotónicos.

En el presente estudio intentamos disminuir al máximo estas fuentes de error, midiendo el potencial de membrana en la misma célula y a una distancia menor de 2 mm de la placa de estimulación y en algunos experimentos hasta 0.1 mm. Lo cual corresponde a un valor menor que la constante de espacio de este tejido (2.6 mm; Huizinga and Chow, 1988). Otra fuente de error proviene de la no linealidad de la relación corriente/voltaje, este error se evitó al considerar únicamente los cambios de pendientes de las porciones lineales de las curvas de corriente/voltaje (Bolton, 1976).

En las células de la superficie submucosa se provocaron potenciales electrotónicos por aplicar pulsos de corriente hiperpolarizante durante el potencial de membrana de reposo. Mientras que se indujeron potenciales electrotónicos durante la fase de meseta al aplicar corriente depolarizante (figura 19). Las pendientes de las curvas de corriente/voltaje durante la fase de meseta fueron significativamente más pequeñas (6.0 ± 0.3 mV/[V/cm]) que aquellas obtenidas durante el potencial de membrana de reposo (20.8 ± 2.5 mV/[V/cm]; $P < 0.001$; $n = 14$ células, 9 preparaciones), lo cual reveló la presencia de una alta conductancia de la membrana durante la fase de meseta. Es probable que esto sea resultado de la presencia de una

conductancia rectificante de salida, también observada en el músculo circular del estómago (Szurszewski, 1978). Para evaluar cualquier posible cambio en la resistencia de la membrana y debido a la presencia de esta conductancia, en este estudio consideraremos únicamente los cambios en la porción lineal de las curvas de corriente/voltaje en su cuadrante hiperpolarizante. Las pendientes de las curvas de corriente/voltaje para pulsos hiperpolarizantes, se incrementaron significativamente ($P < 0.01$; $n = 15$ células 9 preparaciones) durante la estimulación con carbacol, desde 22.8 ± 2.9 hasta 27.2 ± 3.4 mV/[V/cm], sugiriendo un incremento en la resistencia de la membrana. Adicionalmente, durante la presencia de carbacol, los potenciales electrotónicos provocados durante la fase de meseta alcanzaron un nivel aún más depolarizado; tal situación podría indicar inhibición de la conductancia saliente rectificante (figura 19).

En la superficie del plexo submucoso, las pendientes de las curvas de corriente/voltaje obtenidas con pulsos hiperpolarizantes también se incrementaron durante la aplicación del carbacol ($P < 0.01$; $n = 15$ células, 10 preparaciones), desde 27.8 ± 3.2 hasta 32.3 mV/[V/cm]; sugiriendo un incremento de la resistencia de la membrana (figura 20). La presencia de actividad tipo espiga dificultó la cuantificación de los potenciales electrotónicos para pulsos depolarizantes. También en presencia del D600, se observó un incremento similar en la pendiente desde 26.8 ± 1.7 hasta 30.5 ± 1.8 mV/[V/cm] ($n = 6$ células, 4 preparaciones). En ausencia de actividad tipo espiga, se observó una fuerte

rectificación saliente en potenciales menores de -50 mV. En presencia de carbacol, la depolarización alcanzada en el momento de la aplicación de la corriente, durante la fase de meseta fue siempre más grande que la observada durante la perfusión con Krebs normal. Esto podría indicar una inhibición de la conductancia saliente rectificante (figura 21).

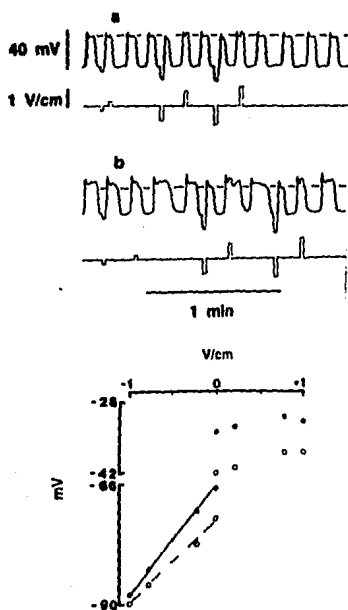


Figura 19. El carbacol incrementó la resistencia de la membrana en células de la superficie submucosa. Los trazos superiores e inferiores en "a" y "b" representan la actividad eléctrica intracelular (mV) y la intensidad de campo eléctrico (V/cm), respectivamente. "a", registros en Krebs normal y "b" en presencia de carbacol (10^{-7} M), ambos registros se obtuvieron en la misma célula.

La gráfica relaciona la intensidad de campo en el compartimento de estimulación y el potencial de membrana durante los pulsos de corriente hiperpolarizante antes (círculos claros) y durante la presencia de carbacol (círculos llenos). El incremento en la pendiente sugiere un incremento de la resistencia de la membrana durante la presencia del carbacol. Note se la fuerte rectificación saliente en el potencial de meseta.

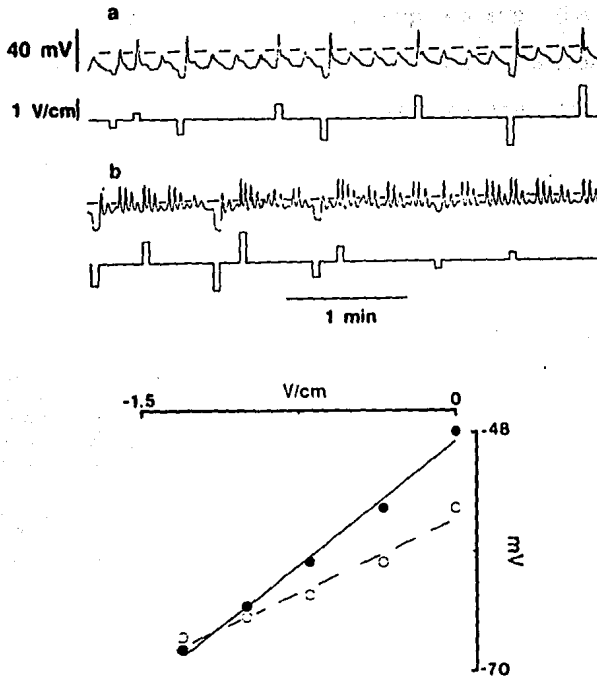


Figura 20. Carbaccol incremento la resistencia de la membrana en la superficie del plexo miéntérico. Los trazos superiores e inferiores en "a" y "b" representan registros simultáneos del potencial de membrana (mV) y de la intensidad de campo eléctrico (V/cm), respectivamente. la porción "a" muestra la actividad en solución normal de Krebs y la porción "b" en presencia de carbaccol ($10^{-7}M$) en la misma célula. Se indujeron espigas por pulsos de corriente depolarizante, durante la apertura de pulsos hiperpolarizantes y por la presencia de carbaccol.

La gráfica relaciona la intensidad de campo eléctrico en el compartimiento de estimulación y el potencial de membrana durante los pulsos de corriente hiperpolarizante antes (círculos claros) y en la presencia de carbaccol (círculos llenos). El incremento en la pendiente sugiere un incremento de la resistencia entrante de la membrana durante la presencia del carbaccol.

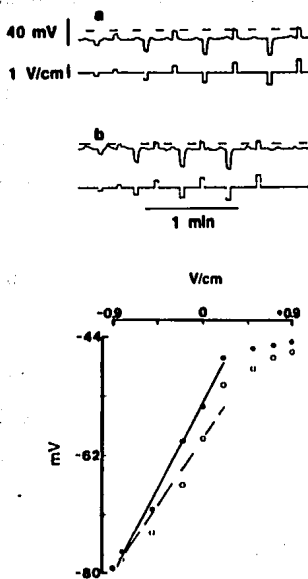


Figura 21. La depolarización inducida por carbacol en la presencia de D600, es acompañada por un incremento en la resistencia de la membrana. Los trazos superiores e inferiores en "a" y "b" representan la actividad eléctrica intracelular (mV) y la intensidad de campo eléctrico (V/cm), respectivamente. En "a", los registros se realizaron en presencia de Krebs normal y en "b", en presencia de carbacol ($10^{-7}M$). Ambos registros fueron realizados en la presencia de D600 ($10^{-6}M$) y provienen de la misma célula de la superficie del plexo mientérico. "a", se realizó solo en presencia de D600 y "b", en D600 más carbacol ($10^{-7}M$).

La gráfica relaciona el potencial de campo en el compartimento de estimulación y el potencial de membrana durante los pulsos de corriente hiperpolarizante antes (círculos claros) y en presencia de carbacol (círculos llenos). El incremento en la pendiente sugiere un incremento de la resistencia entrante de la membrana durante la presencia del carbacol. Nótese la fuerte rectificación saliente en potenciales de membrana menos negativos que -50 mV.

4. Efectos del TEA sobre las actividades eléctrica y mecánica del músculo circular.

4.1. Efectos del TEA sobre la actividad eléctrica de células de ambas superficies.

El TEA (30 mM) provocó una depolarización de magnitud similar en ambos grupos de células (figuras 22a-c, 23a-c; Cuadro II) y un incremento en la amplitud de los potenciales electrotónicos (figura 24). Esto se interpretó como el resultado de una disminución de la conductancia de la membrana. La frecuencia de las ondas lentas no se modificó. Tanto el potencial de membrana como la amplitud de meseta se disminuyó, mientras que la duración se aumentó en ambas superficies. También la amplitud y la tasa de cambio de la depolarización inicial se incrementó significativamente en las células de la superficie del plexo mientérico. Este incremento en la amplitud de la depolarización inicial fue dependiente de un incremento en el tamaño de la espiga. Además, en esta superficie el incremento en la duración de onda lenta provocado por el TEA únicamente fue evidente en células con una onda lenta de amplitud mayor a 4 mV, es decir en 5 de las 9 preparaciones. En el resto, la duración de la meseta no pudo ser distinguida en presencia de TEA (figura 23b,c).

En lo relativo a la superficie del plexo mientérico, en presencia de TEA, 8 de las 9 preparaciones mostraron espigas, usualmente en ráfagas. Cada ráfaga de espigas estuvo sobreimpuesta sobre las ondas lentas (figura 23a) y se presentó en una forma correlacionada con la contracción de la tira de músculo

circular (figura 23b,c). La amplitud de las espigas osciló desde 5 hasta 55 mV, su duración de 0.1 a 4.0 s y su frecuencia desde 20 hasta 28 cpm. En la superficie submucosa, las espigas se observaron únicamente en células de 2 de 7 preparaciones. Las espigas se observaron como parte de una depolarización inicial (notada por la presencia de un punto de inflexión) y sobre la fase de meseta en una de las tiras musculares (figura 22c,24b).

4.2. Correlación entre la actividad eléctrica de ambas superficies y la contracción del músculo circular.

En todas las preparaciones, las ondas lentas en ambas superficies y la contracción asociada mostraron una duración similar y frecuencia idéntica. La correlación entre la duración de las ondas lentas y contracción muscular se observó en presencia tanto Krebs normal como de TEA (coeficientes de correlación >0.8). El TEA aumentó la fuerza de contracción desde un promedio de 0.19 ± 0.03 hasta 1.26 ± 0.45 mN (16 preparaciones). El desarrollo de espigas en una u otra superficie se acompañó siempre de fuertes contracciones musculares (figuras 22c,23a-c,25). Sin embargo, no se encontró correlación entre algunas contracciones con alguna actividad eléctrica, en particular en la superficie submucosa (figura 26). Por ejemplo, las pequeñas oscilaciones en la tensión muscular durante las contracciones fásicas. Sin embargo, dichas oscilaciones mecánicas se presentaron con la misma frecuencia que las espigas registradas en la superficie del plexo mientérico (figura 26).

C U A D R O II

PARAMETROS DE LA ACTIVIDAD ELECTRICA DE CELULAS
DE AMBAS SUPERFICIES ANTES Y DURANTE LA PRESENCIA DE TEA

| | S u b m u c o s a (n=10) | | M i e n t é r i c a (n=13) | |
|---------|--------------------------|--------------|----------------------------|------------------------|
| | Control | En TEA | Control | En TEA |
| PR mV | -71.3 ± 1.8 | -64.6 ± 2.0 | -60.0 ± 2.1 | -52.5 ± 1.8 |
| P< | | 0.001 | | 0.01 |
| FR cpm | 4.3 ± 0.2 | 4.2 ± 0.2 | 4.7 ± 0.2 | 4.6 ± 0.2 |
| P< | | NS | | NS |
| AD mV | 40.0 ± 1.9 | 41.8 ± 3.1 | 17.8 ± 3.2 | 28.9 ± 3.4 |
| P< | | NS | | 0.01 |
| TC mV/s | 75.5 ± 12.5 | 162.4 ± 57.0 | 13.0 ± 3.5 | 32.7 ± 6.2 |
| P< | | NS | | 0.01 |
| PM mV | -38.0 ± 1.2 | -33.6 ± 1.2 | -50.6 ± 1.4 | -43.8 ± 1.4 |
| P< | | 0.005 | | 0.001 |
| AM mV | 33.3 ± 1.7 | 30.8 ± 2.3 | 9.6 ± 1.2 | 8.5 ± 1.5 |
| P< | | 0.05 | | 0.05 |
| DU s | 4.9 ± 0.4 | 6.6 ± 0.4 | 4.5 ± 0.3 | 5.7 ± 0.5 ^e |
| P< | | 0.05 | | 0.005 |

PR, Potencial de membrana de Reposo.

FR, Frecuencia de las ondas lentas.

AD, Amplitud de la Depolarización inicial.

TC, Tasa de Cambio promedio.

PM, Potencial de Meseta.

AM, Amplitud de la Meseta.

DU, DURación de las ondas lentas.

P, Valores obtenidos con la prueba t correlacionada.

n = número de células.

^e, n=9

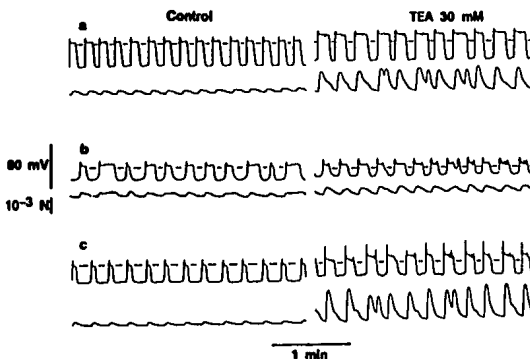


Figura 22. Efectos del tetraetilammonio sobre la actividad eléctrica en la superficie submucosa. Los trazos superiores e inferiores ("a"- "c") representan registros simultáneos del potencial de membrana (mV) de células de la superficie submucosa y la tensión (mN) desarrollada por la tira de músculo circular, respectivamente. Los trazos a la izquierda corresponden a registros control de 3 diferentes tiras musculares. Los registros a la derecha se efectuaron en las mismas células que los controles pero, 5 min después de agregar tetraetilammonio (30 mM) a la solución de Krebs. La depolarización durante la fase de meseta este asocia con un incremento en la fuerza de contracción. Adicionalmente en "c", se observan espigas sobrepuestas en la meseta, las cuales generan actividad mecánica.

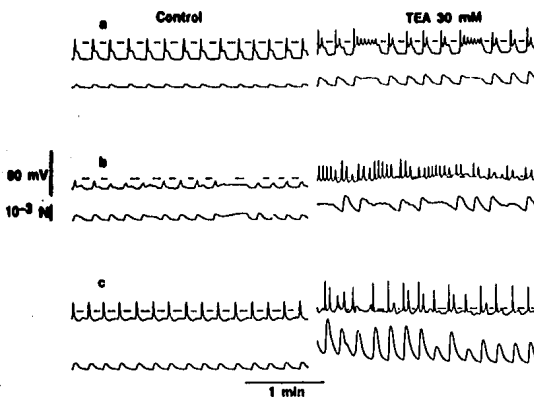


Figura 23. Efectos del tetraetilammonio sobre la actividad eléctrica en la superficie del plexo mientérico. Los trazos superiores e inferiores ("a"- "c") representan registros simultáneos del potencial de membrana (mV) de células de la superficie del plexo mientérico y la tensión (mN) desarrollada por la tira de músculo circular, respectivamente. Los trazos a la izquierda corresponden a registros control provenientes de 3 distintas preparaciones; mientras que los de la derecha registros a la derecha se efectuaron en las mismas células que los controles pero, 5 min después de haber agregado tetraetilammonio (30 mM) a la solución de Krebs. El tetraetilammonio indujo espigas las cuales generan actividad mecánica.

