

Artigo Original

recebido: 16/10/2000 e aceito em 19/12/2000

**Resposta contrátil de miócitos
cardíacos isolados a níveis
fisiológicos de pressão
hidrostática**

*Contractile response of isolated
cardiac myocytes to physiological
levels of hydrostatic pressure*

Wagner Vicentin

Departamento de Engenharia Biomédica,
Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação e
Centro de Engenharia Biomédica
UNICAMP

Paulo Alberto Paes Gomes

Núcleo de Pesquisas Tecnológicas
Universidade de Mogi das Cruzes

Rosana Almada Bassani

Centro de Engenharia Biomédica – UNICAMP

José Wilson Magalhães Bassani

Departamento de Engenharia Biomédica
Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação e
Centro de Engenharia Biomédica
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Caixa Postal 6040 - Centro de Engenharia Biomédica
13083-970 – Campinas - São Paulo
e-mail: bassani@ceb.unicamp.br

Resumo

Com o advento da técnica de isolamento de células cardíacas por digestão enzimática, tornaram-se possíveis inúmeros estudos sobre a atividade contrátil cardíaca. Muito se tem progredido no estudo do acoplamento excitação-contracção no coração sadio e doente. Contudo, na situação fisiológica, as células do coração estão submetidas a pressões da ordem de 100 mmHg durante parte do ciclo cardíaco, condição na qual se desconhece o comportamento dos miócitos, provavelmente pela dificuldade de montagem de preparação adequada. Com a possibilidade de medição de encurtamento celular por meio da detecção de borda de sinal de vídeo, realizamos um estudo do efeito de níveis diferentes de pressão, na faixa fisiológica, sobre a atividade contrátil de miócitos ventriculares isolados de ratos adultos, usando para isto uma câmara de perfusão desenvolvida no nosso laboratório. Os resultados indicaram que, para pressões supra-atmosféricas de até 140 mmHg, o limiar estimulatório, amplitude do encurtamento, tempo para encurtamento máximo e duração total da contracção não foram afetados significativamente. Concluímos que a pressão hidrostática aplicada não deve submeter os miócitos a qualquer tensão, indicando que estes aparentemente comportam-se como recipientes homoganeamente preenchidos de fluido incompressível.

Palavras-chaves: Atividade contrátil, Coração, Encurtamento celular, Miócitos cardíacos isolados, Pressão hidrostática.

Abstract

With the advent of the techniques for cardiac cell isolation by enzymatic digestion, a great number of studies concerning cardiac contractile activity became feasible. Particularly, substantial progress has been made in the understanding of excitation-contraction coupling in both healthy and diseased heart. Although under physiological conditions the heart chambers experience pressures above 100 mmHg, information on the behavior of isolated cardiac myocytes under supra-atmospheric pressure is scarce in literature, probably due to the intrinsic difficulties of this type of experiment. With the possibility of measuring cell shortening by video image edge detection, we were able to study contractile activity of isolated adult rat myocytes at different levels of hydrostatic pressure, using a perfusion chamber developed in our laboratory. Our results indicate that hydrostatic pressure from 0 to 140 mm Hg did not affect significantly the threshold for electrical stimulation, peak cell shortening and contraction time-course. We conclude that, under this range of supra-atmospheric pressure, cardiac cells behave as a closed compartment homogeneously filled with incompressible fluid.

Keywords: Cell shortening, Contractile activity, Heart, Hydrostatic pressure, Isolated cardiac myocytes.

Extended Abstract

Introduction

With the advent of the techniques for cardiac cell isolation by enzymatic digestion, a great number of studies concerning cardiac contractile activity became feasible. Particularly, substantial progress have been made in the understanding of excitation-contraction coupling in both healthy and diseased heart. Although under physiological conditions the heart chambers experience pressures above 100 mm Hg, information on the behavior of isolated cardiac myocytes under supra-atmospheric pressure is scarce in literature, probably due to the intrinsic difficulties of this type of experiment. With the possibility of measuring cell shortening by video image edge detection, we were able to study contractile activity of isolated adult rat myocytes at different levels of hydrostatic pressure, using a perfusion chamber developed in our laboratory. Our results indicate that hydrostatic pressure from 0 to 140 mm Hg did not affect significantly the threshold for electrical stimulation, peak cell shortening and contraction time-course. We conclude that, under this range of supra-atmospheric pressure, cardiac cells behave as a closed compartment homogeneously filled with incompressible fluid.

