

Efeito do Envelhecimento Sobre o Comportamento Mecânico dos Músculos Papilares de Ratos Wistar

Antonio Carlos Cicogna, Carlos Roberto Padovani, Silvio Cesar Nardi, Marina Politi Okoshi
Botucatu, SP

Objetivo - Avaliar a influência do envelhecimento sobre o comportamento mecânico do músculo cardíaco.

Métodos - Músculos papilares isolados de ventrículo esquerdo de ratos Wistar com 1, 3, 6 e 12 meses de idade foram estudados em contração isométrica e isotônica, em solução de Krebs-Henseleit, com concentração de cálcio de 2,52 mM, frequência de estímulos de 0,2 Hz e temperatura de 28°C.

Resultados - A tensão máxima desenvolvida não mostrou variação significativa a partir de 3 meses. A velocidade de variação da tensão desenvolvida decresceu significativamente entre 1, 3 e 12 meses. O tempo para a tensão desenvolvida atingir o valor máximo elevou-se significativamente entre 1, 3 e 12 meses. O tempo para a tensão desenvolvida decrescer 50% do seu valor máximo aumentou significativamente entre 3 e 6 e 3 e 12 meses. A velocidade de variação de decréscimo da tensão desenvolvida decresceu entre 3 e 6 e 3 e 12 meses ($p < 0,05$). A tensão de repouso não mostrou variação entre grupos. O encurtamento máximo e o tempo para o pico do encurtamento aumentaram significativamente somente entre ratos com 1 e 3 meses. O tempo para o comprimento do músculo aumentar de 50% a partir do encurtamento máximo, elevou-se significativamente entre 3 e 6 e 3 e 12 meses. A variação relativa de comprimento, a velocidade de encurtamento e de relaxamento não mostraram variações significantes entre os vários grupos.

Conclusão - Os resultados sugerem que o envelhecimento altera a função mecânica do miocárdio. As modificações funcionais exteriorizam-se por meio de parâmetros derivados de contrações isotônica e/ou isométrica.

Palavras - Chave: envelhecimento, comportamento mecânico do miocárdio, músculos papilares de ratos.

Effects of Age on Mechanical Performance of Wistar Rat Papillary Muscles

Purpose - To evaluate the effects of age on mechanical performance of rat myocardium.

Methods - Left ventricular papillary muscles were isolated from male Wistar rats at 1, 3, 6 and 12 months of age. Muscles were studied isometrically and isotonicly, stimulated at 0.2 Hz, perfused with Krebs-Henseleit solution having an external calcium concentration of 2.52 mM, and maintained at 28°C.

Results - Peak isometric developed tension was significantly higher in 1 month than 3, 6 and 12 months. Peak rate of isometric tension rise decreased substantially between 1, 3 and 12 months. Time to peak isometric developed tension showed a significant increase of both 3 and 12 months of age. Time to half relaxation increased significantly from 3 to 6 and from 3 to 12 months. Maximum rate of tension decline decreased from 3 to 6 and from 3 to 12 months. No difference in resting tension was noted among any group. Isotonically, peak shortening and time to peak shortening increased from 1 to 3 months of age. Time to half relengthening increased from 3 to 6 and from 3 to 12 months of age. No difference in peak shortening velocity, peak relaxation velocity and relative change in muscle length was noted among any groups.

Conclusion - The maturation affects the mechanical performance of cardiac muscle.

Key-words: aging, myocardial performance, rat papillary muscle.

Arq Bras Cardiol, volume 60, n° 4, 215-219, 1993

provenientes de processos patológicos associados. Numerosos estudos tem demonstrado que a maturação afeta diferentes variáveis como, por exemplo, audição, visão, função renal, pulmonar e imunológica, densidade óssea e atividade do sistema nervoso autonômico simpático¹. A influência do envelhecimento sobre o sistema cardiocirculatório tem sido objeto de numerosos estudos. Estes têm demonstrado que o processo de maturação acarreta importantes modificações no comportamento bioquímico, elétrico e mecânico do músculo cardíaco. Assim, investigadores tem constatado que o envelhecimento promove alterações na capacidade ATPásica da miosina, na velocidade de captação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático, no potencial transmembrana e em determinados parâmetros avaliadores da função mecânica cardíaca²⁻⁶.