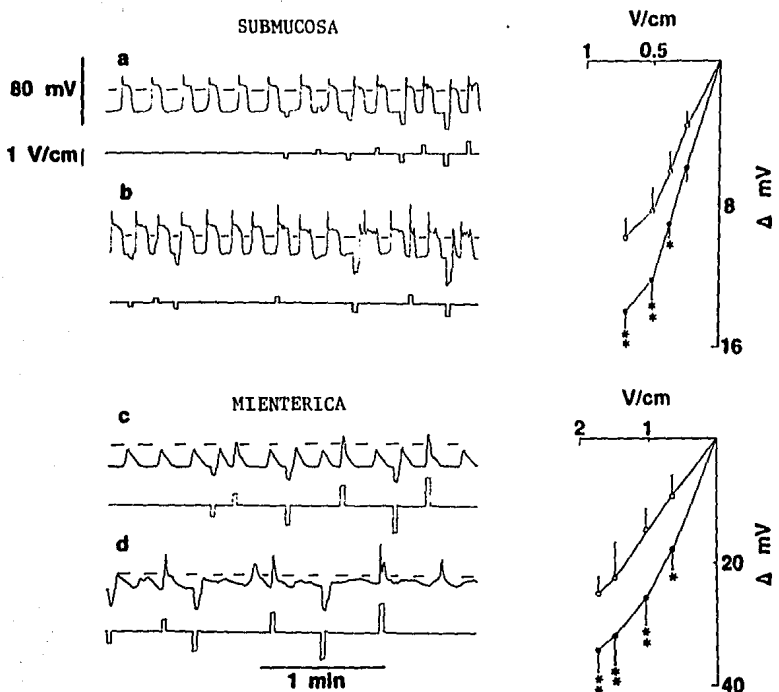


Figura 24. El tetraetilamonio incrementa la resistencia de la membrana en células de ambas superficies. Los trazos superiores e inferiores ("a"- "d") representan la actividad eléctrica intracelular (mV) y la intensidad de campo eléctrico (V/cm), respectivamente. Las porciones "a" y "c", son registros realizados en presencia de Krebs normal. Mientras que "b" y "d", se realizaron en las mismas células, 5 minutos después de iniciar la perfusión con tetraetilamonio (30 mM)..

Las gráficas relacionan el potencial de campo (V/cm) en el compartimento de estimulación, con la amplitud de los potenciales electrotonicos (mV; gráfica superior, n=4 e inferior, n=6), durante la perfusión con Krebs normal (círculos claros) y durante la perfusión con tetraetilamonio (círculos llenos). Las barras indican el error estandar de la media y los asteriscos los valores de P: * < 0.05, ** < 0.01.

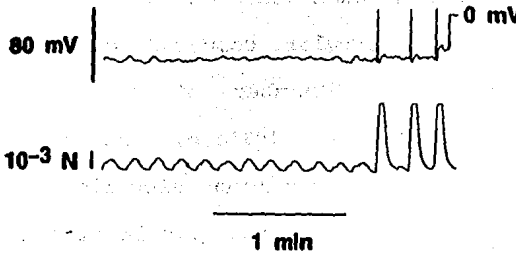


Figura 25. Espigas generan actividad mecánica en el músculo circular. El trazo superior muestra el potencial de membrana registrado intracelular (mV) de una célula de la superficie del plexo mientérico. El trazo inferior, corresponde a la tensión (mN) muscular. Los registros se efectuaron en presencia de 30 mM de tetraetilamonio. Las espigas que se presentaron en presencia de tetraetilamonio se asociaron con fuertes contracciones.

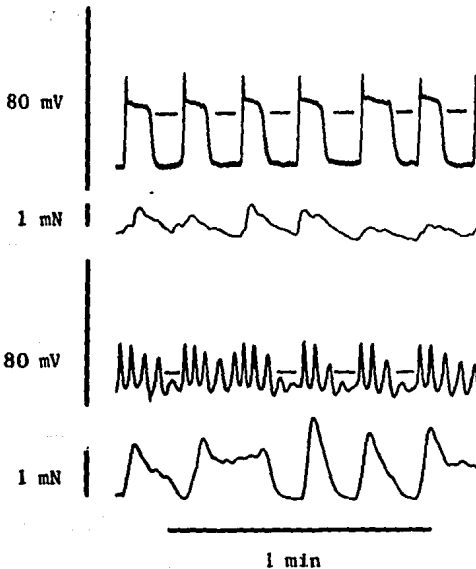


Figura 26. Pequeñas oscilaciones en la tensión, durante las contracciones fásicas estas correlacionadas con la actividad espiga en la superficie del plexo mientérico. Los trazos superiores e inferiores en "a" y "b" representan la actividad eléctrica intracelular (mV) y la actividad mecánica del músculo circular (mN), respectivamente. Los registros se realizaron - 5 minutos después de haber iniciado la perfusión con tetraetilamonio (30 mM). Oscilaciones pequeñas en la tensión, las cuales se presentaron durante las contracciones fásicas, no se correlacionaron con alguna actividad eléctrica en la superficie submucosa ("a"). Las oscilaciones en la tensión, con una frecuencia similar, son generadas por las espigas observadas en la superficie del plexo mientérico ("b").

DISCUSION

Se observaron diferencias marcadas tanto en el potencial de membrana como en la actividad de onda lenta de las células de una y otra superficie del músculo circular. Comparada con la más estudiada superficie submucosa (Chamber et al., 1984; El-Sharkawy, 1983; Hara y Szurzewski 1981a,b; Sanders and Smith, 1986; Smith et al., 1987a,b), la actividad eléctrica de la superficie del plexo mientérico se caracterizó por la presencia de una membrana celular menos polarizada (lo cual resultó, en un gradiente de voltaje de 10 mV), la presencia de un componente tipo espiga de una amplitud mayor a 10 mV en el ~ 35% de las preparaciones; Además de una menor amplitud de la meseta y de la depolarización inicial de las ondas lentas.

La heterogeneidad en la actividad eléctrica dentro de esta capa muscular muestra que existen al menos dos diferentes tipos de células en ella. Aquellas con una membrana más polarizada que generan depolarizaciones grandes durante la fase de meseta y aquellas que presentan depolarizaciones pequeñas durante y espigas durante esta fase. Una heterogeneidad morfológica en los componentes celulares de este músculo fue reportada recientemente (Berezin et al., 1988); en la superficie submucosa, se describió la presencia de un plexo de células de Cajal. El hecho de que las ondas lentas desaparecieron después de la extirpación de una delgada capa de células de la cara submucosa (Durdle et al., 1983; Smith et al., 1987a), sugiere que las ondas lentas de gran amplitud son generadas por las células intersticiales de Cajal. De

acuerdo con esta sugerencia, grandes ondas lentas son registradas en el interior de estas células intersticiales (figura 27).

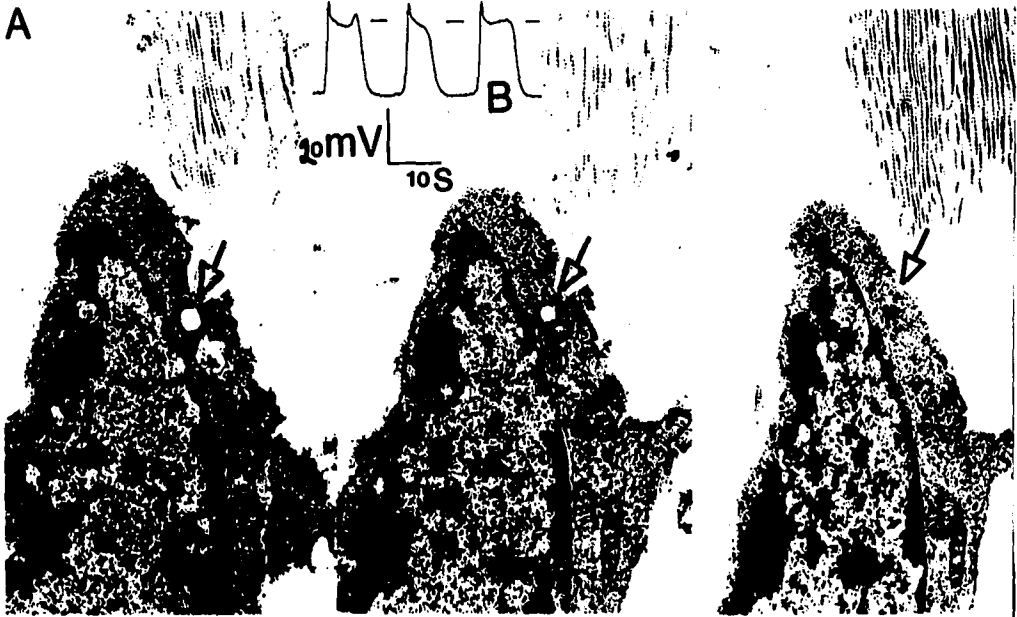


Figura 27. Ondas lentas de gran amplitud pueden ser registradas dentro de las células intersticiales de Cajal. A. Electromicrografías seriadas de una célula intersticial de Cajal dentro de la cual se realizó el registro mostrado en B. Los dos cortes de la derecha muestran una pequeña lesión circular en el citoplasma (indicadas por las flechas), a la derecha del núcleo celular. Esta se ocasionó al fijar el tejido con glutaraldehído (al 2%) mientras se mantenía el microelectrodo en el interior de la célula. Los cortes histológicos fueron efectuados en un plano perpendicular al trayecto del microelectrodo. El corte a la izquierda es el más superficial. Se inyectó por microiontoforesis azul de metileno, haciendo pasar corriente anódica (usando una corriente de 200 μ A) a través del microelectrodo. Esta inyección se realizó durante 8 min, comenzando 5 min antes de la perfusión con glutaraldehído. En la periferia de la lesión citoplasmática se observa la presencia de un material más electrodensó que el resto del citoplasma, el cual probablemente corresponde al azul de metileno. En la migrafiya de la derecha (la más profunda de las tres) la lesión ha desaparecido y solo se observa el material más electrodensó en el citoplasma (flecha). Estas observaciones son datos de un estudio realizado por Huizinga, Berezin y Barajas-López (manuscrito en preparación).

La amplitud de las ondas lentas disminuye exponencialmente a través del grosor de la capa muscular, lo cual sugirió propagación pasiva de las ondas lentas hacia el plexo mientérico (Smith et al., 1987a). Esta propagación pasiva explica la pequeña meseta, característica de las células de la superficie del plexo mientérico. Sin embargo, la propagación pasiva no explica la gran depolarización inicial (-2.5 veces mayor que la amplitud de la meseta) registrada en el -35% de las preparaciones y la cual es dependiente de la presencia de espigas. La desaparición de las espigas ocasionada por la presencia del D600, sugiere que ésta es mediada por el flujo de calcio al interior de las células. Así, la propagación pasiva de las ondas lentas dentro de la capa muscular circular induce cambios regenerativos en el potencial de membrana, como se mostró que ocurre en la capa circular del estómago (Bauer et al., 1985). El hecho de que las espigas son aumentadas durante la presencia de TEA indica que la propagación de estos cambios es regulada por la presencia de la conductancia saliente sensible al TEA.

El TEA (30 mM) disminuyó el potencial de membrana e incrementó la resistencia de la membrana de una manera similar en ambas superficies. Estos efectos del TEA son consistentes con el bloqueo de una conductancia al potasio, lo cual es el mecanismo de acción del TEA en otras células musculares (Hille, 1984; Tomita, 1982; Snape y Tan, 1987). También el TEA disminuyó el potencial de meseta e incrementó la duración de las ondas lentas en células de ambas superficies, sugiriendo con ello que una

conductancia al potasio sensible al TEA esta involucrada en la regulación del potencial de meseta y en la terminación de las ondas lentas, de una forma similar a como ocurre en el estomago (Szurzewski, 1978).

El D600 disminuyó la amplitud de la meseta y la duración de las ondas lentas en la superficie submucosa. Lo que sugiere que la corriente entrante, responsable de la depolarización de meseta y de la prolongación de las ondas lentas, depende del flujo de calcio al interior de la célula. En esta superficie, parte de la depolarización inicial es también mediada por el flujo de calcio. Se observó además, una depolarización inicial de gran amplitud en presencia del D600, lo cual sugiere que otras conductancias, distintas a la sensible al D600, están involucradas en su generación.

En las células de la superficie del plexo mientérico, las ondas lentas se presentan con una meseta característica de baja amplitud, aun en células con un potencial de membrana grande (~ -70 mV). El potencial de membrana durante la meseta se presentó a un nivel más hiperpolarizado que en la otra superficie, la diferencia fue de ~ 15 mV. Estas observaciones muestran que la menor amplitud de las ondas lentas no se debe al menor potencial de membrana de las células de la superficie del plexo mientérico, como fue propuesto (Smith et al., 1987). Una explicación sería que la ausencia de mesetas de gran amplitud en esta última superficie se deba a la ausencia de una conductancia depolarizante responsable de la meseta, o a la presencia de una

corriente saliente más intensa. El D600 disminuyó la amplitud de la meseta (en la superficie submucosa) y la duración de las ondas lentas, lo cual sugirió que la depolarización durante la fase de meseta es mediada por el flujo de calcio al interior de la célula.

Además del gradiente observado durante el potencial de meseta, un gradiente de -10 mV se registró entre el potencial de membrana máximo de las células de una y otra superficie. Estos dos gradientes pueden ser importantes en la regulación de la actividad de onda lenta. El gradiente durante el potencial de membrana máximo puede estar involucrado en la iniciación de las ondas lentas grandes de las células de la superficie submucosa. Mientras, el gradiente observado durante el potencial de meseta puede estar involucrado en la terminación de tales ondas lentas.

Bauer y Sanders (1985) reportaron la existencia de gradientes eléctricos similares en el músculo circular del antro gástrico. El bloqueo de la bomba sodio/potasio con ouabaina eliminó los gradientes en potencial (Bauer y Sanders, 1986), lo cual se interpretó a favor de la hipótesis de que una diferencia en la actividad de una bomba electrogénica sodio/potasio es responsable de los gradientes de potencial. Un mecanismo similar puede estar involucrado en los gradientes eléctricos del músculo circular del colon.

El potencial de membrana disminuyó linealmente con respecto al logaritmo de la concentración externa de potasio, cuando ésta era entre 25.9 y 45.9 mM. Esto ocurrió con una pendiente de 65 mV

en las células de la superficie del plexo mientérico (figura 16B). Esta pendiente es muy cercana a la prevista por la ecuación de Nerst (61 mV, a 37°C; vease Hille, 1984), sugiriendo que las membranas de estas células se comportan casi perfectamente como un electrodo de potasio, es decir son altamente selectivas al potasio. En las células de la superficie submucosa la pendiente de la relación entre el voltaje y la concentración de potasio fue de 83 mV. Es decir 22 mV mayor que la esperada con la ecuación de Nerst. Esto podría indicar que al ser depolarizadas, las células de esta superficie incrementan su permeabilidad para otro ion, diferente al potasio, y probablemente con un potencial de equilibrio menor (menos negativo) que el del potasio. Tal conductancia iónica puede estar correlacionada con la responsable de la fase de meseta, ya que la meseta se desarrolla entre potenciales de aproximadamente -40 y -30 mV. al ser depolarizadas.

En concentraciones de potasio menores que 25 mM el potencial de membrana se aleja del potencial de equilibrio del potasio, fundamentalmente en las células de la superficie del plexo submucoso. Esto sugiere una menor permeabilidad para el potasio a bajas concentraciones de este ion. El hecho de que exista un gradiente de potencial en concentraciones bajas de potasio puede explicarse por la presencia de una corriente entrante más intensa o bien una menor conductancia al potasio en este último grupo de células con respecto al de las células de la superficie submucosa.

La medición simultanea de la depolarización y la contracción muscular, reveló un umbral mecánico de -44 mV. Este valor está dentro del rango de los umbrales mecánicos reportados en otros músculos lisos gastrointestinales (Bauer y Sanders, 1985; Hara et al., 1986; Morgan y Szurszewski, 1980). Este potencial es similar al potencial umbral de activación (-40 mV) de los canales de calcio, reportado en la tenia coli del ciego (Yoshino et al., 1988). Estudios previos reportaron la existencia de un gradiente en el umbral mecánico dentro de la capa muscular del yeyuno (Hara y Szurszewski, 1986; Morgan y Szurszewski, 1980) y del antro gástrico (Bauer y Sanders, 1985). Ningún gradiente fue observado en la capa circular del colon.

En la superficie submucosa, el umbral mecánico es rebasado por la depolarización inicial y por la meseta de las ondas lentas. Esto sucedió durante la actividad espontánea y durante la presencia de carbacol. Además, se observó una correlación buena entre la depolarización alcanzada durante la fase de meseta y la fuerza de la contracción muscular. El potencial de membrana de reposo registrado durante la estimulación con carbacol alcanzó valores bastante más negativos que el umbral mecánico; lo cual sugiere que las células de la superficie submucosa no contribuyen a incrementar el tono.

En la superficie del plexo submucoso el potencial umbral es rebasado por las espigas. Durante la estimulación con carbacol, se observaron ráfagas de espigas en estrecha correlación con la generación de la actividad mecánica fásica. Adicionalmente,

las células de la superficie del plexo submucoso parecen estar involucradas en la generación de tono. Las oscilaciones del potencial de membrana (<5 mV) y ocasionalmente las espigas (vease la figura 18a), se presentaron entre las contracciones fásicas. Estas fueron de tal magnitud que sobrepasaron el umbral mecánico y por lo tanto pueden ser responsables del incremento del tono inducido por la estimulación con carbacol en algunas de las preparaciones. Este mecanismo, el cual permitiría incrementar el tono en los músculos lisos del tracto digestivo constituye una explicación alterna para la sugerencia de que algunos canales de calcio, no sensibles al voltaje, son mediadores de la generación del tono (Morgan y Szurszewski, 1980).