Materials and Methods

We used ventricular myocytes isolated by enzymatic digestion (Bassani et al., 1992) from adult male Wistar rats. Cells were plated on a plexiglas chamber designed for pressurized condition (Fig. 1) and perfused with normal Tyrode solution (mM): NaCl 140; KCl 6; MgCl₂ 1.5; HEPES 5; glicose 11.1 e CaCl₂ 1; pH 7.4 at 23 °C. Cell contractions was monitored through the glass window which formed the bottom of the chamber by a video camera set-up. Cell shortening, which was measured with a video edge detector, was expressed as percent of resting cell length (RCL). After cells were equilibrated in Tyrode solution under electric field stimulation by a pair of parallel platinum electrodes (0.5 Hz, 2ms duration), stimulation threshold was determined and voltage amplitude was set to 20% above threshold level.

Pressure inside the chamber was monitored by using an aneroid pressure-meter connected to the perfusion line. Solution flow rate was set to 2 ml/min at a given pressure by adjusting the input pressure (applied to the perfusion line by a rubber bulb assembly) and output resistance.

Before measuring contractions, solution flow was interrupted, the desired pressure level (40, 80, 120 or 140 mm Hg) was applied, and, after contraction amplitude stabilized, the output signal from the video edge detector (at least 10 contractions) was acquired and stored in a 486 PC type computer. Application of supra-atmospheric pressures was always preceded by contraction measurement at zero mm Hg.

Statistical comparison of the stimulation threshold, as well as of contraction parameters (i.e., peak shortening, time to peak shortening and total contraction duration) was performed by one-way analysis of variance (statistical significance for $P < 0.05$).

Results

Figure 4 summarizes the main results obtained. Cell contraction was not changed even when cells were under pressure greater than 120 mm Hg. There were no changes in either peak shortening (average of 8.4 ± 0.4 % of RCL) or in time course of the contractions. Supra-atmospheric pressure also failed to affect the threshold for cell electrical stimulation.

Discussion

Pressure overload of the heart, generating mechanical stress on cardiac cells, is an important signal for cell hypertrophy (Opie, 1998). However, our results suggest that pressure application upon isolated cardiac myocytes has not resulted in cell stretch. If cells had been submitted to stretch, increase in contraction amplitude would have been expected, since stretch has been shown to cause opening of sarcolemmal calcium channels and increase the amount of calcium stored in the sarcoplasmic reticulum, which is the main source of contraction-activating calcium in mammalian heart (Bluhm & Lew, 1995; Crozatier, 1996).

If external pressure increase did not generate either stretch or tension, it would be plausible to concluded that, as a first order approximation, the isolated cardiac myocyte, under the present experimental conditions, behaves as a uniform compartment filled by homogeneously distributed, incompressible fluid.

We cannot discard the possibility that late changes (e.g., in genetic expression) might occur, even though acute responses were not present during the time-frame of our experiments. This possibility is presently under investigation in our laboratory.

Introdução

Em condições fisiológicas e em repouso, o coração trabalha em um regime alternado de pressão, que varia, dentro da câmara ventricular esquerda, de cerca de 5 mm Hg na diástole para cerca de 120 mmHg na sístole. Isto significa que as células ventriculares experimentam pressões supra-atmosféricas durante todo o ciclo cardíaco.