Os músculos papilares isolados de ratos tem sido largamente utilizados na avaliação do desempenho mecânico do miocárdio durante o processo de envelhecimento^{3,4,6}. Estudos realizados com esse tipo de preparação mostraram que a maturação acarreta modificações em determinados parâmetros, oriundos de contração isométrica e/ou isotônica, como, por exemplo, na tensão máxima desenvolvida e velocidade de encurtamento^{3,4,6}. Os trabalhos realizados mostraram, entretanto, resultados conflitantes^{2,3,7}.

Na presente investigação procurouse reavaliar o papel do envelhecimento sobre propriedades mecânicas cardíacas na fase de contração e relaxamento. Músculos papilares isolados provenientes de ratos Wistar com 1, 3, 6 e 12 meses de idade foram analisados por meio de parâmetros derivados de contrações isométrica e isotônica.

Métodos

Foram utilizados ratos, machos, Wistar, provenientes do Biotério Central do Campus de Botucatu, com idade de 1, 3, 6 e 12 meses. Os animais foram decapitados, os tórax abertos, os corações removidos rapidamente e colocados em solução de Krebs-Henseleit⁸, previamente oxigenada (10 min) com 95% de oxigênio (O₂) e 5% de dióxido de carbono (CO₂). Após os corações terem sido removidos da solução, dissecou-se o ventrículo direito com a finalidade de se expor o septo interventricular. Esse foi, então, dividido ao meio a fim de permitir a exposição adequada dos dois músculos papilares do ventrículo esquerdo, anterior e posterior. O ventrículo esquerdo foi, posteriormente, separado em duas partes, cada uma contendo o seu músculo papilar. A seguir, um músculo foi cuidadosamente dissecado numa câmara contendo solução de Krebs-Henseleit, adequadamente oxigenada e aquecida a 28°C. Durante a dissecação manteve-se, nas extremidades do músculo, segmentos da parede livre e do septo interventricular. Esses excessos de musculatura foram presos em anéis de aço inoxidável, o

que evitou a lesão das extremidades do músculo papilar. A seguir o músculo foi, rapidamente, transferido para uma câmara de vidro contendo solução de Krebs-Henseleit constantemente oxigenada com 95% de O₂ e 5% de CO₂, e mantida à temperatura de 28°C, graças ao uso de banho circulante. O músculo papilar foi suspenso verticalmente na câmara de vidro, sendo que a extremidade tendinosa superior foi conectada, via anel e fio de aço inoxidável de 0,038 cm de diâmetro, à extremidade do braço longo de uma alavanca isotônica. A extremidade inferior do músculo, via anel e fio de aço, semelhantes aos descritos anteriormente, foi conectada a transdutor de força (Kyowa 120T-20B); o fio de aço atravessava uma fenda, preenchida por mercúrio, existente no assoalho da câmara de vidro. Na extremidade do braço curto da alavanca foi suspenso um peso de 5 a 10 g (pré-carga), que tinha por finalidade promover estiramento inicial do músculo papilar. Sobre a extremidade do braço longo da alavanca existia um micrômetro que permitiu, pela possibilidade de controlar a extensão dos movimentos da alavanca, ajustar o comprimento de repouso do músculo. Sobre a extremidade do braço curto foi montado transdutor de comprimento (Hewlett-Packard, modelo 7 DCDT-050), que mediu variações de comprimento durante as contrações musculares. A alavanca era de magnésio e alumínio, rígida, leve, sendo a razão entre os braços longo e curto de 4:1.

Os músculos foram estimulados 12 vezes por minuto por meio de eletrodos de platina tipo agulha, acoplados a estimulador elétrico, que libera estímulos em onda quadrada de 5ms, com voltagem aproximadamente 10% maior que o mínimo necessário para provocar resposta mecânica máxima do músculo. A composição da solução de Krebs-Henseleit, em milimoles por litro, utilizada foi: 118,5 NaCl; 4,69 KCl; 2,52 CaCl₂; 1,16 MgSO₄; 1,18 KH₂PO₄; 5,50 glicose e 25,88 NaHCO₃. A pressão parcial de oxigênio (PO₂) da solução foi mantida entre 550 e 600mmHg.