La ondas lentas probablemente son generadas en células de la superficie submucosa y se propagan pasivamente hacia las células de la superficie del plexo mientérico (Smith et al., 1987). Las espigas son generadas en células de la superficie del plexo mientérico y sobreimpuestas sobre las ondas lentas. Por consiguiente, la actividad de onda lenta controla la actividad mecánica fásica directamente, cuando las ondas lentas pasan el umbral mecánico e indirectamente induciendo la generación de espigas. Registros como los mostrados en la figura 12, revelan la contribución de la actividad eléctrica de ambas superficies en la generación de la contracción del músculo circular. Así, las oscilaciones pequeñas de la tensión muscular durante las contracciones fásicas, ocurrieron con la misma frecuencia que las espigas en la superficie del plexo mientérico. En la superficie

submucosa ninguna actividad eléctrica se correlacionó con estas oscilaciones mecánicas (figura 12).

La actividad mecánica espontánea del músculo circular puede ser generada principalmente en células cercanas a su superficie submucosa. Esto ocurriría porque la actividad eléctrica espontánea presenta mayores y más prolongadas depolarizaciones en las células de la superficie submucosa. La actividad eléctrica de las células de la superficie del plexo mientérico contribuyen principalmente al desarrollo de fuerza durante estados de estimulación, cuando estas desarrollan ráfagas de espigas. Esto sugiere que los agentes estimulantes regulan la fuerza de las contracciones fásicas en dos formas: a) controlando el nivel de depolarización alcanzado durante las ondas lentas o espigas y b) controlando el número de células dentro del sincicio muscular que pasan el umbral mecánico.

Carbacol indujo cambios específicos en la actividad eléctrica que fueron inhibidos por el bloqueo del flujo de calcio: a) el incremento en la duración de las ondas lentas; b) el incremento en la depolarización durante la meseta; c) la potenciación de la actividad espiga y d) el incremento en la fuerza de contracción. Esto indica que el flujo de calcio es incrementado durante la presencia del carbacol en células de ambas superficies de la capa circular. El incremento en el flujo de calcio podría ser resultado de una acción directa sobre la conductancia al calcio (Benham et al., 1985; Bolton, 1979). Sin embargo, probablemente este no es el único mecanismo de acción

del carbacol, ya que la presencia del D600 ni inhibió ni previno la depolarización inducida por esta sustancia. Tal depolarización pudo resultar de un incremento en la corriente entrante o de una disminución en la corriente saliente. La depolarización inducida por el carbacol estuvo asociada con un incremento en la pendiente de las curvas corriente/voltaje. Esto sugiere un incremento en la resistencia de la membrana durante tal estimulación. Apoyando la hipótesis de que la estimulación muscarínica disminuye una corriente saliente, como ha sido observado ocurre en el músculo liso del yeyuno (Benham et al., 1985) y del estómago de sapo (Sims et al, 1986a,b). El incremento en la conductancia al calcio en la presencia de carbacol podría ser mediada, al menos en parte, por esta disminución en la corriente saliente. Esta hipótesis es apoyada por el hecho de que los cambios inducidos por el carbacol fueron análogos aquellos producidos por el TEA, un bloqueador de los canales de potasio (Hagiwara, 1983; Hille, 1984).

Recientemente, Smith et al., (1987a) reportaron que las células del plexo mientérico tienen un potencial de membrana de -43 mV, un nivel bastante más depolarizado que el potencial de membrana registrado en el presente estudio, -60 mV. Adicionalmente, estos autores reportaron que tales células carecían de eventos eléctricos con características de ondas lentas, o eventos sincronizados con las ondas lentas de la superficie submucosa. En un estudio subsecuente, Smith et al., (1987b) describieron la presencia de oscilaciones eléctricas

en las células de la superficie del plexo mientérico. El gran gradiente en el potencial de membrana de reposo (~ 44 mV) entre las células de las dos superficies de la capa circular y la ausencia de ondas lentas en el lado del plexo mientérico, sugieren un desacople eléctrico entre las células de ambas superficies. Las tiras de músculo usadas en estos estudios fueron preparadas de manera diferente que las usadas en el presente estudio. Preparaciones de 500 μ m de grosor fueron obtenidas mediante dos inscisiones paralelas entre si y perpendicularmente a las bandas del músculo circular (figura 3). La longitud celular en la superficie submucosa y en la del plexo mientérico de la capa circular es de tan solo ~ 250 y ~ 500 μ m, respectivamente (Berezin, Huizinga y Barajas-López, resultados no publicados), usando el "método de Gabella" (1976). Esto indica que la preparación usada por Smith et al. (1987a,b) era una monocapa, a lo más una bicapa de células, resultando en pocas probabilidades de que las células de la superficie submucosa estuviesen acopladas con las del plexo mientérico. La pobre densidad de "gap junctions" (Berezin et al., 1988) y el mayor tamaño de las células del lado del plexo mientérico podrían resultar en un daño funcional mayor en estas células. Células silentes o con oscilaciones eléctricas de alta frecuencia fueron también observadas en el presente estudio. Tales eventos estuvieron asociados con un bajo acoplamiento eléctrico (vease la figura 3). Esto solo ocurrió transitoriamente y en relativamente pocas preparaciones. El hecho de que el tamaño y la densidad de las

"gap junctions" sea mayor y que la longitud de las células en el lado submucoso sea menor, podría explicar porque los datos electrofisiológicos en este bordo del presente estudio y los reportados por Smith et al. (1987a,b) son similares.

En conclusión, evidencia experimental fue presentada acerca de la marcada heterogeneidad en la propiedades intrínsecas de células del músculo circular del colon canino. Células de la superficie submucosa, posiblemente las células intersticiales de Cajal, generan grandes ondas lentas. La propagación pasiva de las ondas lentas dentro de las células más internas del músculo circular inducen cambios regenerativos de potencial de membrana (espigas mediadas por el flujo de calcio) en células de la superficie del plexo mientérico. La generación de esta espiga es regulada (inhibida) por una conductancia al potasio, sensible al TEA. La marcada heterogeneidad en la actividad eléctrica de células de las superficies submucosa y del plexo mientérico fue más evidente en presencia de carbacol o TEA. Así, ráfagas de espigas fueron observadas en las células de la superficie del plexo mientérico mientras, ondas lentas de gran duración fueron observadas en las células de la superficie submucosa.

La contracción del músculo circular es mediada por un flujo de calcio dependiente del voltaje, el cual es activado aproximadamente en potenciales de membrana menores que -44 mV. Esta conductancia al calcio es activada durante las ondas lentas en células de la superficie submucosa y durante las espigas en células de la superficie del plexo mientérico. Carbacol

incrementó la fuerza de las contracciones fásicas al incrementar el nivel de depolarización y la duración de las ondas lentas, en las células de la superficie submucosa y al reforzar la actividad espiga en la superficie del plexo mientérico. Los cambios en la actividad eléctrica inducidos por el carbacol son mediados por un incremento en el flujo del calcio hacia el interior de las células musculares. Esto es, al menos en parte, mediado por una disminución en la conductancia al potasio. Los diferentes patrones de actividad eléctrica, espontánea o inducida por carbacol y TEA, brindan evidencia para la hipótesis de la existencia de heterogeneidad en las propiedades eléctricas de las células del músculo circular colónico.

REFERENCIAS

1. Abe, Y., y T. Tomita (1968). Cable properties of smooth muscle. *J. Physiol. Lond.* 196: 87-100, 1968.
2. Barcroft J. y F.R. Sterggerda (1929). Observations on the proximal colon of the exteriorized colon. *J. Physiol. (Lond.)*, 67: 211-220.
3. Barajas-López, C., y J. D. Huizinga (1987). Decreased potassium conductance as a possible mechanism for the action of carbachol on colonic smooth muscle. *Dig.Dis.Sci.* 32:901.
4. Barajas-López, C., y J. D. Huizinga (1988a). Heterogeneity in spontaneous and tetraethylammonium induced intracellular electrical activity in colonic circular muscle. *Pflugers Arch.* 412:203-210.
5. Barajas-López, C., y J. D. Huizinga (1988b). Different mechanisms of contraction generation in circular muscle of canine colon. *Am. J. Physiol.* en prensa.
6. Bauer, A. J., y K. M. Sanders (1985). Gradient in excitation-contraction coupling in canine gastric antral circular muscle. *J. Physiol. Lond.*, 369: 283-294.
7. Bauer A.J., J.B. Reed, y K.M. Sanders (1985) Slow wave heterogeneity within the circular muscle of the canine antrum. *J. Physiol. Lond.* 366: 221-232.
8. Bauer A.J., y K.M. Sanders (1986). Gradient in electrogenic pump activity between myenteric and submucosal circular smooth muscle cells of the canine gastric antrum. *Gastroenterol.* 91: 1021.
9. Bowes K.L., N.L. Shearin, Y.J. Kingma, y Z. J. Koles (1979). Frequency analysis of electrical activity in the dog colon. En: *Gastrointestinal motility in health and disease*. Ed. por Duthie H.L., London: MTP, 251-258.
10. Berezin I., J.D. Huizinga, y E.E. Daniel (1988). Interstitial cells of Cajal in canine colon: a special communication network at the inner border of the circular muscle. *J. Comp. Neurology*, en prensa.
11. Benham, C. D., T. B. Bolton, y R. J. Lang (1985). Acetylcholine activates an inward current in single mammalian smooth muscle cells. *Nature* 316: 345-347.
12. Bolton, T.B. The depolarizing action of acetylcholine or carbachol in intestinal smooth muscle. *J. Physiol. Lond.* 220: 647-671, 1972.

13. Bolton, T.B. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiological Rev.* 59, 606-718, 1979.
14. Bywater, R. A. R., y G.S. Taylor (1980). The passive membrane properties and excitatory junction potentials of the guinea-pig vas deferens. *J. Physiol. Lond.* 300: 303-316.
15. Cannon, W.B. (1902). The movements of the intestines studied by means of roentgen rays. *Am. J. of Physiol.*, 6: 251-277.
16. Caprilli R., L. Onori (1972). Origin, transmission and ionic dependence of colonic electrical slow waves. *Scan. J. Gastroenterol.* 7: 65-74.
17. Chamber, M.M., Y.L. Kingma, y K.L. Bowes (1984). Intracellular electrical activity in circular muscle of canine colon. *Gut*, 25: 1268-1270.
18. Chow, E. y J.D. Huizinga (1987). Myogenic electrical control activity in longitudinal muscle of human and dog colon. *J. Physiol. Lond.* 392: 21-34.
19. Christensen J., G.A. Rick, y M.D. Miller (1987). Neural specialization in the colon: A novel plexus at the circular muscle-submucosal interface. *Gastroenterol.* (Abstr.) 92: 1346.
20. Durdle N.G., Y.J. Kingma, K.L. Bowes, y M.M. Chambers (1983). Origin of slow waves in the canine colon. *Gastroenterol.*, 84: 375-382.
21. El-Sharkawy, T. Y., y J. H., Szurszewski (1978). Modulation of canine antral circular smooth muscle by acetylcholine, noradrenaline and pentagastrin. *J. Physiol. (Lond.)* 279: 309-320.
22. El-Sharkawy, T. Y. (1983). Electrical activities of the muscle layers of the canine colon. *J. Physiol.* 342: 67-83.
23. Gabella, G. (1976). Quantitative morphological study of smooth muscle cells of the guinea pig taenia coli. *Cell tissue Res.* 170:161-186.
24. Hagiwara, S. (1983). Membrane potential-dependent ionic channels in cell membrane. Raven Press, New York
25. Hille, B. (1984). Potassium channels and chloride channels. En: *Ionic channels of excitable membranes*, ed. por Sinauer Assoc. W.C., Sunderland Mass.

26. Hara, A., y J.H. Szurszewski (1981a). Mechanical and intracellular electrical activity of smooth muscle of the canine colon. *Gastroenterol.* 80:1169.
27. Hara, A., y J.H. Szurszewski (1981b). Intracellular electrical activity from the circular muscle of the canine distal colon. *Fed. Proc.* 40:577.
28. Hara, A., y J. H. Szurszewski (1986). Effect of potassium and acetylcholine on canine intestinal smooth muscle. *J. Physiol. Lond.*, 372: 521-537.
29. Huizinga, J. D., G. Chang, N. E. Diamant, y T. Y. El-Sharkawy (1984a). Electrophysiological basis of excitation of canine colonic circular muscle by cholinergic agents and substance P. *J. Pharm. Exp. Ther.* 231: 692-699,
30. Huizinga, J. D., G. Chang, N. E. Diamant, y T. Y. El-Sharkawy (1984b). The effects of cholecystokinin--octapeptide and pentagastrin on electrical and motor activities of canine colonic circular muscle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 62:1440-1447.
31. Huizinga, J.D., y E. Chow (1988). Electrotonic current spread in colonic circular muscle. *Am. J. Physiol.* In press.
32. Morgan, K.G., y J.H. Szurszewski (1980). Mechanism of phasic and tonic actions of pentagastrin on canine gastric smooth muscle. *J. Physiol. (Lond)* 234: E209-212.
33. Sanders KM, y Smith TK (1986). Enteric neural regulation of slow waves in circular muscle of the canine proximal colon. *J. Physiol.* 377:297-313.
34. Sims, S. M., J. V. Walsh, Jr., y J. J. Singer (1986). Substance P and acetylcholine both suppress the same K^+ current in dissociated smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 151: C580-C587.
35. Sims, S. M., J. J. Singer, y J. V. Walsh Jr. (1986). A mechanism of muscarinic excitation in dissociated smooth muscle cells. *TIPS (Suppl.):* 28-32.
36. Snape, W.J., y Tan S.T. (1987). Effect of tetraethylammonium on a evoked spike potential in feline colonic muscle. *Am. J. Physiol.* 252:G791-G796.
37. Smith, T.K., J.B. Reed, y K.M. Sanders (1987a). Origin and propagation of electrical slow waves in circular muscle of canine proximal colon. *Am J. Physiol.* 252: C215-C224.

38. Smith, T.K., J.B. Reed, y K.M. Sanders (1987b). Interaction of two electrical pacemakers in muscularis of canine proximal colon. *Am J. Physiol.* 252: C290-C299.
39. Suzuki, N., C.L. Prosser, y V. Dahms (1986). Boundary cells between longitudinal and circular layers: essential for electrical slow waves in cat intestine. *Am. J. Physiol.* 250: G287-G294.
40. Szurszewski, J.H. (1978). A study of the canine gastric action potential in the presence of tetraethylammonium chloride. *J. Physiol. Lond.* 277: 91-102.
41. Szurszewski, J.H. (1987). Electrical basis for gastrointestinal motility. En: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, ed. por L. R. Johnson. Raven Press, New York pp. 383-422.
42. Tomita, T. (1982). Ionic basis of smooth muscle action potentials. En: *Mediators and drugs in gastrointestinal motility I*, ed. por G. Bertaccini. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 79-115.
43. Yoshino, M., T. Someya, A. Nishio, y H. Yabu. Whole-cell and unitary Ca channel currents in mammalian intestinal smooth muscle cells: evidence for the existence of two types of Ca channels. *Pflugers Arch* 411: 229-231, 1988.

APENDICE A

PACEMAKER GENERATION IN COLONIC SMOOTH MUSCLE

I. ROLE OF THE SODIUM PUMP

CARLOS BARAJAS-LOPEZ, EDWIN CHOW, ADRIAAN DEN HERTOG* AND JAN D. HUIZINGA

Intestinal Disease Research Unit and Department of Biomedical Sciences,
McMaster University Hamilton Ontario Canada

Running title:

Sodium pump and colonic slow waves

Key words:

Smooth muscle, colon, electrical activity, slow waves, sodium pump,
pacemaker activity

* Visiting Professor from the University of Groningen
Dept. of Pharmacology, Groningen, The Netherlands

Correspondence address:

Jan D. Huizinga
McMaster University
Intestinal Disease Research Unit
Health Sciences Centre Room 3N5C
1200 Main Street West
L8N 3Z5 Hamilton Ontario
Canada
Phone: (416) 525 9140 ext 2590

ABSTRACT

1. The role of the sodium pump in the generation of slow wave activity in circular muscle of the dog colon was investigated using a partitioned 'Abe-Tomita' type chamber for voltage control.
2. Blockade of the sodium pump by omission of extracellular K^+ , by ouabain, or the combination of 0 mM Na^+ and ouabain, depolarized the membrane up to -40 mV and abolished the slow wave activity. Repolarization back to the control membrane potential by hyperpolarizing current restored the slow wave activity.
3. Slow waves continued to be present in Na-free solution with NaCl replaced by LiCl.
4. The depolarization induced by the procedures to block sodium pump activity was associated with an increase in input membrane resistance.
5. Current/voltage relationships in the presence of ouabain or 0 mM K^+ suggested the presence of an inward rectifier (potassium) conductance. A block of this conductance may contribute to the depolarization by ouabain.
6. Reduction of temperature depolarized the membrane, and decreased the slow wave frequency and amplitude. The slow wave amplitude was restored by repolarization of the membrane.
7. Brief depolarizing pulses evoked premature slow waves. Brief hyperpolarizing pulses terminated the slow waves.
8. We conclude that abolishment of slow wave activity by sodium pump blockade is an indirect effect of membrane depolarization and that the sodium pump is not responsible for the generation of the slow wave.
9. Our results are consistent with the hypothesis that pacemaker activity

in smooth muscle is a consequence of membrane conductance changes which are metabolically dependent.