Com o advento da técnica de isolamento de miócitos ventriculares por digestão enzimática (Powell et al., 1980; Silver et al., 1983; Farmer et al., 1983; Capogrossi et al., 1986), tornaram-se possíveis estudos de diversas naturezas, buscando conhecer melhor os mecanismos envolvidos na contração muscular cardíaca. Com esta técnica pode-se, por exemplo, estudar os principais mecanismos envolvidos no processo de acoplamento excitação-contração no músculo cardíaco (Bers, 1991), além de uma infinidade de outros estudos envolvendo atividades elétrica e contrátil. Não temos conhecimento, contudo, de qualquer trabalho que tenha procurado utilizar, como parte das condições experimentais, a condição de pressurização, visando estabelecer proximidade com a situação fisiológica. É possível que as dificuldades inerentes ao isolamento de células, associadas à relativa inacessibilidade das células em câmaras fechadas, tenham desencorajado o desenvolvimento deste tipo de estudo.

É sabido que fatores físicos como a força da gravidade, tensão, pressão e força de cisalhamento afetam o crescimento e remodelamento de tecidos biológicos em nível celular (Ingber, 1997). O fato concreto é que ainda não se sabe claramente como os eventos mecânicos são transformados em sinais biológicos e qual seria a entrada (estímulo físico) realmente adequada, embora esteja bem definido que crescimento celular, diferenciação, secreção e outras respostas biológicas podem ser afetadas pelo *stress* mecânico.

Com uso da técnica de medição de encurtamento por detecção de borda de sinal de vídeo, já amplamente utilizada há vários anos em nosso laboratório, tornou-se possível acesso a um parâmetro da atividade contrátil, o encurtamento celular, de modo não-invasivo à célula. Nosso objetivo no presente trabalho foi construir um dispositivo para medição de encurtamento celular em regime de pressões próximas à faixa fisiológica e estudar o efeito de diferentes níveis de pressão hidrostática sobre o limiar estimulatório, a amplitude das contrações e o curso temporal do encurtamento desenvolvido por miócitos ventriculares isolados de rato.

Materiais e Métodos

Animais

Foram utilizados ratos Wistar adultos, pesando 300-400 g, provenientes do Centro de Bioterismo (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os animais foram alojados em gaiolas coletivas no biotério do Centro de Engenharia Biomédica (CEB) da UNICAMP, recebendo água e ração *ad libitum*, e não sofreram manipulação experimental até o dia do sacrifício.

Soluções Fisiológicas

- **Solução de Tyrode (mM):** NaCl 140; KCl 6; MgCl₂ 1,5; HEPES 5; glicose 11,1 e CaCl₂ 1; pH 7,4 a 23 °C.
- **Solução de Krebs-Henseleit modificada para isolamento de células (KH-I, mM):** NaCl 131,4; KCl 4,6; KH₂PO₄ 1,2; NaHCO₃ 8,6; MgSO₄ 2,4; glicose 11,1; pH 7,2 a 37 °C, saturado com 95% O₂, 5% CO₂.
- **Solução de Tyrode para isolamento de células (Tyr-I, mM):** NaCl 140; KCl 4,5; MgCl₂ 2,4; HEPES 10; glicose 11,1; pH 7,2 a 37 °C.

Isolamento de Células

As células ventriculares foram isoladas por digestão enzimática conforme já descrito previamente (Bassani et al., 1992). De modo simplificado, o coração foi perfundido a 37 °C em sistema de Langendorff com solução KH-I por 5 min. Em seguida o coração foi perfundido com a mesma solução contendo 1 mg/ml de colagenase I (Worthington Biochem.) por 12-15 min. Procedeu-se, então, à perfusão com a solução sem a enzima por 2 min. Em seguida, os ventrículos foram cortados em pequenos pedaços que foram agitados em solução Tyr-I, para dissociação das células. A suspensão de células foi submetida a repetidas lavagens, com aumento gradual da concentração extracelular de cálcio para 1 mM.