Após um período de 60 min, durante os quais os músculos contraíram somente contra a pré-carga (contração isotônica), a alavanca foi impedida de se movimentar, às custas de colocação adicional de carga (pós-carga) na extremidade do braço curto da alavanca. Estando em contração isométrica, os músculos foram estirados cuidadosamente até atingir o ápice da curva comprimento-tensão desenvolvida (comprimento diastólico da fibra muscular associado com tensão máxima desenvolvida isométrica foi denominado de L_{máx}). Após serem novamente colocados em contração isotônica durante 5 min, os músculos foram postos em contração isométrica para a determinação final de L_{máx}. O experimento foi iniciado após 15 min de contração isométrica estável. Preparações instáveis ou com desempenho não satisfatório não foram utilizadas. Os seguintes parâmetros isométricos foram medidos: tensão máxima desenvolvida (TD), tensão de repouso (TR), tempo para a tensão desenvolvida atingir

o valor máximo (TPT), velocidade de variação da tensão desenvolvida (+ dT/dt), velocidade de variação do decréscimo da tensão desenvolvida (- dT/dt) e tempo para a tem-são desenvolvida decrescer 50% do seu valor máximo (TR₅₀).

Após o término do registro isométrico, os músculos foram colocados em contração isotônica. Todos os parâmetros isotônicos foram registrados com os músculos contraíndo contra carga total (pré-carga mais pós-carga) a mais leve possível, mas que mantivesse os músculos com comprimento de repouso igual a L_{máx}. Os seguintes parâmetros isotônicos foram medidos: pico de encurtamento máximo (E_{máx}), variação relativa de comprimento (L_{máx} E_{máx} / L_{máx}), tempo para o pico de encurtamento (TE_{máx}), velocidade de encurtamento (+ dL/dt), velocidade de relaxamento (- dL/dt) e tempo para comprimento aumentar de 50% a partir do encurtamento máximo (TE₅₀). Os parâmetros mecânicos foram registrados no polígrafo da Gould 2200S, com velocidade de transporte de papel regulada para 100 milímetros por segundo. Os valores da TD, TR, +dT/dt e -dT/dt foram normalizados para área seccional do músculo. Os valores da velocidade de encurtamento e de relaxamento foram divididos pelo comprimento em repouso do musculo(L_{máx}).

Os parâmetros usados para caracterizar os músculos papilares, individualmente, foram: comprimento (mm), peso (mg) e área seccional (mm²). O comprimento in vitro, em L_{máx}, foi medido com auxílio de paquímetro. A porção do músculo entre os anéis de aço foi submetida a secagem com papel de filtro e pesada. Assumindo-se que o músculo papilar tem forma geométrica uniforme, cilíndrica e peso específico 1,00, a área seccional foi calculada, dividindo-se o peso do músculo pelo seu comprimento. Os seguintes parâmetros corpóreos dos ratos foram determinados: peso corporal, do coração, do VE. As relações entre pesos dos corações e do VE com peso corpóreo dos ratos também foram analisadas. Os valores obtidos são apresentados como média ± desvio padrão. As comparações entre os grupos foram feitas por análise de variância para experimentos inteiramente casualizados, complementadas pelo teste de Tukey. O nível de significância foi considerado a 5%.

Resultados

Os dados corpóreos dos animais estão expostos na tabela I. A análise comparativa entre os diferentes grupos de ratos Wistar mostrou que: 1) o peso corporal elevou-se com a maturação, embora animais com 6 e 12 meses não apresentaram variação significativa de peso; 2) os pesos do coração e do VE elevaram-se progressiva e significativamente entre animais com 1 a 12 meses; 3) as relações, coração/peso corpóreo e VE/peso corpóreo, dos ratos com 1 mês, foram significativamente maiores do que as verificadas nos outros grupos de animais. Os va-

| Parâmetros | Idade (meses) | | | |
|------------------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|
| | 1 (n=16) | 3 (n=10) | 6 (n=12) | 12 (n=15) |
| Peso Corpóreo (g) | 111 ± 9 ^a | 289 ± 11 ^b | 438 ± 19 ^c | 471 ± 40 ^c |
| Peso Coração (g) | 0,42±0,04 ^a | 0,75±0,06 ^b | 1,17±0,09 ^c | 1,31±0,11 ^d |
| Peso VE (g) | 0,29 ± 0,03 ^a | 0,54±0,05 ^b | 0,84±0,07 ^c | 0,92 ± 0,07 ^d |
| Coração | | | | |
| Peso Corpóreo (g×10 ³) | 3,79±0,32 ^a | 2,62±0,23 ^a | 2,66±0,18 ^a | 2,80±0,26 ^a |
| VE | | | | |
| Peso Corpóreo (g×10 ³) | 2,64±0,21 ^b | 1,87±0,18 ^a | 1,92±0,15 ^a | 1,97±0,16 ^a |