INTRODUCTION

By actively transporting more Na^+ ions out of the cells than K^+ ions in, the Na-K pump can directly contribute to the cell membrane potential in a variety of tissues. Furthermore, oscillations in the membrane potential have been postulated to be related to cyclic activation of an electrogenic sodium pump in nerve cells (Arapetyan, 1969), beta cells of the pancreas (Atwater and Meisner, 1975) and smooth muscle (Prosser and Mangal, 1972) including circular muscle of the cat colon (Caprilli and Onori, 1972). Evidence that the sodium pump is involved in the generation of the electrical slow waves or pacemaker activity in intestinal smooth muscle has primarily been obtained from the longitudinal muscle cells of the small intestine, and was recently reviewed by Szurszewski (1987). Observations consistent with this hypothesis are: A. Slow waves disappear after blockade of the sodium pump in the cat (Conner Prosser and Weems 1974; Dahms, Prosser and Suzuki, 1987; Liu, Prosser and Job, 1969) and rabbit (El-Sharkawy and Daniel, 1975b) small intestine. In the cat it was shown that sodium pump blockade depolarized the cell more than the amplitude of the slow wave and that repolarization did not restore slow wave activity (Conner et al. 1974). B. Voltage clamp studies in the sucrose gap suggested that no membrane conductance changes occurred during the slow wave (Conner et al. 1974), and inward current oscillations were seen at the resting membrane potential level. C. Metabolic inhibition changed slow wave activity. Cooling decreased the slow wave frequency in the rabbit small intestine (El-Sharkawy and Daniel 1975a) and abolished activity in the cat (Conner Kreulen and Prosser 1976).

The aim of the present study was to elucidate the role of the

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

sodium pump in the generation of the slow waves in colonic smooth muscle, utilizing the 'Abe-Tomita' type stimulating chamber (Abe and Tomita, 1968) for voltage control. Our conclusion is that ionic permeability changes but not the sodium pump activity generate colonic pacemaker activity.

METHODS

Tissue preparation. Dogs, either male or female, were anesthetized using pentobarbital (35 mg/kg) given i.v. The colon was exposed by a midline abdominal incision. A 10 to 12 cm segment of proximal colon was removed, 5 cm distal to the ileocecal junction. The segment was placed in oxygenated Krebs solution and opened flat. Colonic contents were carefully removed. The segment was then pinned flat to the Sylgard bottom of a dissecting dish filled with oxygenated Krebs solution and the mucosa was removed. Longitudinal muscle was carefully removed by sharp dissection.

Recording of the electrical activities. Circular muscle strips, 15 mm long, were prepared by cutting them parallel to the bundles; the tissue was 1.5 mm wide over a length of 10 mm and became gradually wider to 3 mm. These strips were mounted in a partitioned stimulating chamber (Abe and Tomita, 1968) with the 1.5 mm wide section in the stimulation compartment. The length of the tissue inside the stimulation compartment was at least 8 mm (Bywater and Taylor, 1980), the end of this strip was tied to a force transducer. The electrical recordings were made in cells situated closer than 2 mm to the stimulating plate, and only from superficial cells from the submucosal surface; the microelectrode penetrated the strip perpendicularly, up to 0.1 mm under the strip surface. The strip surface was easily identified by the occurrence of a characteristic transient tip potential, thereafter the microelectrode was driven into the tissue in steps of ~ 5 μ m, using a Narishige micromanipulator, (ML-8, Medical Systems Corp., NY). At each step a short (~ 25 ms) oscillation from the preamplifier led to impalement of the cells.

Microelectrodes were prepared from 1.2 mm outside diameter glass

capillaries (WPI) and filled with 3M KCl. The tip resistances were 30-50 MK. The electrode was connected to a probe of a high impedance electrometer (M-707A, WPI). The output of the electrometer was connected to a Gould storage oscilloscope (1425, Gould, Co. Cleveland, Ohio) and a pen ink recorder (2800S Gould). The muscle strips were stimulated by a Grass S88 electrical stimulator through a stimulus isolation unit (SIU5, Grass Instruments, Co. Quincy, MA). The voltage gradient in the stimulating compartment (field strength) was measured with two silver electrodes 2 mm apart, located in the middle of the stimulating compartment. This compartment consisted of two silver plates 10 mm apart. The silver plates and the recording electrodes for the field strength were coated carefully with silver-chloride using a 0.1 N HCl solution and the Grass stimulator for generation of current. The surface of the silver-plate facing the part of the tissue in which the microelectrode was placed, in the recording compartment, was coated with M-coat A for insulation (Intertechnology Inc. Don Mills, Ont., Canada). Electrotonic potentials were induced by current pulses from 1.5 s to several minutes in duration and from 8 to 25 V applied voltage.

Solutions and drugs. Most experiments were performed in prewarmed (36.5-37.0°C) Krebs solution and equilibrated with 95% O₂ -5% CO₂. The partitioned stimulation chamber, of 6 ml capacity, was continuously perfused with Krebs solution at a constant rate (3-7 ml/min). The composition of this solution was (mM): NaCl 120.3; KCl 5.9; CaCl₂ 2.5; MgCl₂ 1.2; NaHCO₃ 20.0; NaH₂PO₄ 1.2 and glucose 11.5. The pH was 7.30-7.35.

In order to obtain Na⁺ free conditions, HEPES buffered solution was used to avoid NaHCO₃. The composition was (mM): HEPES 5, NaCl 136.4,

CaCl₂ 2.5, KH₂PO₄ 1.2, MgCl₂ 1.2, glucose 2.5. The pH was adjusted to 7.35 using KOH resulting in a final [K] of 7 mM. This affected somewhat the basal characteristics of the electrical activity (n=8): The resting membrane potential changed from -72.7 ± 1.7 to -67.5 ± 1.8 (<0.05); the upstroke amplitude from 36.7 ± 3.2 to 33.4 ± 2.9 and the average rate of rise from 196 ± 32 to 165 ± 25 mV/s. The slow wave duration and frequency remained unchanged. A sodium free solution was obtained by replacing NaCl with LiCl.

Data analysis. Slow waves consisted of a membrane depolarization (upstroke amplitude) followed by a partial repolarization, and subsequently a plateau phase, which in turn was succeeded by a complete repolarization. The plateau amplitude was the voltage difference between the resting membrane potential and the highest point of the slow wave plateau phase. The plateau potential was the actual membrane potential at this highest point of the plateau phase. The duration was measured at half-maximal plateau amplitude of the slow wave. Data were obtained usually from the same cells, before and in the presence of a drug or after ion substitution. A difference was considered significant with $P < 0.05$.

RESULTS

All experiments were performed on superficial cells of the submucosal surface of the circular muscle of the dog colon ($n=36$ preparations). The resting membrane potential of these cells was -71.0 ± 1.0 mV. Slow wave activity was omnipresent, after reaching an initial maximum depolarization (upstroke amplitude of 37.1 ± 1.4 mV) a partial repolarization to a plateau occurred. The membrane potential during the plateau (plateau potential) was -38.0 ± 1.0 mV. the slow wave duration was 3.9 ± 0.3 s, its frequency 5.1 ± 0.2 cpm. The average rate of rise of the upstroke potential was 120 ± 25 mV/s. These data are similar to those previously described (El-Sharkawy, 1983; Smith, Reed and Sanders, 1987; Huizinga and Chow, 1987; Barajas-Lopez and Huizinga, 1988). In about 26% of the strips (9 out of 36 preparations), an inflection point was noted in the upstroke of the slow wave. An initial depolarization, of 7.1 ± 0.9 mV in amplitude with an average rate of rise of 20.9 ± 3.0 mV/s was followed by a second depolarization of 32.4 ± 2.0 mV in amplitude and an average rate of rise of 127 ± 15 mV/s (figure 1).

Effects of sodium pump inhibition and depolarization

To investigate a possible role of the sodium pump in the generation of the slow wave activity, we studied the effects of sodium pump blockade by Na^+ free solution, K^+ free solution, ouabain and cooling.

Sodium pump activity depends on the presence of intracellular sodium. Perfusion of the tissue with 0 mM Na^+ will quickly deplete intracellular sodium (Friedman, 1974). The temporal correlation between the membrane potential and the upstroke amplitude after omission of extracellular Na^+ is

illustrated in figures 2 and 3, and carried out in HEPES buffered solution (see methods). A transient hyperpolarization of 4.3 ± 0.8 mV ($n=7$) was observed within 6 min after the start of the perfusion with the Na^+ -free HEPES; thereafter a gradual depolarization of the membrane occurred with a time constant of 18.3 ± 1.1 min. The membrane was depolarized from -63.3 ± 2.9 mV to -54.4 ± 2.5 mV after 20 min and to -48.9 ± 2.4 after 30 min ($P < 0.001$). Concomitantly the upstroke amplitude significantly reduced from 34.4 ± 3.5 to 20.6 ± 2.5 and to 12.6 ± 3 mV after 20 and 30 min, respectively ($P < 0.001$), with a time constant of 18.1 ± 1.9 , similar to that of the depolarization (figure 3). The average rate of rise decreased ($P < 0.001$) from 121 ± 21.9 to 13.3 ± 4.9 mV/s, 30 min later. The slow wave frequency (from 5.2 ± 0.1 to 4.8 ± 0.4 cpm), the slow wave duration (from 3.9 ± 0.3 to 5.7 ± 0.7 s), and the plateau potential (from -37.0 ± 0.8 to -35.9 ± 1.4 mV) did not change significantly.

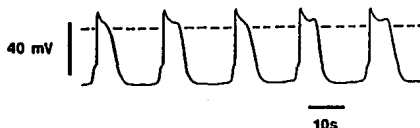


Figure 1.

Slow waves in the circular muscle layer of the canine colon usually show a fast upstroke followed by partial repolarization and a plateau phase. This figure shows a recording representing $\sim 26\%$ of the recordings in which a small depolarization preceded the slow wave. The dashed lines between the slow waves indicate the -40 mV membrane potential in this and the following figures.

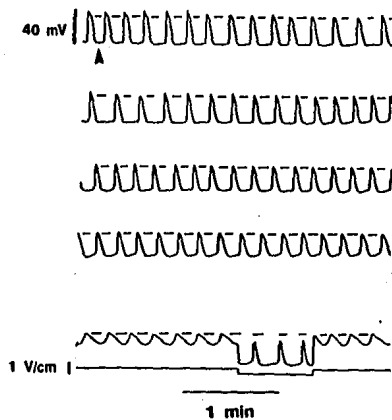


Figure 2.

Effect of 0 mM extracellular sodium.

When sodium was replaced by lithium (at arrow) the cells, after an initial small hyperpolarization, gradually depolarized and concomitantly the slow wave amplitude was reduced. The figure shows 2 sections from a continuous recording. There is a time gap of 15 min between the 4th and 5th panel. After 30 min in 0 mM Na^+ , slow wave activity continued to develop at unchanged frequency. Hyperpolarization restored the slow wave amplitude, suggesting that the decrease in amplitude was due to membrane depolarization.

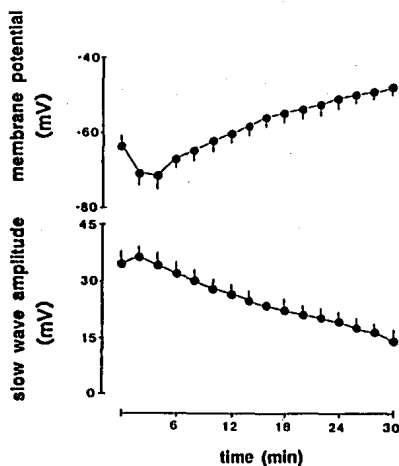


Figure 3

Temporal correlation between the membrane potential and the upstroke amplitude (slow wave amplitude) after omission of extracellular sodium. In a HEPES buffered solution, sodium was replaced by lithium, at time 0.

To investigate whether the slow wave inhibition was specifically due to Na^+/K^+ pump blockade or a consequence of the associated depolarization, the smooth muscle cells were repolarized back to the control membrane potential. Tissues were repolarized after 30 min. Current induced repolarization of the membrane potential in 0 mM extracellular Na^+ (up to -68.4 ± 2.7 mV) increased the upstroke amplitude to 26.6 ± 2.8 mV. The frequency became 4.7 ± 0.7 cpm, and the duration 2.5 ± 0.3 s ($n=5$). These data suggest that the decrease in the upstroke amplitude after omission of extracellular sodium was caused by the depolarization.

The occurrence of slow wave activity was also studied up to 2 hrs in sodium free HEPES solution in the presence of ouabain (10^{-5}M ; figure 4). The control slow wave activity occurred with a frequency of 5.7 ± 0.2 cpm, an upstroke amplitude of 43 ± 1.7 mV, a rate of rise of 121.7 ± 24.6 mV/s, and with a duration of 3.3 ± 0.6 s ($n=3$). In sodium free HEPES and ouabain (10^{-5}M), the tissues were depolarized from -72.7 ± 1.8 mV to -37 ± 2.4 mV and no slow wave activity was observed.

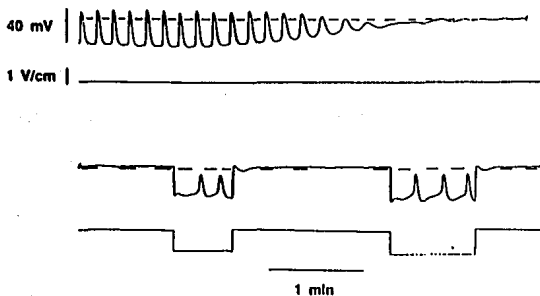


Figure 4
Sodium free solution with ouabain (10^{-5}M) abolished slow wave activity (upper panel). 60 min thereafter current induced repolarization brought back slow wave activity (lower panel).

Repolarization induced recovery of slow wave activity occurred up to 2 hr in 0 mM Na⁺ in the presence of ouabain (10⁻⁵M; figure 4). Tissues were hyperpolarized to -78±2 mV and slow wave activity occurred at 3.7±1.7 cpm, with an upstroke amplitude of 33.3±5.8 mV, and an average rate of rise of 30±5.8 mV/s, and with a duration of 2.5±0.3 s.

Sodium pump activity is also dependent on extracellular potassium, and perfusion of 0 mM K⁺ inhibits pump activity (Fleming, 1980). K⁺ free Krebs solution caused a gradual depolarization of the muscle cells from a membrane potential of -72.3±2.3 mV up to -48.0±2.8 after 20 min (n=6; figures 5 and 6). The depolarization occurred with a time constant of 6.2±0.7 min, significantly lower than that of the depolarization in Na⁺ free solution (P<0.01). After 20 min in K⁺ free solution, slow wave activity was reduced from 32.8±3.0 to 4.6±2.2 mV and completely abolished in 50% of the preparations. The reduction in upstroke amplitude occurred with a time constant of 7.2±1.5 min, not different from the time constant of the depolarization. The slow wave frequency (5.2±0.6 cpm) was similar than control (6.0±0.3 cpm). The membrane potential at the top of the remaining slow waves (-36.7±4.7 mV) was not different from the control value of the plateau potential (-39.5±2.8 mV). After 28 min the slow wave activity was completely abolished in 5 out of 6 tissues. The preparations were allowed to recover in normal Krebs solution after 28 min in K⁺ free solution. The membrane potential recovered gradually, and after 6 min complete recovery was obtained (figure 6). Concomittant with the membrane potential, the upstroke amplitude recovered 80±6%.

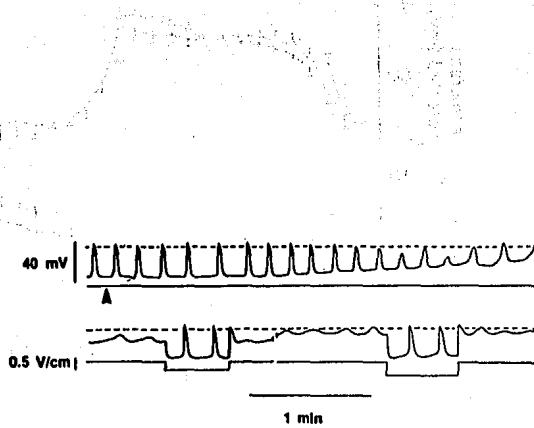


Figure 5

Effects of 0 mM K^+ Krebs on the electrical activity, and effect of current induced repolarization.

Upper panel: at arrow, K^+ was omitted, sections are shown from a continuous recording from 1 cell. The dotted lines represent -40 mV membrane potential.

Lower panel: Current induced hyperpolarization occurred at 10 and 30 min after omission of K^+ and restored slow wave activity.

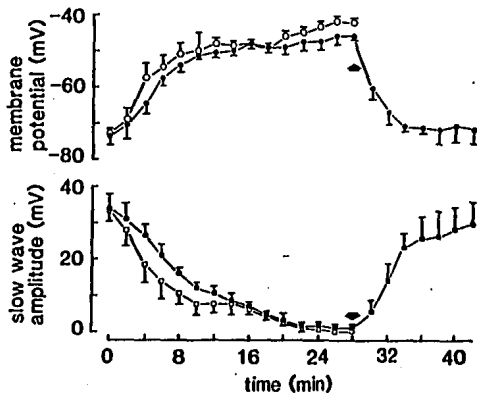


Figure 6

Temporal correlation between the membrane potential and the slow wave amplitude after addition of ouabain ($10^{-5}M$; $n=6$; open circles) and or after addition of 0 mM K^+ Krebs ($n=6$; closed circles).