Câmara de Perfusão

A Figura 1 ilustra a câmara de perfusão pressurizável, desenvolvida. Além das vias de entrada e saída, também podem ser observados rasgos para instalação de eletrodos de platina, usados para estimulação por campo elétrico. O fundo da câmara é formado por uma lamínula, através da qual as células são observadas com um microscópio invertido. A entrada e a saída de perfusão foram colocadas na parte superior da câmara para reduzir a turbulência próximo às células, o que dificultaria a adesão destas à lamínula do fundo.

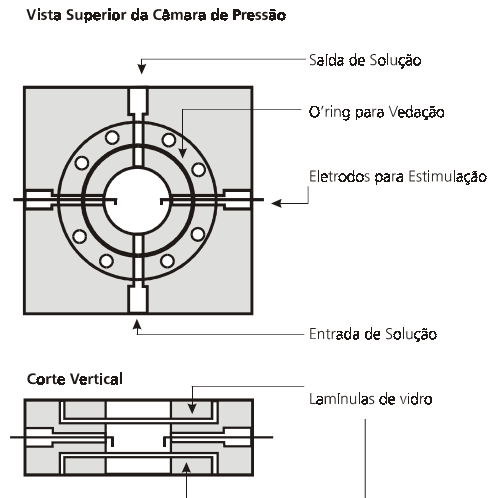


Figura 1. A Câmara de Perusão Pressurizável é composta por 3 peças: Um corpo de acrílico de seção reta quadrada, com orifícios para entrada e saída de solução, orifícios para entrada dos eletrodos de estimulação e rasgo para assento dos O'rings e duas flanges cilíndricas cuja função é prensar as lamínulas de vidro contra os O'rings de modo a fazer a vedação do sistema. **Figure 1.** Pressurized perfusion chamber is composed of a plexiglass body with solution inlet and outlet holes for stimulation electrode positioning and a groove for o'ring placement.

A pressurização foi obtida pelo bombeamento de um bulbo de borracha conectada a um recipiente vedado, contendo a solução a ser perfundida. A ligação deste recipiente à entrada da câmara foi feita com tubos de silicone. Um manômetro aneróide foi instalado entre a câmara e o recipiente para indicar o nível de pressão. Para garantir o nível de pressão em todo o sistema, o fluxo foi interrompido e a pressão registrada durante a interrupção. O fluxo de solução de Tyrode foi mantido em torno de 2 ml/min.

Sistema de Monitoramento de Encurtamento Celular

A Figura 2 ilustra o sistema para medição de encurtamento, usando a câmara pressurizada desenvolvida neste trabalho. As células foram semeadas na câmara, cujo fundo foi coberto com uma fina camada de colágeno para melhorar a adesão celular. A câmara foi montada no estágio de um microscópio invertido (vide a objetiva na Figura 2), ao qual foi acoplada uma câmera de vídeo para captar a imagem das células iluminadas por um LED (Light Emitting Diode) vermelho. A imagem das células foi alimentada a um aparelho de vídeo-cassete, conectado a um detector de bordas de sinal de vídeo (DBSV,

construído no CEB-UNICAMP). A imagem, gravada em vídeo para documentação do experimento, também podia ser observada em monitor de vídeo. As bordas de uma célula selecionada foram marcadas ajustando-se os controles do DBSV e, a partir desta condição, o equipamento podia acompanhar (*track*) o movimento das bordas das células. Um sinal pro-