Valores expressos em média ± desvio padrão; VE: ventrículo esquerdo; g: grama; n= numero de ratos. ^{a, b, c, d}: as diferentes letras apontam diferenças estatisticamente significantes entre as idades a nível de 5%.

| Parâmetros | Idade (meses) | | | |
|------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 1(n=16) | 3(n=10) | 6(n=12) | 12(n=15) |
| Peso (mg) | 1,61±0,62 ^a | 4,25 ± 1,25 ^b | 5,28±1,36 ^c | 6,36±1,24 ^d |
| L (mm) | 3,91±0,48 ^a | 5,24±0,76 ^b | 5,90±0,62 ^c | 6,78 ± 0,73 ^d |
| AS (mm) | 0,40 ± 0,13 ^a | 0,80±0,19 ^b | 0,89 ± 0,17 ^b | 0,94±0,16 ^b |

Valores expressos em médias ± desvio padrão; L : comprimento de repouso associada a tensão máxima desenvolvida isométrica; AS: área seccional; mg: miligrama; mm: milímetro; mm²: milímetro quadrado, n= número de preparações. ^{a, b, c, d}: as diferentes letras apontam diferenças estatisticamente significantes entre as idades a nível de 5%.

| Parâmetros | Idade (meses) | | | |
|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| | 1(n=16) | 3(n=10) | 6(n=12) | 12(n=15) |
| TD (g/mm ²) | 10,32±2,49 ^b | 8,78±1,40 ^a | 7,72±1,34 ^a | 7,64±1,08 ^a |
| TR (g/mm ²) | 0,55±0,16 ^a | 0,52± 0,15 ^a | 0,47±0,23 ^a | 0,41±0,19 ^a |
| TPT (ms) | 148 ± 14 ^a | 174 ± 20 ^b | 182 ± 16 ^{b,c} | 192 ± 15 ^c |
| +dT/dt (g/mm ² /s) | 114 ± 28 ^c | 91 ± 19 ^b | 77 ± 16 ^b | 67 ± 11 ^a |
| TR50 (ms) | 204 ± 33 ^a | 204±21 ^a | 231 ± 24 ^b | 234 ± 31 ^b |
| -dT/dt (g/mm ² /s) | 33 ± 10 ^b | 31 ± 8 ^b | 22 ± 3 ^b | 24 ± 5 ^a |

Valores expressos em média ± desvio padrão; n= número de preparações; TD: tensão máxima desenvolvida; TR: tensão de repouso; TPT: tempo para a tensão desenvolvida atingir o valor máximo; TR : tempo para a tensão desenvolvida decrescer 50% do seu valor máximo; +dT/dt: velocidade de variação da tensão desenvolvida; -dT/dt: velocidade de variação de decréscimo da tensão desenvolvida; g/mm²: grama por milímetro quadrado; g mm²/s: grama por milímetro quadrado por segundo; ms: milissegundo. ^{a, b, c}: as diferentes letras apontam diferenças estatisticamente significantes entre as idades a nível de 5%.

lores dos parâmetros morfológicos dos músculos papilares dos corações dos ratos Wistar estão expostos na tabela II. Os resultados mostram que: 1) ocorreu elevação significativa no peso e em L_{\max} dos músculos durante a maturação; 2) a área seccional (AS) dos animais com 1 mês foi significativamente inferior a dos outros grupos de animais.

Os dados obtidos da contração isométrica estão expostos na tabela III. A análise dos valores obtidos mostrou que: 1) a TD dos ratos com 1 mês foi significativamente superior a dos outros grupos de animais; 2) a TR não se alterou de modo significativo com a maturação; 3) o TPT elevou-se em função da idade, embora ratos com 3 e 6 meses e 6 e 12 meses não mostraram variação significativa no TPT ($P>0,05$); 4) a $+dT/dt$ decresceu com o envelhecimento; animais com 3 e 6 e 6 e 12 meses não apresentaram valores significativamente diferentes; 5) a TR_{50} e $-dT/dt$ não mostraram valores estatisticamente diferentes entre animais com 1 e 3 meses e 6 e 12 meses.

Os resultados obtidos com a contração isotônica estão expostos na tabela IV. A análise dos dados revelou que: 1) E_{\max} e TE_{\max} dos ratos com 1 mês foram significativamente inferiores aos outros grupos de animais; 2) $L_{\max} - E_{\max}/L_{\max} + dL/dt$ e $-dL/dt$ não se alteraram durante a maturação ($P>0,05$); 3) TE_{50} dos ratos com 1 e 3 meses diferiu significativamente dos ratos com 6 meses; 4) TE_{50} dos animais com 3 e 6 e 3 e 12 meses mostraram valores significativamente diferentes ($P<0,05$).