At time 0, tissues were either superfused with 0 mM K^+ Krebs solution or normal Krebs with ouabain. At arrow, those strips in 0 mM K^+ were allowed to recover in normal Krebs. A direct relationship is seen between decrease in membrane potential and decrease in slow wave amplitude.

Ouabain ($10^{-5}M$) caused similar effects as K^+ free solution (figures 6 and 7). A gradual membrane depolarization developed within 10 min from a membrane potential of -70.4 ± 1.3 mV to -45.7 ± 2.5 mV, with a time constant of 4.6 ± 1.0 min not different from that of the depolarization induced by K^+ free solution. After 28 min the membrane potential was -44.6 ± 1.5 . A decrease in the upstroke amplitude occurred from 31.7 ± 1.9 mV to 1.8 ± 1.4 mV with a time constant of 4.1 ± 1.1 min, similar to that of the depolarization. The membrane potential at the top of the remaining slow waves (-41.0 ± 0.5) was not different from the control value of the plateau potential (-43.2 ± 1.4). After 30 min in ouabain, slow waves were completely blocked in all preparations.

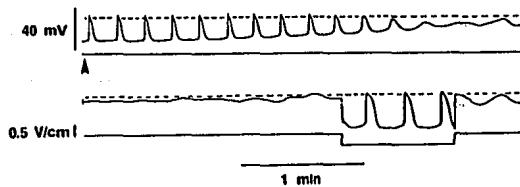


Figure 7
Effects of ouabain ($10^{-5}M$) on the electrical activity, and effect of current induced repolarization.
 Upper panel: at arrow, ouabain was added, sections are shown from a continuous recording from 1 cell.
 Lower panel: current induced hyperpolarization occurred after 30 min and restored slow wave activity.

During repolarization in 0 mM K^+ (to -70.7 ± 2.9 mV) and in the presence of ouabain (to -70.0 ± 3.5 mV), the slow wave activity was always present, even in those tissues in which the slow waves had completely disappeared (10 out of 12 strips). Tissues were repolarized after 20 min, when maximum effects on membrane potential and slow wave activity were observed. The time corresponds with the time maximum binding of ouabain occurs in vascular smooth muscle (Deth and Lynch, 1980). The upstroke amplitude recovered to 20.4 ± 3.0 mV in K free solution and to 22.4 ± 2.9 mV in the presence of ouabain. The frequency became 5.0 ± 0.4 cpm and 4.5 ± 0.7 cpm, the duration 2.0 ± 0.3 s and 4.1 ± 0.5 s, in 0 mM K^+ and ouabain, respectively.

Because sodium pump activity is temperature sensitive, the effect of cooling on slow wave activity was investigated (figure 8). Reduction of the temperature from 37° to 21° depolarized the cells by 11 mV from -66.6 ± 2.4 to -55.4 ± 1.1 mV, with a time constant of 5.9 ± 1.3 min. Depolarization reached a maximum within 10 min and reduced the upstroke amplitude from 30.0 ± 2.6 to 16.1 ± 2.1 mV, with a time constant of 8.7 ± 1.5 min. Furthermore, the slow wave frequency decreased from 4.9 ± 0.3 to 1.1 ± 0.3 cpm; the slow wave duration increased from 3.8 ± 0.8 to 5.3 ± 0.6 s. The plateau potential remained stable from -40.9 ± 2.5 to -39.8 ± 1.4 mV.

The reduction in upstroke amplitude during cooling to 21° C was reverted to 26.0 ± 1.4 mV by repolarization of the membrane. The slow wave frequency did not recover (1.4 ± 0.3 cpm), although in 3 out of 6 preparations the slow wave frequency increased by repolarization (figure 8).

The recovery of slow wave activity by repolarization of the membrane, under conditions of sodium pump blockade, indicates that an oscillating sodium pump is not the generator of this activity.

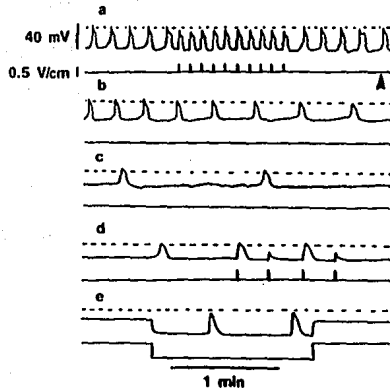


Figure 8

Effect of cooling on slow wave activity and membrane excitability. Recording is continuous from 1 cell. a. slow wave activity at 36° with a pulse train of 9 cpm (500 ns pulse duration) entrained the slow waves. The temperature was dropped quickly to 21° at arrow. b,c. Reduction of slow wave frequency in 21° . d. A pulse train of 4 cpm induced premature slow wave, but pacing at 4 cpm induced slow waves at only 2 cpm. e. Hyperpolarization back to the resting membrane potential, increased the slow wave frequency but not to the control value.

Changes in the membrane resistance during the Na^+/K^+ pump blockade.

In order to investigate whether the depolarization by sodium pump blockade was (in part) due to a membrane resistance change, we calculated the slope of the current-voltage curves at the resting membrane potential and during the maximum depolarization under the various experimental circumstances.

A significant ($P < 0.05$) increase in the slopes of the I/V plots, from $27.7 \pm 3.7 \text{ mV}/[\text{V}/\text{cm}]$ to $38 \pm 5.2 \text{ mV}/[\text{V}/\text{cm}]$, was observed during the depolarization induced by Na^+ -free HEPES (figure 9). An increase in the slopes of the I/V curves was considered as indicative of an increase in the input membrane resistance. This suggested that the depolarization is in part mediated by a decreased in the K^+ membrane conductance. However, Na^+ -free solution will block the Na pump and it is possible that at least part of the depolarization is mediated by this mechanism.

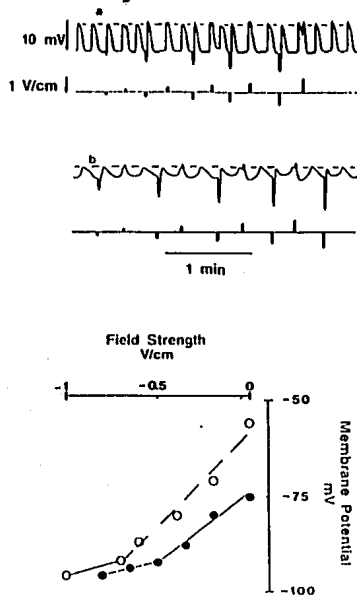


Figure 9. Depolarization induced by Na-free HEPES was followed by an increase in the input membrane resistance. Upper and lower tracings of each panel represent simultaneous recordings of the membrane potential (mV) and the field strength (V/cm) in the stimulation compartment, respectively. The upper panel shows electrotonic potentials in normal HEPES, and the lower panel shows the electrotonic potentials in Na-free HEPES, after 45 min. Both recordings were made in the same cell. The graph shows the relationship between the field strength and the membrane potential during the field stimulation, during the normal (closed circles) and Na-free HEPES (open circles). An increased slope was observed in the presence of Na-free HEPES, at the linear part of the I/V relationships.

In the presence of ouabain or K^+ free solution, the I/V plots in the hyperpolarizing quadrant were linear at the range of studied membrane potentials up to approximately -90 mV; at more negative potentials, inward rectification was observed. The slopes were calculated from the linear portion of the I/V relationship (figure 10). The slopes of the I/V curves during maximum depolarization by K^+ free solution were larger than those of the control, increasing from 28.6 ± 11.9 to 60.7 ± 27.8 mV/[V/cm] ($P < 0.01$). A slight inward rectification was observed at membrane potentials larger than -100 mV. During ouabain perfusion, the I/V relationship was linear between the steady state potential of -45 mV and -75 mV, but the slope was significantly larger than the control, 64.9 ± 16.9 compared to 26.4 ± 9.3 mV/[V/cm] ($P < 0.05$). At more polarized membrane potentials the slope was not different from that of control.

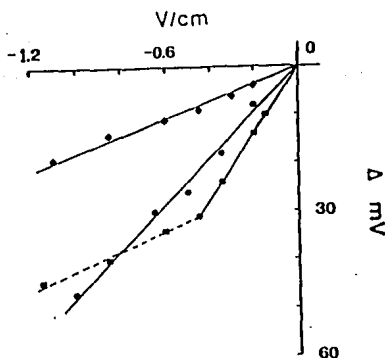


Figure 10
Effect of 0 mM K^+ Krebs and ouabain ($10^{-5}M$) on input resistance.

I/V curves were obtained in normal Krebs solution at a membrane potential of -72 mV (diamonds), in the presence of ouabain ($10^{-5}M$) at a membrane potential of -45 mV (squares), or on 0 mM K^+ at a membrane potential of -48 mV (circles). Slopes are calculated by linear regression analysis. In the presence of ouabain the slope was obtained from the linear portion of the curve, since strong inward rectification was observed. There is a marked increase ($P < 0.05$; $n=6$) in the slope of the I/V curves in 0 mM K^+ and ouabain compared to control.

Initiation of slow waves by current pulses

Since the sodium pump is excluded as the generator of the slow wave and no other ion carrier is known to be electrogenic, the ionic currents generating the slow wave must depend on changes in membrane conductance. In support of this, a slow wave was induced by a small depolarization induced by a short current pulse. Shortlasting depolarizing pulses (500 ms) evoked premature slow waves as shown in figure 11. Upon repetitive stimulation, the slow wave frequency was adopted to the stimulus frequency up to 15 cpm (n=10). Figure 11 shows a preparation with spontaneous slow wave activity at 4 cpm, which was increased to 9 cpm. The finding that a complete slow wave develops after a brief depolarizing pulse suggests that the slow wave

is a regenerative phenomenon dependent on the membrane potential. Further evidence came from hyperpolarizing current which hyperpolarized the membrane only 3 -5 mV when applied in between slow waves, but invariably caused termination of the slow wave when applied during the plateau phase of the slow wave (n=10).

The excitability of the membranes was greatly reduced at 20° C.: whereas a 9 cpm pulse train could easily entrain the slow waves at 37°, a 4 cpm pulse train at 21° only evoked slow waves at 2 cpm (figure 8).

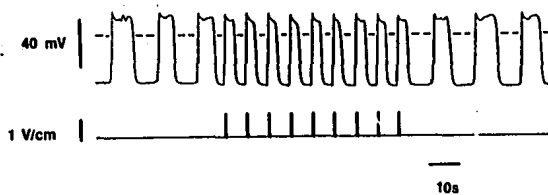


Figure 11
Brief current induced depolarizations evoke slow waves, a 9 cpm pulse train
paced slow wave activity.

DISCUSSION

The present study provides evidence that the ion currents involved in the generation of the slow wave activity depend on membrane conductance changes, and not on an oscillating sodium pump activity. When the tissue is perfused with HEPES buffer in which Na^+ is replaced by Li^+ , slow wave activity remains, at the same frequency but with reduced amplitude. The reduction in amplitude however is the result of depolarization induced by Na^+ free buffer since repolarization back to the control membrane potential restores the slow wave amplitude. Tissues submerged in Na^+ free buffer for 30 min will have an intracellular sodium concentration of less than 1 mM (as measured in vascular smooth muscle, Friedman 1974), which will reduce if not abolish sodium pump activity (Rang and Ritchie, 1968; Keynes and Swan, 1959). To exclude any possible pump activity, tissues were studied up to 2 hr in 0 mM Na^+ in the presence of ouabain. Although slow waves were abolished by this procedure this was seen to be due to membrane depolarization, since hyperpolarization back to control levels restored slow wave activity.

The slow wave activity was also abolished after other procedures which block sodium pump activity, i.e. 0 mM K^+ or ouabain (10^{-5}M). We have shown that the disappearance of the slow waves occurs because of the associated depolarization. When the membrane potential is brought back to its original level during sodium pump blockade, slow wave activity continues to develop.

Exclusion of the sodium pump as the generator of the slow waves strengthens the hypothesis that ionic permeability changes underly the development of the slow waves. For the small intestine this hypothesis was developed by El-Sharkawy and Daniel (1975c) and Daniel and Sarna (1978).

DISCUSSION

The present study provides evidence that the ion currents involved in the generation of the slow wave activity depend on membrane conductance changes, and not on an oscillating sodium pump activity. When the tissue is perfused with HEPES buffer in which Na^+ is replaced by Li^+ , slow wave activity remains, at the same frequency but with reduced amplitude. The reduction in amplitude however is the result of depolarization induced by Na^+ free buffer since repolarization back to the control membrane potential restores the slow wave amplitude. Tissues submerged in Na^+ free buffer for 30 min will have an intracellular sodium concentration of less than 1 mM (as measured in vascular smooth muscle, Friedman 1974), which will reduce if not abolish sodium pump activity (Rang and Ritchie, 1968; Keynes and Swan, 1959). To exclude any possible pump activity, tissues were studied up to 2 hr in 0 mM Na^+ in the presence of ouabain. Although slow waves were abolished by this procedure this was seen to be due to membrane depolarization, since hyperpolarization back to control levels restored slow wave activity.

The slow wave activity was also abolished after other procedures which block sodium pump activity, i.e. 0 mM K^+ or ouabain (10^{-5}M). We have shown that the disappearance of the slow waves occurs because of the associated depolarization. When the membrane potential is brought back to its original level during sodium pump blockade, slow wave activity continues to develop.

Exclusion of the sodium pump as the generator of the slow waves strengthens the hypothesis that ionic permeability changes underly the development of the slow waves. For the small intestine this hypothesis was developed by El-Sharkawy and Daniel (1975c) and Daniel and Sarna (1978).

For the colon, it is supported by our observation that slow waves can be triggered or terminated by electrical pulses. A voltage dependent conductance change can be evoked by a brief and small depolarization. It has been shown that the sodium pump is independent of the membrane potential (Marmor, 1971). In some preparations, the spontaneous slow waves seem to be triggered by a lower amplitude depolarization (figure 1) which may represent pacemaker activity distant from the cell recorded from. We observed that it is possible to pace the slow wave activity by current pulses which has also been observed in smooth muscle of the small intestine (Sarna and Daniel, 1974; Specht and Bortoff, 1972) and stomach (Kelly and LaForce, 1972). A role for the sodium pump in the generation of pacemaker activity was also considered for the beta cells of the pancreas (Atwater and Meissner, 1975) and neurons (Airapetyan, 1969) but ionic conductance changes are shown to underly the activity in these tissues (Atwater, Dawson, Ribalet and Rojas, 1979; Cook, 1984; Adams and Benson, 1985).

Depolarization and abolishment of slow wave activity by sodium pump blockade has also been observed in the small intestine (Daniel, 1965; Liu et al. 1969). This led to the conclusion that the slow waves were the result of a rhythmic electrogenic sodium pump. Using the sucrose gap technique to voltage clamp the membrane potential, Conner et al. (1974) did not observe recovery of slow wave activity in the presence of ouabain after current induced hyperpolarization. Although proceedings of a meeting (Taylor, Daniel and Tomita, 1975) showed contradictory findings, the hypothesis that an oscillating sodium pump caused slow wave activity persisted (Prosser and Mangel, 1982).

Intracellular iontophoresis of sodium, but not of potassium, enhanced

the slow wave amplitude in longitudinal muscle fibers of cat jejunum (Liu, Prosser and Job, 1969). Since the increase in intracellular sodium will enhance the sodium pump activity, this was seen as evidence for the sodium pump being the generator of the slow waves. However, increased intracellular sodium can also affect membrane conductance. Increased intracellular sodium has been shown to inhibit outward currents (Hille, 1984; Singer and Walsh, 1984). This could lead to increase in slow wave amplitude. The amplitude of the slow wave is determined by the level of the resting membrane potential and that of the plateau potential. The plateau potential is regulated, in part, by an outward potassium conductance (Szurszewski, 1978; Barajas-Lopez and Huizinga, 1988).

The marked sensitivity of the slow wave frequency to temperature suggests that a metabolic component is involved in the generation of the slow wave activity. Previous studies in the small intestine came to the same conclusion but used it as evidence for an involvement of the sodium pump in the generation of the slow waves (Conner et al. 1976). We have shown that slow waves occur independent of the sodium pump and depend on membrane conductance changes. This suggests that the membrane conductance changes responsible for slow wave generation are metabolically dependent. Metabolically dependent ion channels have been shown to exist in other tissues. For instance, in the beta cell of the pancreas, a potassium channel regulated by the ATP^{4-}/ADP^{3-} ratio has been characterized (Dunne and Peterson, 1988). An ATP induced block of an inward rectifier potassium conductance has been shown to evoke depolarization in these cells (Peterson and Findlay, 1987). In addition, the ATP regulates, blocks, another K channel in cardiac muscle cells (Noma, 1983). A possible role of this

channel in the generation of the pacemaker activity was discussed (Kakei and Noma, 1984).

The depolarization developing after treatment with ouabain, zero K or zero Na^+ was, at least in part, mediated by a decrease in membrane conductance, probably a K conductance. Part of the depolarization may be due to block of an electrogenic pump. Recently the presence of an electrogenic pump has been suggested to be present in this tissue (Burke, Reed and Sanders, 1988). The relative contribution of the sodium pump and the membrane conductance change to the depolarization cannot be assessed. In arteriolar smooth muscle, ouabain also causes increase in membrane resistance; in this tissue the sodium pump is thought not to contribute appreciably to the resting membrane potential (Hirst and Van Helden, 1982). It is interesting that maximal activation of the sodium pump in the guinea pig taenia coli (by readmission of KCl after potassium depletion) caused hyperpolarization accompanied by a large decrease in input membrane resistance (Tomita and Yamamoto, 1971). These data indicate that classical maneuvers to block the sodium pump can affect the membrane conductance and when they do, they can not be used to assess the contribution of the sodium pump to the resting membrane potential.