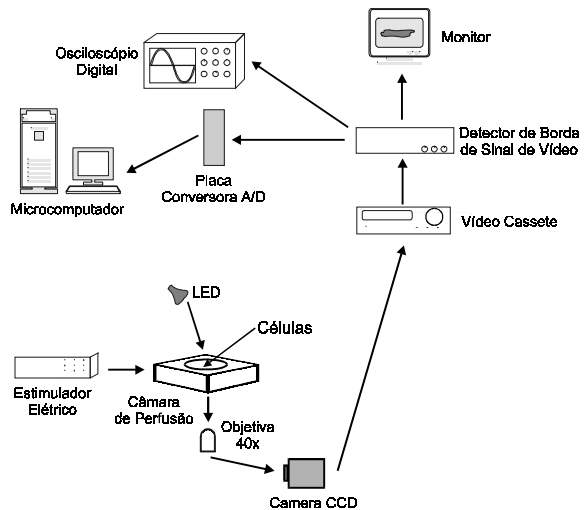


Figura 2. Conjunto experimental usado para medição do encurtamento em células cardíacas isoladas de rato. A câmara de perfusão desenvolvida para trabalhar pressurizada contém as células que se depositam no fundo formado por uma lamínula de vidro. As células são estimuladas por um estimulador elétrico de tensão conectado a eletrodos embutidos na câmara de perfusão. A iluminação é feita por um LED de alta luminância. A imagem da célula captada pela câmera de vídeo, através da objetiva, é alimentada a um monitor de vídeo e a um aparelho de vídeo cassete para posterior utilização. Simultaneamente, o detector de bordas de sinal de vídeo fornece uma saída em tensão proporcional ao encurtamento da célula em estudo, sinal este que é imediatamente monitorado e medido por meio de um osciloscópio digital e ao mesmo tempo é alimentado ao computador para posterior análise de dados. **Figure 2.** Experimental setup for measuring shortening in rat isolated cardiac myocytes. Cells are plated in the glass coverslip forming the bottom of the pressurized chamber. Myocytes are stimulated by an electrical stimulator. Illumination is provided by a red LED. Cell image is collected by a CCD camera connected to a VCR for off-line signal processing. The output of the video-edge detector is a voltage signal (monitored on the oscilloscope) which amplitude is proportional to the cell length.

porcional ao encurtamento do miócito (apenas na borda direita) foi alimentado a partir do DBSV a um computador, onde foi convertido de analógico para digital e registrado para posterior processamento. Os eletrodos embutidos na câmara foram conectados a um estimulador elétrico (construído no CEB – UNICAMP), com o qual a estimulação foi efetuada.

Protocolos experimentais

Antes do início da estimulação elétrica, o comprimento em repouso da célula a ser monitorada era obtido (RL). Após estabilização da preparação sob estimulação (pulsos bipolares de tensão, com amplitude de $1,2 \times$ limiar, duração 2 ms e frequência de 0,5 Hz) sob uma pressão mínima para estabelecimento de fluxo, a pressão era ajustada para 0 mmHg, o fluxo era interrompido e, após registro do encurtamento por 30 s, a pressão era elevada para um nível de teste. O procedimento era repetido para os vários níveis de pressão, ou seja, pressão nula (i.e., igual à atmosférica) era aplicada antes de cada mudança. A variação dos parâmetros medidos ao longo do experimento, sob pressão nula, foi corrigida linearmente, para eliminar o efeito do fator tempo. Para cada nível aplicado de pressão foram medidos: pico de encurtamento durante a contração evocada por estímulo elétrico, tempo de pico, duração total da contração e limiar estimulatório para indução da contração.

Análise Estatística

Os dados foram comparados em diferentes níveis de pressão por meio de análise de variância monofatorial. O limite de significância estatística foi considerado $P < 0,05$.

Resultados

A Figura 3 ilustra registros de encurtamento celular sob dois níveis de pressão hidrostática. Como pode ser observado, não houve alteração aparente de encurtamento máximo ou de qualquer parâmetro do curso temporal da contração na condição de 120 mmHg, comparada à condição controle a 0 mmHg.

A Figura 4 (painel inferior direito) ilustra o efeito da pressão sobre o limiar estimulatório. É interessante notar que, mesmo para níveis elevados de pressão, não se observou efeito estatisticamente significativo. O limiar estimulatório, obtido para estímulos aplicados na frequência de 0,5 Hz (duração de 5 ms), foi de aproximadamente 20 V sob todos os diferentes níveis de pressão estudados.