Tabela IV - Parâmetros obtidos de contração isotônica

| Parâmetros | Idade (meses) | | | |
|----------------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|
| | 1(n=10) | 3(n=9) | 6(n=12) | 12(n=15) |
| E_{\max} (mm) | 1,10±0,12 ^a | 1,46±0,28 ^b | 1,46±0,24 ^b | 1,70±0,33 ^b |
| TE_{\max} (ms) | 169 ± 17 ^a | 184 ± 17 ^b | 197 ± 13 ^b | 196 ± 17 ^b |
| $L_{\max} - E_{\max}$ | 0,74 ± 0,02 ^a | 0,73 ± 0,03 ^a | 0,73±0,03 ^a | 0,75±0,03 ^a |
| L_{\max} $+dL/dt$ (cm/s) | 2,62 ± 0,25 ^a | 2,87±0,55 ^a | 2,76±0,60 ^a | 2,81±0,71 ^a |
| TE_{50} (ms) | 78 ± 18 ^{ab} | 73 ± 8 ^a | 88 ± 12 ^c | 84 ± 7 ^a |
| dL/dt (cm s) | 3,50±0,80 ^a | 4,35±0,94 ^a | 3,624±0,73 ^a | 3,99±0,92 ^a |

Valores expressos em média ± desvio padrão; n= número de preparações; E_{\max} : encurtamento máximo; L_{\max} : comprimento de repouso associado a tensão máxima desenvolvida isométrica; TE_{\max} : tempo para atingir o encurtamento máximo; TE_{50} : tempo para comprimento aumentar de 50% a partir do encurtamento máximo; $\pm dL/dt$: velocidade de encurtamento; $-dL/dt$: velocidade de relaxamento; mm: milímetro; ms: milissegundo; cm/s: comprimento muscular por segundo. ^{a,b,c}: as diferentes letras apontam diferenças estatisticamente significantes entre as idades a nível de 5%.

Discussão

Como já referido anteriormente, os músculos papilares isolados são amplamente utilizados na avaliação do comportamento mecânico do músculo cardíaco, provenientes de corações normais ou patológicos, nas condições basais ou frente a diferentes estímulos. Entretanto, ao se analisar a função muscular ventricular por meio desta metodologia, deve-se levar em conta dois fatores que podem alterar os resultados dos experimentos: os introduzidos pelo pesquisador (tab. V) e os inerentes ao próprio sistema metodológico. Neste último, destacam-se a possibilidade da ocorrência de oxigenação inadequada e a lesão das extremidades dos músculos⁹⁻¹¹. Sendo a oxigenação dos músculos isolados realizada por difusão, a utilização de fibra cardíaca com área seccional elevada pode alterar os resultados dos experimentos. A ocorrência de hipóxia na região central da fibra acarreta alteração no desempenho mecânico do músculo¹². Apesar da controvérsia existente na literatura, acredita-se que músculos com áreas seccionais inferiores a 1,2mm² apresentam-se devidamente oxigenados¹³. Outro fator que modifica a função mecânica dos músculos papilares são as lesões nas extremidades, que ocorrem no momento em que os músculos são presos a anéis de aço. Esse fator atenua, por exemplo, os valores obtidos da contração isométrica¹¹. Visto que, neste experimento utilizamos músculos com áreas seccionais inferiores a 1,2 mm² (tab. II), e as lesões nas extremidades foram similares em todos músculos, acreditamos que a influência dos fatores referidos nos resultados ocorreu de maneira uniforme em todos grupos de ratos. O presente experimento demonstrou que a função mecânica dos músculos papilares modificou-se durante o processo de maturação. As alterações manifesta-

Tabela V - Erros introduzidos pelo experimentador

| | |
|---|--|
| - | Uso de músculos com morfologia não apropriada |
| - | Dissecação inadequada |
| - | Estiramento muscular excessivo |
| - | Tempo insuficiente para a preparação se estabilizar |
| - | Erro no preparo da solução nutritiva |
| - | Solução, temperatura e frequência de estímulos impróprias para o experimento |
| - | Ajuste inadequado do sistema metodológico |

ram-se por meio de variáveis derivadas das contrações isométrica e isotônica (tab. III e IV). Assim, constataram-se entre outras modificações, variações na TD, $+dT/dt$, TPT, E_{\max} e TE_{\max} .