The current voltage relationships revealed the presence of inward rectification below approximately -90 mV. Inward rectification was not observed in the absence of extracellular K^+ within the range of membrane potentials studied, i.e. up to -100 mV. This suggests the presence of an inward rectifier K conductance, since a characteristic of this conductance is that it is decreased by reduction of extracellular K^+ (Hagiwara, 1983). Another characteristic of the inward rectifier K conductance is its voltage

dependency: it is decreased by membrane depolarization (Hagiwara S, 1983). The current voltage relationship suggests a change in membrane resistance from a low to a high level around - 70 mV. This could be explained by the turning off of the inward rectifier K channel. Therefore, it is possible that depolarization observed after ouabain, zero K or zero Na^+ treatment, is due to sodium pump blockade and to the blockade of this potassium conductance. Extracellular sodium is an endogenous blocker of the inward rectifier potassium conductance (Hille, 1984). The transient hyperpolarization observed after perfusion of 0 mM Na^+ , could be explained by activation of this potassium conductance by reduction of extracellular sodium.

In conclusion, slow waves are not generated by oscillating sodium pump activity. The sodium pump has a secondary role on the slow wave activity, maintaining physiological ion concentrations and the resting membrane potential. Slow waves are dependent on cyclic membrane conductance changes, which are metabolically dependent.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by the MRC of Canada. The Intestinal Disease Research Unit is supported by the Canadian Foundation for Ileitis and Colitis. Jan D. Huizinga is a MRC scholar; Carlos Barajas-López is a MRC fellow.

REFERENCES

1. ABE, Y. & TOMITA, T. (1968). Cable properties of smooth muscle. *Journal of Physiology (London)* 196:87-100.
2. ADAMS W. B. & BENSON, J.A. (1985). The generation and modulation of endogenous rhythmicity in the aplysia bursting pacemaker neurone RL5. *Progress in Biophysical Molecular Biology* 46:1-49.
3. AIRAPETYAN, S.N. (1969). Mechanism of regulation of spontaneous activity of the giant neurones of the snail. *Biophysics* 14:912-917.
4. ATWATER, I., DAWSON, C.M., RIBALET, B. & ROJAS, E. (1979). Potassium permeability activated by intracellular calcium ion concentration in the pancreatic beta cells. *Journal of Physiology (London)*. 288:575-588.
5. ATWATER I. & MEISSNER H.P. (1975). Electrogenic sodium pump in beta-cells of islets of Langerhans. *Journal of Physiology (London)*. 247:56P-58P.
6. BARAJAS-LOPEZ, C. & HUIZINGA, J.D. (1988). Heterogeneity in spontaneous and tetraethylammonium induced intracellular electrical activity in colonic circular muscle. *Pflugers Archiv.(European Journal of Physiology)*. 412:203-210.
7. BARAJAS-LOPEZ C., DEN HERTOG, A. & HUIZINGA J.D. (1988). Pacemaker generation in colonic smooth muscle. II. ionic basis. *Journal of Physiology*. (2nd paper submitted).
8. BURKE, E.P., REED, J.B. & SANDERS, K.M. (1988). Role of sodium pump in membrane potential gradient of canine proximal colon. *American Journal of Physiology* 254:C475-C483.
9. BYWATER R.A.R. & TAYLOR G.S. (1980). The passive membrane properties and excitatory junction potentials of the guinea-pig vas deferens.

Journal of Physiology (London). 300:303-316.

10. CAPRILLI, R. & ONORI, L. (1972). Origin, transmission and ionic dependence of colonic electrical slow waves. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 7:65-74.
11. CHOW, E., & HUIZINGA, J.D. (1987). Myogenic electrical control activity in longitudinal muscle of human and dog colon. *Journal of Physiology (London)*. 392:21-34.
12. COOK, D.L. (1984). Electrical pacemaker mechanisms of pancreatic islet cells. *Federation Proceedings* 43:2368-2372.
13. CONNOR, J.A., KREULEN, D.L. & PROSSER, C.L. (1976). Relation between oxidative metabolism and slow rhythmic potentials in mammalian intestinal muscle. *Proceedings of National Academy of Science, USA* 73:4239-4243.
14. CONNOR, J.A. PROSSER, C.L. & WEEMS, W.A. (1974). A study of pacemaker activity in intestinal smooth muscle. *Journal of Physiology (London)* 240:671-701.
15. DAHMS, V., PROSSER, C.L. & SUZUKI, N. (1987). Two types of 'slow waves' in intestinal smooth muscle of cat. *Journal of Physiology* 392:51-69.
16. DANIEL, E.E. (1965). Effects of intra-arterial perfusions on electrical activity and electrolyte contents of dog small intestine. *Canadian Journal of Physiology & Pharmacology* 43:551-577.
17. DANIEL, E.E. & SARNA, S. (1978). The generation and conduction of activity in smooth muscle. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology* 18:145-166.
18. DEIH, R.C. & LYNCH, C.J. (1980). The binding of ^3H -ouabain to

Na^+ - K^+ ATPase sites in arterial smooth muscle. *Pharmacology* 21:29-37.

19. DUNNE, M.J. & PETERSON, O.H. (1988). Changes in the internal ATP/ADP ratio modulate the gating of K^+ channels in insulin-secreting cells. *Pflugers Archives* 411(suppl. 1):R111 (Abstract).
20. EL-SHARKAWY, T.Y. & DANIEL, E.E. (1975a). Electrical activity of small intestinal smooth muscle and its temperature dependence. *American Journal of Physiology* 229(5):1268-1276.
21. EL-SHARKAWY, T.Y. & DANIEL, E.E. (1975b). Electrogenic sodium pumping in rabbit small intestinal smooth muscle. *American Journal of Physiology* 229(5):1277-1286.
22. EL-SHARKAWY, T.Y. & DANIEL, E.E. (1975c). Ionic mechanisms of intestinal electrical control activity. *American Journal of Physiology* 229(5):1287-1298.
23. EL-SHARKAWY, T.Y. (1983). Electrical activities of the muscle layers of the canine colon. *Journal of Physiology* 342:67-83.
24. FLEMING, W.W. (1980). The electrogenic Na^+ , K^+ -pump in smooth muscle: Physiological and pharmacological significance. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 20:129-149.
25. FRIEDMAN, S.M. (1974). Lithium substitution and the distribution of sodium in the rat tail artery. *Circulation Research* 34:168-175.
26. HAGIWARA, S. (1983). Membrane potential dependent ionic channels in cell membrane. Raven Press, New York.
27. HILLE, B. (1984). Ionic channels of excitable membranes. publ: Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, U.S.A.
28. HIRST, G.D.S. & VANHELDEN, D.F. (1982). Ionic basis of the resting membrane potential of submucosal arterioles in the ileum of the guinea

- pig. *Journal of Physiology (London)*. 333:53-67.
29. KAKEI, M. & NOMA, A. (1984). Adenosine $-5'$ - triphosphatesensitive single potassium channel on the atrioventricular node cell of the rabbit heart. *Journal of Physiology (London)*. 352:265-284.
 30. KELLY, K.A. & IAFORCE, R.C. (1972). Pacing the canine stomach with electrical stimulation. *American Journal of Physiology* 222:588-594.
 31. KEYNES, R.D. & SWAN, R.C. (1959). The effect of external sodium concentrations on the sodium fluxes in frog skeletal muscle. *Journal of Physiology* 147:591-625.
 32. LIU, J., PROSSER, C.L. & JOB D.D. (1969). Ionic dependence of slow waves and spikes in intestinal muscle. *American Journal of Physiology* 217:1542-1547.
 33. MARNIOR, M.F. (1971). The independence of electrogenic sodium transport and membrane potential in molluscan neurons. *Journal of Physiology (London)*. 218:599-608.
 34. NOMA, A. (1983). ATP regulated single K channels in cardiac muscle. *Nature (London)*. 305:147-148.
 35. PETERSON, O.H. & FINDLAY I. (1987). Electrophysiology of the pancreas. *Physiological Reviews* 67: 1054-1116.
 36. PROSSER, C.L. & MANGEL A.W. (1982). Mechanisms of spike and slow wave activity in smooth muscle cells. In: *Cellular Pacemakers*. (ed. Carpenter D.D.). John Wiley and Sons, New York. pp 273-301
 37. RANG, H.P. & RITCHIE, J.M. (1968). On the electrogenic sodium pump in mammalian non-myelinated nerve fibres and its activation by various external cations. *Journal of Physiology (London)*. 196:183-221.
 38. SARNA, S. & DANIEL, E.E. (1975). Electrical stimulation of small

- intestinal electrical control activity. *Gastroenterology* 69:660-667.
39. SINGER, J.S. & WALSH J.V. (1984). Large conductance Ca^{2+} activated K^{+} channels in smooth muscle cell membrane. *Biophysical Journal* 45:68-70.
 40. SMITH, T.K., REED, J.B. & SANDERS, K.M. (1987). Origin and propagation of electrical slow waves in circular muscle of canine proximal colon. *American Journal of Physiology* 252:C215-C224.
 41. SPECHT, P.C. & BORTOFF. A. (1972). Propagation and electrical entrainment of intestinal slow waves. *American Journal of Digestive Diseases* 17:311-316.
 42. SZURSZEWski, J.H. (1987). Electrical basis for gastrointestinal motility. *In: Physiology of the Gastrointestinal Tract.* (ed. L.R. Johnson), Raven Press, New York, pp383-422.
 43. TAYLOR, G.S., DANIEL. E.E. & TOMITA, T. (1975). Origin and mechanism of intestinal slow waves. *In: Proceedings of 5th International Symposium on GI motility.* Ed. G. Vantrappen, Typoff Press, Leuven, Belgium. pp.102-106.
 44. TOMITA, T. & YAMAMOTO, T. (1971). Effects of removing the external potassium on the smooth muscle of guinea pig taenia coli. *Journal of Physiology* 212:851-868.

APENDICE B

PACEMAKER GENERATION IN COLONIC SMOOTH MUSCLE

II. IONIC BASIS

CARLOS BARAJAS-LOPEZ, ADRIAAN DEN HERTOG*, AND JAN D. HUIZINGA

Intestinal Disease Research Unit and Department of Biomedical Sciences,
McMaster University Hamilton Ontario Canada

Running title:

Ionic basis of colonic slow waves

Key words:

Smooth muscle, Colon, Electrophysiology, Slow waves, Potassium,
Sodium, Chloride, Calcium, Pacemaker activity*Visiting Professor from the University of Groningen, Dept. of Pharmacology,
Groningen, The Netherlands

Correspondence address:

Jan D. Huizinga
McMaster University
Intestinal Disease Research Unit
Health Sciences Centre Room 3N5C
1200 Main Street West
L8N 3Z5 Hamilton, Ontario,
Canada
Phone: (416) 525 9140 ext 2590

ABSTRACT

1. The ionic basis of the slow waves, in particular the ionic conductances involved in their initiation, in the circular muscle of the dog colon was investigated using an Abe-Tomita type chamber for voltage control.
2. The sodium channel blocker tetrodotoxin did not affect the slow wave amplitude nor its rate of rise.
3. After abolishment of the Na^+ gradient by replacing NaCl with sucrose or *N*-methyl *D*-glucamine, large slow waves continued to develop although some changes in slow wave characteristics occurred.
4. Slow wave activity continued to develop after blockade of calcium influx by D600 (10^{-6}M). D600 did not affect the membrane potential but reduced the slow wave amplitude and abolished the plateau potential. Slow waves were abolished after omission of extracellular calcium.
5. The combination of Na free solution and D600 depolarized the cells and abolished slow wave activity. However, repolarization caused slow waves to return.
6. Replacement of 91% the chloride by isothionate did not affect the membrane potential nor the slow wave amplitude.
7. Current induced depolarization to -40 mV abolished slow wave activity.
8. With similar depolarization by 30.9 mM KCl , slow waves of large amplitude continued to develop.
9. In conclusion, sodium and chloride ions are not essential for initiation of slow wave activity. Slow waves are dependent on extracellular calcium indicating involvement of a calcium (D600 insensitive) or calcium dependent conductance. Blockade of a potassium

conductance likely contributes to the initiation of the slow waves.

10. **Colonic pacemaker activity can be the result of cyclic changes in a K conductance and/or a calcium or calcium dependent conductance, insensitive to D600.**

INTRODUCTION

The mechanism of pacemaker generation in colonic smooth muscle has received some attention in the early seventies when it was observed that the slow waves in the cat colon were sensitive to changes in extracellular calcium and sodium (Wienbeck and Christensen, 1971; Caprilli and Onori, 1971). The sodium sensitivity indicated, according to Caprilli and Onori, a dependency on active extrusion of sodium from the cell. The hypothesis of a role for the sodium pump in generating electrical slow waves was also being developed for the small intestine (Daniel, 1965; Liu, Prosser and Job, 1969; Connor, Prosser and Weems, 1974). Although a recent study maintained that the sodium pump plays a crucial role in slow wave generation (Dahms, Prosser and Weems, 1987), this has also been questioned (El-Sharkawy and Daniel, 1975b). We have provided conclusive evidence that the sodium pump does not play a role in slow wave generation in circular muscle of the canine colon (previous paper). The possible ionic mechanisms that could generate the initial depolarization responsible for the pacemaker activity in the colonic circular muscle are: an increase in inward currents and/or a decrease in the outward currents through the cellular membrane.

Based on the intracellular ion concentrations reported for gut smooth muscle (Casteels, 1971; El-Sharkawy and Daniel 1975a), and the resting membrane potential existent in the cells from the submucosal surface of the colonic circular muscle (about -70 mV; Barajas-López and Huizinga, 1988; El-Sharkawy, 1983; Smith, Sanders and Reed, 1987), inward current could be carried by Cl^- , Na^+ and Ca^{2+} ions. Potassium conductances could carry outward current.

El-Sharkawy and Daniel (1975b) concluded that the slow wave

depolarization in the small intestine is a result of an increase in inward Na current, secondary to an increase in Na permeability. This hypothesis was based on the findings that a transient increase in Na influx occurred during the slow wave depolarization (Job, 1969), and that the slow waves were completely blocked when the extracellular Na^+ was decreased below 20 mM (Liu, Prosser and Job, 1969; Corner, Prosser and Weems, 1974; El-Sharkawy and Daniel 1975b). However, Liu, Prosser and Job (1969) concluded that the disappearance of the slow waves, after decreasing the extracellular Na^+ , took too long to be consistent with slow waves being dependent on a Na gradient. Studies on the slow waves of the circular muscle of the cat colon showed that Na free solution did not affect the slow wave amplitude, although the rate of rise decreased (Wienbeck and Christensen, 1971). Nevertheless, the conclusion was that cat colonic slow waves are sodium dependent.

Controversial reports exist about the effect of Ca^{2+} omission from the perfusion medium. 0 mM Ca^{2+} abolished slow wave activity in the rabbit small intestine (El-Sharkawy and Daniel, 1975), and in the cat colon (Wienbeck and Christensen, 1971; Caprilli and Onori, 1972). However, no effect on the slow wave amplitude was observed in the cat small intestine (Liu, Prosser and Job, 1969).

Chloride ions have been implicated in the generation of the inter-slow wave depolarization, since the frequency of the slow waves was decreased by replacing Cl^- by less permeable, and increased by more permeable anions (El-Sharkawy and Daniel, 1975b). In addition, chloride ions were thought to be involved in the plateau depolarization.

In the above described studies, no role was seen for K conductances in

the generation of the slow waves. However, recently the importance of the K conductance to the slow wave activity was shown using specific K conductance blockers such as TEA. TEA increased the slow wave duration in the circular muscle of the antrum (Szurszewski, 1978) and the colon (Barajas-López and Huizinga, 1988).

In summary, data on the mechanisms underlying the pacemaker activity in the colon are scarce and contradictory. The data on the small intestine are also inconsistent. This is due, at least in part, to the absence of information about changes in resting membrane potential in some of these studies, and to the lack of information about the effects of membrane potential changes which occur during some ion substitutions, on the slow wave activity.

In the present study we investigated the role of different ionic conductances in the generation of the slow waves in the canine colon. The study was carried out using intracellular recording only, and the Abe Tomita type chamber that allowed us to study the effects of membrane potential changes. Contrary to current ideas, as summarized by Szurszewski (1987), we found that neither Na^+ nor Cl^- are necessary for the generation of the slow waves. The results suggest that the pacemaker activity is generated by: (i) cyclic oscillations in the K^+ conductance, and/or (ii) cyclic oscillations in a Ca conductance (D600 insensitive) and/or a Ca dependent conductance.

Some of these data have appeared in abstract form (Huizinga, Barajas-López, Den Hertog and Chow, 1988; Barajas-López and Huizinga, 1988a).