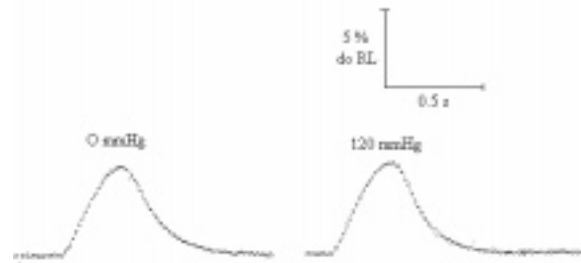


Figura 3. Encurtamento de miócitos cardíacos isolados de ratos adultos. A linha de base dos traçados representa o comprimento inicial dos miócitos. O encurtamento, medido neste caso em uma das bordas da célula, está apresentado como porcentagem do comprimento de repouso (RL). **Figura 3.** *Twitches in isolated rat cardiac myocytes. Cell shortening is expressed as percent of the cell resting length.*

Outros parâmetros analisados quantitativamente foram a amplitude máxima de encurtamento (expressa como porcentagem de RL), o tempo para encurtamento máximo (tempo de pico) e a duração total da contração (estes dois últimos expressos em ms). Estes parâmetros podem dar indicações sobre vários aspectos da atividade contrátil. Em valor absoluto, o encurtamento unilateral máximo desenvolvido pelas células sob 0 mmHg foi de $8,4 \pm 0,4$ mm (RL médio de 100 ± 5 μ m, $N = 4$). Nestas mesmas condições, os valores médios de tempo de pico e de duração total da contração foram 325 ± 7 s e 1057 ± 48 s, respectivamente. Curiosamente, nenhum destes parâmetros sofreu qualquer alteração significativa, como apresentado na Figura 4 (painéis superiores e inferior esquerdo).

Discussão

Neste estudo, não observamos efeito significativo da pressão hidrostática sobre o encurtamento celular de miócitos ventriculares isolados. No mínimo, este resultado é surpreendente, já que o regime de pressão ao qual o coração está submetido é muito diferente daquele em que os estudos da atividade contrátil de células cardíacas são realizados. A questão que se apresenta é: qual a razão? É sabido que a arquitetura celular de miócitos cardíacos é complexa. A organização geral e interconectividade do citoesqueleto podem ser modeladas por uma estrutura arquitetônica denominada de *tensegrity* (Ingber, 1997), indicando um comportamento geral não-linear com relação ao *stress* mecânico. Isto significa que pontos específicos do citoesqueleto sofrem tensão e podem ser usados como pontos de transdução mecano-bioquímica para regulação da