Os trabalhos da literatura, que analisaram o papel do envelhecimento no comportamento mecânico dos músculos papilares de ratos, mostraram resultados conflitantes para determinados parâmetros isométricos ou isotônicos^{2,3,7}. Em geral, constatou-se que, enquanto variáveis com TD e TPT aumentam, parâmetros como $+dT/dt$, E_{\max} e $+dL/dt$ decrescem com o envelhecimento^{3,6,7}. O

confronto dos dados de literatura com os do presente estudo mostra pontos concordantes e divergentes, os quais estão na dependência dos parâmetros e do tipo de contração analisada. Chama a atenção o comportamento da $+dL/dt$; enquanto neste experimento $+dL/dt$ não se alterou significativamente com a idade, nos trabalhos revisitos constatou-se que $+dL/dt$ decresceu com o envelhecimento.

Os mecanismos responsáveis pelas alterações no desempenho mecânico dos músculos papilares durante o processo de envelhecimento não estão esclarecidos. Estudos prévios demonstraram que em animais mais idosos ocorre redução na atividade ATPásica miofibrilar, prolongamento do potencial transmembrana e redução da velocidade de captação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático^{2,4}. A diminuição da atividade enzimática da miosina tem sido responsabilizada pela queda da velocidade máxima de encurtamento dos músculos encontrada na maioria dos experimentos⁴. As alterações no potencial de ação transmembrana e nas funções do retículo sarcoplasmático podem ser importantes fatores envolvidos nas modificações que ocorrem no comportamento mecânico do miocárdio durante o processo de maturação^{2,3}.

Em resumo, podemos concluir por este trabalho que: a) há variação no desempenho dos músculos cardíacos dos ratos Wistar durante o processo de envelhecimento; b) as alterações nas atividades mecânicas dos músculos papilares manifestam-se por diferentes parâmetros oriundos da contração isométrica e/ou isotônica; c) as informações disponíveis na literatura não

esclarecem, de modo satisfatório, os mecanismos responsáveis pelas variações mecânicas constatadas durante o processo de maturação.

Referências

1. Rowe JW, Kahn RL - Human aging: Usual and successful. *Science*, 1987; 237:143-9.
2. Lakatta EG, Yin FCP - Myocardial aging: functional alterations and related cellular mechanisms. *Am J Physiol*, 1982; 242: H927- H949.
3. Capasso JM, Malhotra A, Remily JS, Sonnenblick EH - Effects of age on mechanical and electrical performance of rat myocardium. *Am J Physiol*, 1983; 245: H72- H81.
4. Bhatnagar GM, Walford GD, Beard ES, Humphreys S, Lakatta EG - ATPase activity and force production in myofibrils and twitch characteristics in intact muscle from neonatal, adult, and senescent rat myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 1984; 16: 203-18.
5. Davies P, Dewar J, Tynan M, Ward R - Post-natal developmental changes in the length-tension relationship of cat papillary muscles. *J Physiol*, 1975; 253: 95-102.
6. Capasso JM, Remily RM, Sonnenblick EH - Alterations in mechanical properties of rat papillary muscle during maturation. *Am J Physiol*, 1982; 242: H359-H364.
7. Wei JY, Spurgeon HA, Lakatta EG - Excitation-contraction in rat myocardium: alterations with adult aging. *Am J Physiol*, 1984; 246: H784- H791.
8. Krebs HA, Henseleit K - Untersuchungen über die Harnstoff- bildung im Tierkörper. *Hoppe-Seyler's. Z Physiol Chem*, 1932; 210: 33-66.
9. Snow TR, Bressler PB - Oxygen sufficiency in working rabbit papillary muscle at 25°C. *J Mol Cell Cardiol*, 1977; 9: 595-604.
10. Paradise NF, Schmitter JL, Surmitis JM - Criteria for adequate oxygenation of isometric kitten papillary muscle. *Am J Physiol*, 1981; 241: H348- H353.
11. Donald TC, Reeves DNS, Reeves RC, Walker AA, Hefner LL - Effect of damaged in papillary muscle preparations. *Am J Physiol*, 1980; 238: H14- H23.
12. Bing OHL, Frezza WA - PO₂ modulate performance of cardiac muscle. *Am J Physiol*, 1976; 231:1620-24.
13. Capasso JM, Malhotra A, Schever J, Sonnenblick EH - Myocardial biochemical, contractile and electrical performance after imposition of hypertension in young and old rats. *Circ Res*, 1986; 58: 445-60.