METHODS

Circular muscle from the proximal colon was excised from dogs, either male or female. The tissue preparation and the method of recording electrical activities, the composition of solutions and the method of data analysis were as described in the previous paper. It has been reported that in gut smooth muscle the concentration of intracellular Na^+ is 19 mM (Casteels, 1971). To abolish this gradient we decreased the Na^+ in the Krebs solution by either sucrose or N-methyl-D-glucamine. Sucrose Krebs was prepared by replacing the NaCl (120.3 mM) for 240.6 mM of sucrose, leading to a final concentration of Na^+ of 21.2 mM. N-methyl-D-glucamine Krebs was prepared by replacing the total NaCl and 10 mM, out of 20 mM, NaHCO_3 by 130.3 mM of N-methyl-D-glucamine, leading to a final concentration of Na^+ of only 11.2 mM. The pH of this solution was adjusted to 7.35 with HCl. Ca^{2+} -free Krebs was prepared by omitting the CaCl_2 from the Krebs solution and 1 mM of EGTA was added. D600 was added to the Krebs solution to reach a final concentration of 10^{-6}M . The isothionate Krebs was prepared by replacing the total NaCl by Isothionate-Na. The Na^+ -free HEPES solution was prepared by replacing the NaCl with LiCl. High K^+ Krebs was prepared by replacing NaCl for KCl.

RESULTS

The spontaneous activity of the cells at the submucosal border of the circular muscle layer of the dog colon was similar to that described previously (previous paper).

Role of sodium in slow wave generation.

We investigated the role of Na^+ ions in the generation of the slow waves by using a specific sodium channel blocker (tetrodotoxin, TTX) and by studying the effects of the abolishment of the Na^+ gradient across the membrane.

TTX effects were analyzed in continuous recordings from the same cells and were measured after 10-15 min. TTX did not influence the resting membrane potential (from -72.6 ± 4.0 to -72.4 ± 4.1 mV; $n=6$), the upstroke amplitude (from 42 ± 2.4 to 42.2 ± 2.7 mV), the average rate of rise (from 87.0 ± 15.7 to 89.0 ± 12.9 mV/s), the plateau amplitude (from 36.2 ± 2.2 to 36.6 ± 2.7 mV), and the plateau potential (from -36.4 ± 1.9 to -35.8 ± 1.8 mV). The slow wave duration increased from 4.2 ± 0.6 to 5.3 ± 0.9 s, and the frequency decreased from 5.0 ± 0.3 to 4.5 ± 0.2 cpm ($P < 0.05$). A blockage of possible Na^+ channels by TTX would not increase the plateau duration therefore, these TTX effects are likely mediated by blockage of tonic inhibitory neural activity present in the colon (Christensen, 1987).

Figures 1 and 2 show representative recordings of slow wave activity after abolishment of the Na^+ gradient due to the replacement of NaCl by sucrose or N-Methyl-D-Glucamine, respectively. After 10 min in sucrose Krebs (21.2 mM of Na^+) the following electrical parameters were significantly decreased: a) the membrane potential from -66.8 ± 1.6 to -62.4 mV ($P < 0.005$; $n=5$); b) the upstroke amplitude from 30.2 ± 1.8 to 22.2 ± 2.5

mV ($P < 0.05$); c) the rate of rise from 78 ± 9.2 mV/s to 41 ± 12.3 ($P < 0.05$); and d) the slow wave duration from 4.5 ± 0.7 to 2.1 ± 0.2 s ($P < 0.05$). The slow wave frequency increased from 4.3 ± 0.2 to 5.7 ± 0.3 cpm ($P < 0.05$). After 10 min in N-Methyl-D-Glutamine Krebs (11.2 mM Na^+) similar changes were observed in the slow wave activity. A decrease was observed in the slow wave duration (5.5 ± 0.8 to 3.3 ± 0.2 $P < 0.01$; $n=6$), the upstroke potential (from 35.3 ± 2.9 to 28.0 ± 3 mV; $P < 0.01$), and the average rate of rise (from 106 ± 17.6 to 40 ± 13.5 mV/s; $P < 0.01$). The slow wave frequency was increased from 4.2 ± 0.1 to 5.2 cpm ($P < 0.005$). No significant changes were observed in the membrane potential (from -71.5 ± 2.4 to -70 ± 1.9 mV). In both solutions with low Na^+ , a plateau phase of the slow wave could usually not be distinguished (9 out of 11 preparations). The fact that large slow waves were observed in low Na^+ Krebs, a condition that abolishes Na currents, indicates that an oscillating Na conductance is not involved in initiating the slow wave activity.

Role of calcium in slow wave generation.

The role of Ca^{2+} in the generation of slow wave activity was investigated by studying the effects of the calcium influx blocker D600, and by omission of extracellular Ca^{2+} .

D600 (10^{-6} M; $n=8$) did not affect the resting membrane potential (from -71.2 ± 1.6 to -71.0 ± 1.2 mV), but reduced the amplitude of the slow wave upstroke (from 40.8 ± 2.0 to 32.4 ± 2.9 mV; $P < 0.005$), the mean rate of rise (from 115 ± 15.9 to 60 ± 15.9 mV/s; $P < 0.001$), the plateau amplitude (from 35.1 ± 1.6 to 29.6 ± 2.5 mV; $P < 0.05$), and the duration of the slow wave (from 6.0 ± 0.9 to 2.6 ± 0.4 s; $P < 0.005$). D600 increased significantly the slow wave frequency (from 4.6 ± 0.3 to 5.1 ± 0.3 cpm; $P < 0.05$), and the plateau potential (from -35.9 ± 1.3 to -41.6 ± 1.5 mV $P < 0.05$).

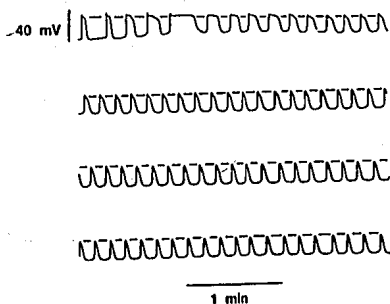


Figure 1
Effect of abolishment of the Na^+ gradient (1).

This and all other figures show intracellular recording only. The dashed line represents the -40 mV membrane potential level.

To abolish the Na^+ gradient, all NaCl was replaced by sucrose (see methods), starting at the beginning of the tracing. After 15 min, slow wave activity continued to develop. The plateau potential was abolished under these circumstances.

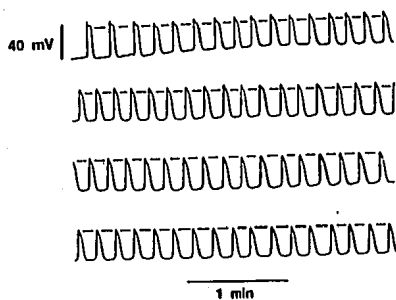


Figure 2
Effect of abolishment of the Na^+ gradient (2).

NaCl and part of the NaHCO_3 (10 out of 20 mM) was replaced by *N*-Methyl-D-Glucamine, at the beginning of the tracing, leaving 11.2 mM Na^+ . After 15 min when the Na^+ gradient was abolished (Friedman, 1974), slow wave activity continued to be present.

To analyze the possibility that a D600 insensitive Ca conductance could be involved in slow wave generation we perfused the tissue with Ca^{2+} free Krebs (with 1 mM EGTA). The membrane depolarized from -73.0 ± 3.0 to -50.0 ± 3.5 mV ($n=6$) after 10 min, with a time constant of 6.0 ± 0.2 min. The upstroke amplitude decreased with a significantly lower time constant of 2.0 ± 0.5 min ($P < 0.001$; figures 3,4), after 6 min the slow waves were always abolished. Repolarization back to the original membrane potential did not restore slow wave activity ($n=3$; figure 3). These data suggests that a calcium conductance (insensitive to D600) and/or a Ca^{2+} dependent conductance could be involved in the generation of the slow wave activity.

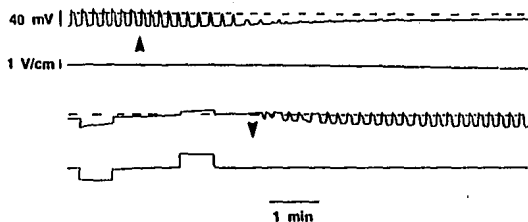


Figure 3

The slow wave activity disappeared in the absence of extracellular Ca^{2+} . Upper and lower tracings show the intracellular electrical activity (mV) and the field strength (V/cm) in the stimulation compartment, respectively. Arrows indicate superfusion with Ca^{2+} -free Krebs solution (plus 1 mM EGTA). A depolarization of the membrane and a decrease in the slow wave amplitude were observed immediately after starting the perfusion. The slow wave amplitude disappeared completely after 5 min. The associated depolarization is probably not the cause of the abolishment of the slow waves because repolarization did not bring back this activity.

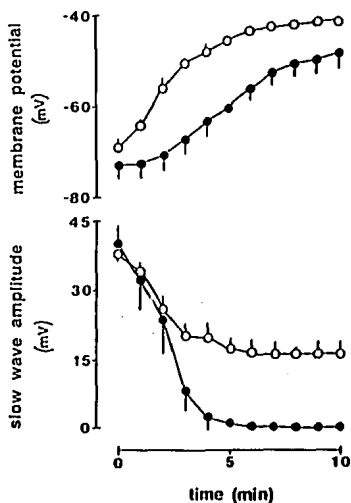


Figure 4

Temporal correlation between the depolarization and the decrease of the slow wave amplitude after superfusion with Ca²⁺-free (closed circles) and 30.9 mM KCl Krebs solution (open circles).

Sodium omission after D600 treatment.

Five strips perfused with D600 (10^{-6} M) for 15 to 20 min, were then perfused with 0 mM Na HEPES solution during the continued presence of D600. The effects of Na^+ omission in the presence of D600 were quantitatively different from those obtained in the absence of D600 (figure 5). Omission of Na^+ after calcium influx blockade caused a small and transient hyperpolarization of 4 ± 1.4 mV, 2 to 4 min after the start of the perfusion. After this, a marked depolarization was observed from a membrane potential of -64.7 ± 2.3 to -43.8 ± 0.8 mV after 30 min, with a time constant of 11.7 ± 2.6 min, significantly smaller than that in the absence of D600 ($P < 0.05$). Concomitantly, a decrease in the slow wave amplitude from 31.4 ± 2.4 to 1.2 ± 0.7 mV was observed; slow waves disappeared in 3 out of 5 preparations. The decrease in amplitude occurred with a time constant of 10.0 ± 2.9 min, significantly smaller ($P < 0.05$) than in the absence of D600 (figure 5). Current induced repolarization of the membrane potential (up to -67.0 ± 1.7 mV) brought back large amplitude slow waves of 29.5 ± 2.8 mV, with a frequency of 4.1 ± 0.1 cpm and a duration of 2.9 ± 0.3 s (figure 6; $n=4$). Such a recovery of the slow wave activity was observed even after 1 to 2 hours in Na^+ -free HEPES, when the intracellular Na^+ will be expected to be minimal (Friedman, 1974). The effects of the omission of Na^+ on membrane potential and slow wave amplitude were reverted by returning to normal HEPES solution (figure 6; $n=4$). These observations suggest that neither sodium nor D600 sensitive calcium channels are essential for slow wave initiation. The marked depolarization caused by D600 in low Na suggests the presence of a Ca-dependent K^+ conductance which may be involved in slow wave generation.

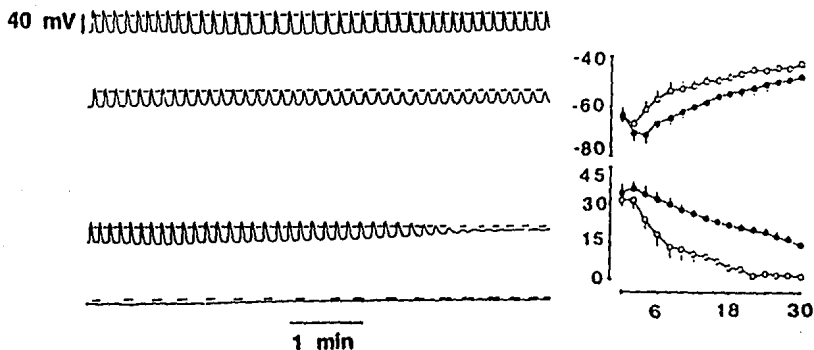


Figure 5

Slow wave activity was abolished by the absence of extracellular Na but only when the tissues were previously treated with D600. Upper 2 and lower 2 panels are continuous recordings of cells from two different preparations, in the presence of HEPES solution without (upper) and with (lower) D600 ($10^{-6}M$). Perfusion with Na-free HEPES was started at the beginning of the tracings. Both cells were slightly hyperpolarized by the drop in the extracellular Na, after 2-5 min. Later a decrease in both membrane potential and slow wave amplitude were observed. The absence of Na by itself did not abolish the slow wave activity whereas, in the presence of D600 the depolarization was higher, faster and the slow wave activity disappeared.

Graph:

Temporal correlation between the membrane potential (upper part) and the slow wave amplitude (lower part) by Na-free solution in the presence (open circles) and in the absence of D600 (open squares). The X-axis indicates the time (in min) after omission of sodium. The data from experiments without D600 are taken from the previous paper (Barajas-López, Chow, Den Hertog and Huizinga, 1988) and repeated here for comparative purposes.

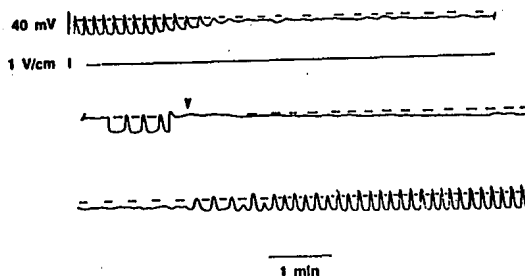


Figure 6

The abolishment of the slow wave activity by Na-free HEPES (in the presence of D600) was mediated by the membrane depolarization. Upper and lower tracings represent the membrane potential and the field strength (V/cm) in the stimulation compartment, respectively. Upper panel: control recording in the presence of D600. The preparation was perfused with Na-free HEPES and two hours later (lower panel) the tissue was hyperpolarized leading to recovery of the slow wave activity. The arrow indicates the time when the superfusion with normal HEPES (plus D600) started, which led to the recovery of the membrane potential and slow wave activity.

Role of chloride in the slow wave generation.

The involvement of Cl^- in the generation of the slow waves was investigated by replacing 90.7% of the Cl^- by isothionate ($n=5$). No significant changes occurred in membrane potential (from -74.6 ± 1.2 to -74.7 ± 1.2 mV), plateau amplitude (from 37 ± 0.4 to 36.4 ± 2.0 mV), plateau potential (from -37.6 ± 1.9 to -38.2 ± 1.9 mV), and the average rate of rise (from 124.4 ± 18.9 to 175.2 ± 58.6 mV/s; figure 7). However, the perfusion with low Cl^- solution decreased the slow wave duration significantly from 4.6 ± 0.4 to 1.6 ± 0.1 s ($P < 0.005$), and the slow wave frequency from 5.2 ± 0.3 to 3.2 ± 0.4 cpm ($P < 0.05$). The upstroke amplitude was increased from 41.6 ± 1.7 to 46.6 ± 2.2 mV ($P < 0.05$). These results suggest that a Cl^- conductance neither contributes to the resting membrane potential nor is necessary for the generation of slow wave activity.

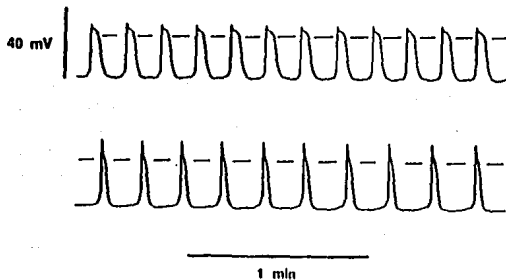


Figure 7
Effects of the 90.7% Cl^- substitution by isothionate on the slow wave activity. The upper tracing represents the control electrical activity in normal Krebs solution. The lower tracing comes from the same cell 10 min after the substitution of Cl^- .

Role of the membrane potential in the generation of the slow wave activity.

The depolarization that initiates the slow wave activity could be evoked by an increase in inward current and/or by a block of outward current. Similarly, blockade of slow waves can occur by inactivation of possible inward currents (for instance a Ca^{2+} current) and/or by the persistent blockage of possible outward currents (for example the inward rectifier K conductance). We have seen that slow wave activity was blocked by depolarizing the circular muscle to about -40 mV by perfusing the tissue with ouabain or K^+ free Krebs (previous paper), or Na^+ free HEPES plus D600. It seemed likely that the study of the mechanism by which the depolarization abolished the slow waves could reveal information about their generation.

a) Effect of current-induced depolarization on slow wave activity

To confirm that depolarization per se abolishes the slow wave activity we depolarized the tissue by long-lasting current pulses. The slow wave amplitude decreased with depolarization (figure 8a). When the cells were depolarized up to the plateau potential (-38.3 ± 2.8 mV; $n=7$), slow waves disappeared or were of very low amplitude (mean: 3 ± 1 mV). Hyperpolarizing pulses resulted in an increase in the amplitude of the slow waves. The relationship between the electrotonic potentials and the current injected revealed the presence of outward and inward rectification (figure 8b).

b) Potassium induced depolarization and slow wave activity.

To further explore the mechanism by which the depolarization abolished the slow waves, the cells were depolarized (up to ~ -40 mV) by increasing the KCl up to 30.9 mM in the Krebs solution. This maneuver will inactivate inward currents to a similar extent than equivalent depolarization by current or sodium pump blockade (previous paper), but it will keep the

membrane potential close to the K equilibrium potential. Therefore, possible K conductances, for instance the inward rectifier K conductance, will not be blocked persistently (Hagiwara 1983; Hille 1984).