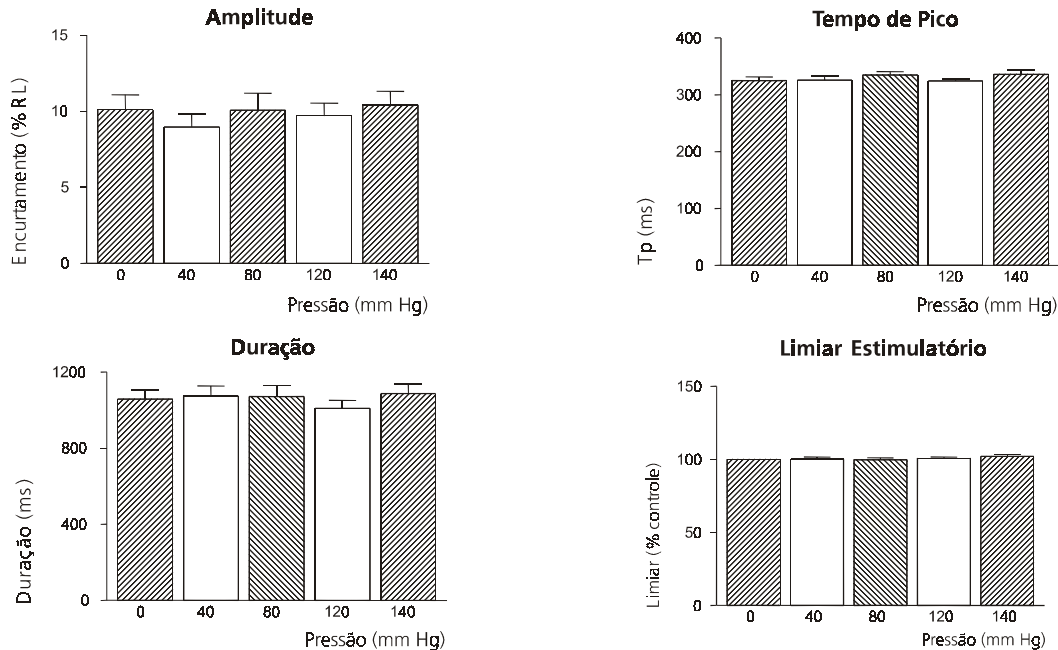


Figura 4. Efeito da pressão hidrostática sobre a atividade contrátil (encurtamento) de miócitos ventriculares de ratos adultos. Painéis superiores: amplitude e tempo de pico da contração. Painéis inferiores: duração total da contração e limiar estimulatório. Barras representam médias \pm EPM (N=4). **Figure 4.** Effect of hydrostatic pressure on isolated adult rat cardiac myocyte shortening. Upper pannels: peak amplitude and time to peak contraction. Lower pannels: total twitch duration and stimulatory threshold. Bars are means \pm SEM (n=4).

transcrição e síntese de proteínas, por exemplo, daquelas ligadas à hipertrofia gerada por sobrecarga do coração por aumento da pressão arterial (Opie, 1998). Se o aumento de pressão, como aquele imposto por nós às células, definitivamente não gera nenhuma tensão é ainda uma questão em aberto. Não se pode descartar a possibilidade de que a pressão da forma aplicada aos miócitos neste trabalho venha a produzir efeitos a médio/longo prazo por modificação da transcrição genética de proteínas envolvidas com a maquinaria contrátil e/ou transporte de Ca^{2+} , como já relatado em cultura de miócitos cardíacos submetidas a *stress* mecânico (Yamazaki et al., 1995).

A aplicação de pressão hidrostática, como um dispositivo desenvolvido, é supostamente uniforme. Todos os pontos da célula estariam sujeitos à mesma pressão. Neste caso, não deveria haver tensão sobre as paredes do miócito. Esta talvez seja a principal razão para explicar a ausência de qualquer alteração dos parâmetros da atividade contrátil. O aumento de tensão poderia gerar modificações de comprimento celular e isto poderia alterar a resposta celular. Tem sido descrito que o estiramento leva a aumento da carga de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (a principal fonte do Ca^{2+} ativador da contração em corações de

mamíferos) em miocárdio de coelho (Bluhm & Lew, 1995). Tem ainda sido observado que o estiramento parece provocar diretamente abertura de canais de Ca^{2+} do tipo L, presentes no sarcolema (Crozatier, 1996), que são responsáveis pela indução de liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (Bers, 1991). Tanto o aumento do conteúdo de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, quanto da corrente transmembrana de Ca^{2+} , resultam em amplificação do mecanismo de acoplamento excitação-contração, potencializando a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (Bassani et al., 1995). Deste modo, seria esperado que a indução de estiramento da membrana dos miócitos por aumento de pressão hidrostática causasse aumento substancial da amplitude das contrações. No entanto, isto não foi observado no presente trabalho, o que torna improvável que a aplicação de pressão supra-atmosférica tenha causado estiramento da célula.

Não observamos também modificação do limiar estimulatório, o que descarta a possibilidade de compressão da bicamada lipídica que forma a membrana celular. Neste caso, tendo em vista a espessura do dielétrico da membrana (100 Å) e o alto potencial através da membrana (~100 mV), gerando consequentemente um campo elétrico de altíssima

intensidade, pequenas modificações de espessura poderiam modificar fortemente o campo constante através da bicamada e, conseqüentemente, o limiar estimulatório.