The cells were depolarized by KCl (30.9 mM) from -69.3 ± 1.9 to -42.7 ± 0.7 mV ($P < 0.001$; $n=6$) with a time constant of 3.3 ± 0.4 min (figures 4 and 9). After 10 min in high K^+ , slow waves with an upstroke amplitude of 16.0 ± 2.8 mV, (from 37.8 ± 1.7 mV; $P < 0.001$), were observed. This in contrast to the depolarization by ouabain, K-free perfusion (previous paper), Na-free HEPES plus D600, or current-injection, when no slow wave activity was observed. In presence of 30.9 mM KCl, the frequency of the slow wave was increased from 4.5 ± 0.1 to 6.5 ± 0.7 cpm ($P < 0.05$). The plateau amplitude, the plateau potential, and the rate of rise were significantly decreased from 30.7 ± 1.8 to 13.7 ± 2.0 mV ($P < 0.001$), from -38.8 ± 1.1 to -28.7 ± 1.7 mV ($P < 0.01$), and from 96.7 ± 15.4 to 24.2 ± 8.8 mV/s ($P < 0.005$), respectively.

The large slow waves (16 mV) superimposed on a membrane potential of -43 mV in the presence of 30.9 mM KCl, suggests that the permanent inactivation of an outward conductance rather than a voltage inactivation of an inward conductance, is responsible for the slow wave inhibition by the depolarization induced by current or sodium pump blockade.

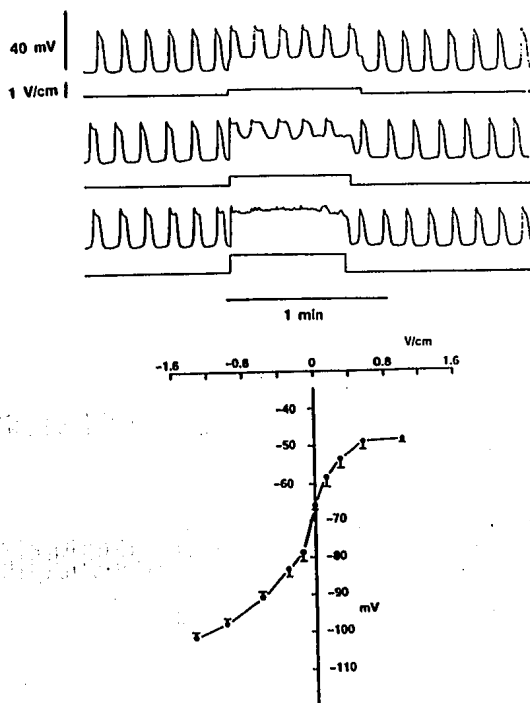


Figure 8a

Effect of current induced depolarization on slow wave activity. Depolarization, induced by long-lasting current pulses, caused reduction of the slow wave amplitude and rate of rise.

Figure 8b

The construction of an I/V relationship using these data and those of hyperpolarizing pulses confirmed the presence of inward rectification and outward rectification (see also previous paper).

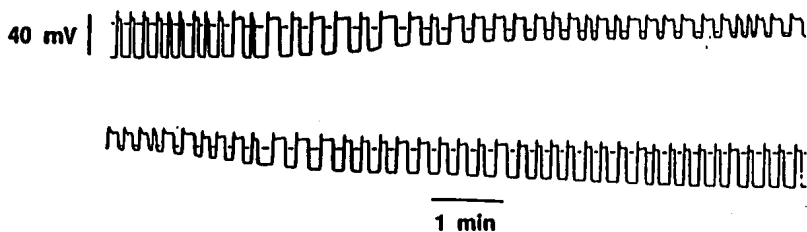


Figure 9

A decrease in the membrane potential by 30.9 mM K^+ to a level similar to that obtained by injection of current (figure 8) did not abolish slow wave activity. This is consistent with a role of the inward rectifier potassium conductance in slow wave generation, since this conductance will be persistently blocked by current induced depolarization but not by 30 mM K^+ which keeps the K equilibrium potential close to the resting membrane potential (see also discussion).

DISCUSSION

The results of the present paper support the hypothesis that slow waves in the circular muscle of the canine colon are generated by ionic conductance changes.

Slow wave generation is dependent on extracellular calcium since slow waves are abolished within 6 minutes in Ca^{2+} free solution. The disappearance of the slow waves occurred before the depolarization developed in Ca^{2+} free solution. Furthermore, slow waves do not appear after current induced hyperpolarization. In addition, perfusion with Ca^{2+} free solution depolarized the membrane to between -50 and -65 mV. Similar depolarization by current injection (this study) or Na^+ free HEPES (previous paper) did not abolish the slow waves. These data indicate that the disappearance of the slow waves was not the result of membrane depolarization. The abolishment of the slow wave in the absence of extracellular calcium can be explained by a) a participation of a D600-insensitive calcium conductance, and/or a calcium dependent conductance in the slow wave generation; b) an essential role of calcium in metabolic processes involved in slow wave generation (Paul, 1987).

The generation of the slow waves does not depend on an increase in sodium permeability. No evidence for a TTX sensitive Na conductance was obtained. Furthermore, large slow waves occurred after abolishment of the sodium gradient. Low sodium solutions did affect the shape and the frequency of the slow waves, in a manner similar to that of D600. For instance the upstroke potential decreased - 20%, and the plateau potential was inhibited. This indicates that low sodium solutions inhibit the D600-sensitive calcium conductance, which could result by a direct effect,

or by enhancing the outward conductances during the lowering of the Na^+ concentration.

The sodium dependency of the slow wave generation may be different in the small intestine (El-Sharkawy and Daniel, 1975b). Low sodium solutions (13% of normal) abolished slow wave activity without depolarization of the membrane. This was interpreted as evidence for a dependency of slow wave generation on a sodium conductance. However, the replacement of sodium by lithium or sucrose is likely affecting calcium conductance in this tissue as well, since spiking activity and contraction are abolished even before any change in slow wave activity was noted. This indicates that there are similar indirect effects of the substances used to replace the Na^+ on the small intestine and the colon. Therefore, an alternative explanation for the abolishment of the slow wave activity in intestinal preparations might be a higher sensitivity to the indirect effects of Li and sucrose.

It has been suggested that an increase in the Cl^- conductance is involved in the depolarization phase during development of the slow wave in the small intestine. This hypothesis was based on the observation that the slow wave frequency decreased by replacing chloride ions by less permeable, and increased by more permeable anions (El-Sharkawy and Daniel, 1975b). In the colon, a decrease in the slow wave frequency was also observed when most of the Cl^- was replaced by the less permeable ion isothionate. If chloride would be carrying inward current for the slow wave depolarization, and if inhibition of this current would be the cause of the decrease in slow wave frequency, one would expect that the slow wave upstroke and rate of rise decreased as well. In contrast, the slow wave amplitude and the average rate of rise were increased when Cl^- was replaced

by isothecionate. These last observations suggest that the decrease in the slow wave frequency is not due to the low Cl^- . This hypothesis is supported by the fact that when we replaced NaCl by sucrose (only 13.3 mM of chloride present), the slow wave frequency increased. These results suggest that the generation of slow wave activity is not dependent on a Cl^- conductance. In support of this, it was reported that in the smooth muscle of the vas deferens the transmembrane movement of Cl^- is mainly if not solely through carriers (Aickin and Brading, 1983).

Both low Cl^- solutions used in the present study decreased the duration of the plateau phase of the slow waves: the plateau could be distinguished only by the presence of an inflexion point during the repolarization phase in isothecionate Krebs. However, the plateau amplitude and the membrane potential during the plateau (plateau potential) were not modified. Therefore, it is very unlikely that a Cl^- conductance is determining the depolarization level during the plateau in the circular muscle of the dog colon. A direct effect of the isothecionate on the mechanisms that regulate slow wave activity is an alternative explanation. Isothecionate can chelate Ca^{2+} (Christoffersen and Skibsted, 1975), possibly intracellularly, and this could be responsible for the decrease in slow wave duration and frequency, and would explain the abolishment of contractile activity in isothecionate Krebs (Barajas-López and Huizinga, unpublished observation). The effect of isothecionate Krebs (this study) and the effect of lowering calcium (< 0.5 mM; Barajas-López, Daniel and Huizinga, 1988c) are similar both in the dog colon and the small intestine (El-Sharkawy and Daniel, 1975b).

Previous studies suggested the involvement of a calcium dependent K conductance (K_{Ca}) in the regulation of the plateau potential. From the

present study some evidence emerges for a role of this conductance in the generation of the slow wave. When tissue was perfused with Na free HEPES, the membrane depolarized to ~ -50 mV and slow waves of reduced amplitude continued to develop. When D600 was added, the tissues depolarized within minutes to ~ -43 mV and slow waves disappeared. This disappearance was mediated by depolarization since repolarization caused return of slow wave activity. The depolarization induced by blockade of calcium influx is likely due to inhibition of a K_{Ca} conductance. It is likely that in normal Krebs, other K conductances maintain the resting membrane potential since D600 does not affect the membrane potential under these control conditions. However, in Na free HEPES, two factors increase the K_{Ca} conductance: the depolarization (Hagiwara, 1983; Hille, 1984) and the reduction in intracellular Na^+ (Hille, 1984; Marty, 1983; Singer and Walsh, 1984).

Slow waves can be seen as switching between two membrane potential levels, the resting membrane potential (~ -70 mV) and the plateau potential (~ -40 mV). The I/V curves suggest that between these two potentials there is an area of high membrane resistance. This high membrane resistance can be explained by the characteristics of the inward rectifier potassium conductance which closes after a small depolarization. Similar I/V curves have been observed in other cells (Sakmann and Trube, 1984; Gallin and Livengood, 1981; Lindau and Fernandez, 1986; Barajas-López and Huizinga, 1988d). The closing of the inward rectifier K conductance will be expected to occur during the slow wave depolarization. The slow wave generation could be initiated by a blockade of the inward rectifier conductance. This hypothesis is supported by: a) the clear dependency of the slow wave activity on the membrane potential, the slow waves disappear when the

membrane is depolarized to ~ -40 mV; b) the depolarization (up to ~ -40 mV) induced by 0 mM K, 0 mM Na in the presence of D600, or ouabain, was associated with a decrease in the inward rectifier potassium conductance (previous paper); c) After depolarization to ~ -40 mV, without blockade of the inward rectifier K conductance (by high potassium) slow waves of large amplitude were still present.

To test the hypothesis that slow waves are a consequence of a change in membrane conductance, the input membrane resistance at resting membrane potential and slow wave plateau have been compared, using short current pulses. A problem with this approach is that short depolarizing current pulses evoke premature slow waves at the resting membrane potential level and hyperpolarizing pulses terminate slow waves when applied at the plateau level. Comparing hyperpolarizing pulses at the resting membrane potential and depolarizing pulses at the plateau level, Szurszewski observed an increase in membrane conductance at the plateau level (Szurszewski, 1978). We obtained a similar finding (previous paper, figure 9). However, this increase in membrane conductance is likely caused by activation of the outward rectifier conductance. It seems likely that this approach does not reveal input resistance changes caused by the conductance(s) involved in initiating the slow wave activity.

In conclusion, slow waves are generated by cyclic membrane conductance changes. The pacemaker activity could be the result of: i) cyclic oscillations in a K conductance ii) cyclic oscillations in a D600-insensitive Ca^{2+} conductance, and/or iii) a Ca-dependent conductance. The conductance changes will be metabolically dependent. This suggests, that pacemaker mechanisms in gut smooth muscle have common characteristics with

the pacemaker activity in cardiac cells and beta cells of the pancreas, which are also closely related to the metabolism, the potassium conductance, and Ca^{2+} ions.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to acknowledge the assistance of Edwin Chow. This work has been financially supported by the MRC of Canada. Jan D. Huizinga is a MRC scholar; Carlos Barajas-López is a MRC fellow.

REFERENCES

1. AICKIN, C.C. & BRADING, A.F. (1983). Towards an estimate of chloride permeability in the smooth muscle of guinea-pig vas deferens. *Journal of Physiology* 336:179-192.
2. BARAJAS-LOPEZ, C. & HUIZINGA, J.D. (1988a). Mechanism of action of quinidine on the smooth muscle of the gastrointestinal tract. *Clinical and Investigative Medicine* Vol.11 (abstract). In press.
3. BARAJAS-LOPEZ, C. & HUIZINGA, J.D. (1988b). Heterogeneity in spontaneous and tetraethylammonium induced intracellular electrical activity in colonic circular muscle. *Pflugers Archiv* (European Journal of Physiology). 412:203-210.
4. BARAJAS-LOPEZ, C., DANIEL, E.E. & HUIZINGA, J.D. (1988c). Interstitial cells of Cajal mediate quinidine and quinine effects on the circular muscle of the dog colon. *Gastroenterology* (Abstract), In press.
5. BARAJAS-LOPEZ, C. & HUIZINGA, J.D. (1988d). Immunoglobulin E mediated membrane conductance changes in rat basophilic leukemia cells. *Canadian Journal of Physiology & Pharmacology* 66:328-331.
6. CAPRILLI, R. & ONORI, L. (1972). Origin, transmission and ionic dependence of colonic electrical slow waves. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 7:65-74.
7. CASTEELS, R. (1971). The distribution of chloride ions in smooth muscle cells of the guinea-pig's taenia coli. *Journal of Physiology* (London). 214:225-243.
8. CHRISTENSEN, J. (1987). Motility of the colon. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. (ed: L.R. Johnson), Raven Press, New York,

pp.665-693.

9. CHRISTOFFERSEN, G.R.J. & SKIRSTED, L.H. (1975). Calcium ion activity in physiological salt solutions: influence of anions substituted for chloride. *Comparative Biochemical Physiology* 52A:317-322.
10. CONNOR, J.A. PROSSER, C.L. & WEEMS, W.A.(1974). A study of pacemaker activity in intestinal smooth muscle. *Journal of Physiology (London)* 240:671-701.
11. DANIEL, E.E. (1965). Effects of intra-arterial perfusions on electrical activity and electrolyte contents of dog small intestine. *Canadian Journal of Physiology & Pharmacology* 43:551-577.
12. EL-SHARKAWY, T.Y. & DANIEL, E.E. (1975a). Electrogenic sodium pumping in rabbit small intestinal smooth muscle. *American Journal of Physiology* 229(5):1277-1286.
13. EL-SHARKAWY, T.Y. & DANIEL, E.E. (1975b). Ionic mechanisms of intestinal electrical control activity. *American Journal of Physiology* 229(5):1277-1286.
14. EL-SHARKAWY, T.Y. (1983). Electrical activities of the muscle layers of the canine colon. *Journal of Physiology (London)* 342:67-83.
15. FRIEDMAN, S.M. (1974). Lithium substitution and the distribution of sodium in the rat tail artery. *Circulation Research* 34:168-175.
16. GALLIN, E.K. & LIVENGOOD, D.R. (1981). Inward rectification in mouse macrophages: evidence for a negative resistance region. *American Journal of Physiology* 241:C9-C17.
17. HAGIWARA, S. (1983). *Membrane potential dependent ionic channels in cell membrane*. Raven Press, New York.
18. HILLE, B. (1984). *Ionic channels of excitable membranes*. bl: Sinauer

Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, U.S.A.

19. HUIZINGA, J.D., BARAJAS-LOPEZ, C., DEN HERTOG, A. & CHOW, E. (1988). Mechanisms of pacemaker generation in colonic circular muscle. II. Ionic basis. *Gastroenterology* (Abstract). In press.
20. JOB, D.D. (1969). Ionic basis of intestinal electrical activity. *American Journal of Physiology* 217(5):1534-1541.
21. LINDAU, M., FERNANDEZ, J.M. (1986). A patch clamp study of histamine-secretory cells. *Journal of General Physiology* 88:349-368.
22. LIU, J., FROSSER, C.L. & JOB D.D. (1969). Ionic dependence of slow waves and spikes in intestinal muscle. *American Journal of Physiology* 217:1542-1547.
23. MARTY, A. (1983). Blocking of large unitary calcium-dependent potassium currents by internal sodium ions. *Pflugers Archives*. 396:179-181.
24. PAUL, R.J. (1987). Smooth muscle mechano-chemical energy conversion: relations between metabolism and contractility. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. (ed. L.R. Johnson), Raven Press, New York, pp.483-506.
25. SAKMANN, B. & TRUEBE, C. (1984). Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart. *Journal of Physiology (London)*. 347:641-657.
26. SINGER, J.S. & WALSH J.V. (1984). Large conductance Ca^{2+} activated K^{+} channels in smooth muscle cell membrane. *Biophysical Journal* 45:68-70.
27. SMITH, T.K., REED, J.B. & SANDERS, K.M. (1987). Origin and propagation of electrical slow waves in circular muscle of canine proximal colon. *American Journal of Physiology* 252:C215-C224.

28. SZURSZEWSKI, J.H. (1978). A study of the canine gastric action potential in the presence of tetraethylammonium chloride. *Journal of Physiology (London)* 277:91-102.
29. WIENBECK, M. & CHRISTENSEN, J. (1971). Cationic requirements of colon slow waves in the cat. *American Journal of Physiology* 22:1513-519.