Em células cromafins, Heinemann et al. (1987) não observaram alterações significativas da dinâmica ou chaveamento de canais iônicos (Na^+ ou Ca^{2+}) de membrana, mesmo em condições altamente hiperbáricas. Este dado poderia, em princípio, ser condizente com nossa observação de limiar estimulatório semelhante numa ampla faixa de pressão, embora as células estudadas pelos referidos pesquisadores venham de linhagem neural e não muscular, como no caso do presente trabalho.

É interessante notar que, nas condições estudadas, a célula muscular miocárdica tende a comportar-se como um recipiente preenchido uniformemente de líquido incompressível. A pressão gerada pelo coração, diferentemente, exerce efeito sobre as células por meio da geração de tensão nas suas paredes (na membrana) e esta tensão, gerando sobrecarga mecânica, por sua vez, parece ser o sinal para desencadeamento de respostas adaptativas, como acontece no caso da hipertrofia gerada por hipertensão (Yamazaki et al., 1995).

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer aos Srs. Rogério do Carmo Toledo e Vanderlei de Santis pelo apoio técnico em mecânica, ao Sr. Gilson Barbosa Maia Jr. e a Sra. Michelle Roveri pelo apoio técnico, ao Serviço de Apoio aos Estudantes (SAE) – UNICAMP pelo apoio financeiro na forma de bolsa ao aluno Wagner Vicentin (proc. n. 168/98), ao CNPq (proc. n. 301905/84-3) e à FAPESP (proc. n. 95/0355-3).

Referências

Bassani, R. A., Bassani, J. W. M., Bers, D. M. (1992), "Mitochondrial and sarcolemmal Ca transport reduce $[\text{Ca}]_i$ during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes", *J. Physiol (Lond.)*, v. 453, p. 591-608.

- Bassani, J.W.M., Yuan, W. Bers, D.M. (1995), "Fractional SR Ca release is regulated by trigger Ca and SR Ca content in cardiac myocytes", *Am. J. Physiol.*, v. 268, p. C1313-C1329.
- Bers, D.M. (1991), *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force.*, Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic.
- Bluhm, W.F., Lew, W. Y.W. (1995), "Sarcoplasmic reticulum in cardiac length-dependent activation in rabbits", *Am. J. Physiol.*, v. 269, p. H965-H972.
- Capogrossi, M.C., Kort, A.A., Spurgeon, H. A., Lakatta, E. G. (1986), "Single adult rabbit and rat cardiac myocytes retain the Ca^{2+} - and species-dependent systolic and diastolic contractile properties of intact muscle", *J. Gen. Physiol.*, v. 88, p. 589-613.
- Crozatier, B. (1996), "Stretch-induced modifications of myocardial performance: from ventricular function to cellular and molecular mechanisms", *Cardiovasc. Res.*, v. 32, p. 25-37.
- Farmer, B. B., Mancina M., Willians, E.S., Watanabe, A.M. (1983), "Isolation of calcium tolerant myocytes from adult rat hearts: review of the literature and description of a method". *Life Sci.*, v. 33, p. 1-18.
- Heinemann, S. H., Conti, F., Stühmer, W., Neher, E. (1987), "Effects of hydrostatic pressure on membrane processes". *J. Gen. Physiol.*, v. 90, p. 765-778.
- Ingber, D. E. (1997), "Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction". *Annu. Rev. Physiol.*, v. 59, p. 575-599.
- Opie, L.H. (1998). *The Heart: Physiology, from Cell to Circulation*, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
- Powell, T.; Terrar, D.A., Twist, V.W. (1980), "Electrical properties of individual cells isolated from rat ventricular myocardium". *J. Physiol. (Lond.)*, v. 302, p. 131-153.
- Silver, L.H.; Hemwall, E.L., Marino, T. A., Houser, S. R. (1983), "Isolation of calcium-tolerant feline ventricular myocytes". *Am. J. Physiol.*, v. 245, p. H891-H896.
- Yamazaki, T.; Komuro, I., Yazaki, Y. (1995), "Molecular mechanism of cardiac cellular hypertrophy by mechanical stress". *J. Mol. Cell. Cardiol.*, v. 27, p. 133-140.