

Insuficiencia cardíaca: la conexión electrofisiológica. Aturdimiento miocárdico e insuficiencia cardíaca: ¿mecanismos en común?

Eduardo Marbán

Profesor de Medicina y Fisiología. The Johns Hopkins University. Baltimore. EE.UU.

La recuperación tardía de la función después de períodos breves de isquemia se conoce como aturdimiento. El aturdimiento miocárdico y la insuficiencia cardíaca parecerían, a primera vista, tener muy poco en común aparte de la disfunción contráctil obvia que se produce en los dos casos. En este artículo se describen estudios que aportan luz sobre los mecanismos subyacentes de estas dos formas de disfunción contráctil, y que revelan similitudes fundamentales inesperadas.

Palabras clave: *Aturdimiento miocárdico. Insuficiencia cardíaca. Acoplamiento excitación-contracción. Proteólisis. Troponina.*

(*Rev Esp Cardiol* 2000; 53 [Supl 1]: 14-18)

Heart failure: the Electrophysiological Connection. Myocardial Stunning and Heart Failure: Mechanisms in Common?

The delayed recovery of function after brief episodes of ischemia is known as stunning. Myocardial stunning and heart failure would, at first glance, appear to have little in common other than the obvious contractile dysfunction in both settings. Here I describe studies which shed new light on the underlying mechanisms of these two forms of contractile dysfunction, revealing unexpected fundamental similarities.

Key words: *Myocardial stunning. Heart failure. Excitation-contraction coupling. Proteolysis. Troponin.*

(*Rev Esp Cardiol* 2000; 53 [Supl 1]: 14-18)

ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-CONTRACCIÓN EN EL MIOCARDIO ATURDIDO

El lugar de la lesión en el acoplamiento excitación-contracción ha sido recientemente motivo de investigación exhaustiva. La activación eléctrica es normal¹, de manera que las bases del miocardio aturdido tienen que depender de alguna de estas dos amplias categorías mecanísticas: primero, la disponibilidad del activador Ca^{2+} podría estar restringida. Este efecto puede estar mediado por una entrada anormal (o salida anormal) de Ca^{2+} al citosol debido a lesiones en una o varias vías encargadas del control de Ca^{2+} celular. Alternativamente, la capacidad de respuesta al Ca^{2+} de la maquinaria contráctil podría estar dañada de tal forma

que para un incremento dado de la concentración intracelular de Ca^{2+} (p. ej., el que se produce durante el aumento transitorio de Ca^{2+}) el miocardio genere menos fuerza; en este caso no es necesario que la disponibilidad del Ca^{2+} sea el factor limitante.

Durante los últimos doce años, los trabajos de investigación han implicado de forma abrumadora a los miofilamentos como el punto crítico de lesión en el aturdimiento, por lo menos en los modelos de corazón aislado y perfundido. El primer indicio de que la función de los miofilamentos era anormal procedió de Kusuoka et al², que encontraron una disminución de la presión máxima activada por el Ca^{2+} (el equivalente en el corazón entero de la fuerza máxima de activación por el Ca^{2+}) en los corazones aturdidos. Posteriormente Marban et al^{3,4} desarrollaron y validaron la metodología para medir la concentración intracelular de Ca^{2+} por espectroscopia de RMN en corazones aislados y perfundidos de hurón. Los aumentos transitorios de Ca^{2+} resultaron ser similares antes y después de la isquemia; si acaso, había una tendencia hacia un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} sistólico en los corazones aturdidos, a pesar de que se producía un 40% de descenso en la presión ventricular desarrolla-

Financiado por NIH (R01 HL44065).

Correspondencia: Dr. E. Marbán, MD, PhD.
Profesor de Medicina y Fisiología.
Michel Mirowski, MD. Profesor de Cardiología.
Director, Institute of Molecular Cardiobiology
The Johns Hopkins University. Baltimore, MD 21205. USA.
Correo electrónico: marban@jhmi.edu

da⁵. Carrozza et al⁶ confirmaron después, utilizando un método complementario de medición de Ca²⁺, el marcaje con aequorina en el intersticio del epicardio, que los aumentos transitorios de Ca²⁺ no están disminuidos en los corazones aturridos de hurón.

Gao et al⁷ examinaron el acoplamiento electromecánico en el miocardio aturrido de una manera más directa usando preparaciones experimentales carentes de la superposición de los efectos del turgor y el llenado vasculares. Las mediciones de la concentración intracelular de Ca²⁺ y de la fuerza en trabéculas ventriculares finas, procedentes de corazones de rata no isquémicos y corazones aturridos, confirmaron que los aumentos transitorios de Ca²⁺ no están disminuidos en el miocardio aturrido. Los estudios funcionales de los miofilamentos durante la activación estacionaria con Ca²⁺ revelaron tanto una disminución de la fuerza máxima como una desensibilización. En un modelo cuantitativo de interacción de los miofilamentos, los cambios simples en la tasa de unión y separación de los enlaces cruzados reprodujeron las características más destacadas de la disfunción contráctil del miocardio aturrido.

Sigue siendo controvertido si la disminución de la respuesta al Ca²⁺ de los miofilamentos es debida a una disminución de la fuerza máxima activada por el Ca²⁺, a una disminución de la sensibilidad al Ca²⁺ o a los dos fenómenos a la vez. Kusuoka et al^{2,5} demostraron que estos dos aspectos fundamentales de la función de los miofilamentos estaban deprimidos en los corazones postisquémicos; Gao et al⁷ confirmaron esta conclusión al tiempo que enfatizaron que, desde un punto de vista cuantitativo, la disminución de la fuerza máxima es el único y más importante factor. Carrozza et al⁶ concluyeron que sólo está disminuida la fuerza máxima activada por el Ca²⁺. Una de las limitaciones que se presenta en relación con la interpretación de sus datos fue la incertidumbre sobre el nivel máximo de activación, porque no estaba establecida de forma clara la saturación de la fuerza con respecto a la concentración intracelular de Ca²⁺.

Gran parte de la evidencia que apoya la hipótesis de una lesión en los miofilamentos procede del miocardio intacto, aunque también se han obtenido evidencias a favor de esta hipótesis en preparaciones en las que se ha eliminado la membrana celular. Hofmann et al⁸ midieron la sensibilidad de los miofilamentos al Ca²⁺ en un modelo porcino *in vivo* de aturdimiento con reperfusión de bajo flujo. Encontraron que la sensibilidad al Ca²⁺ está efectivamente disminuida en células cardíacas postisquémicas sin membrana celular, sin que haya cambios decisivos en la fuerza máxima (lo que posiblemente refleja la gran variabilidad en los valores absolutos de fuerza máxima, que oscilaron entre aproximadamente el 55% hasta el 150% del valor medio). Estos mismos investigadores demostraron posteriormente que la disminución de la sensibilidad al Ca²⁺

sólo ocurre durante la reperfusión⁹, lo que confirma un aspecto clave de la hipótesis reflujo/proteólisis que se menciona más adelante. Investigadores del mismo laboratorio¹⁰ encontraron también que algunas células «aturridas» no presentan alteraciones en la activación estacionaria con Ca²⁺ a pesar de tener cambios claros en la cinética de la formación cíclica de enlaces cruzados (como se pone de manifiesto por el claro enlentecimiento del desarrollo de fuerza después de liberaciones rápidas en condiciones de máxima activación por Ca²⁺). Estos cambios cinéticos pueden desacoplar la concentración intracelular de Ca²⁺ de la fuerza, como se demostró experimental y teóricamente con el fármaco inotrópico negativo butanodiona monoxima¹¹. Dietrich et al¹² no encontraron cambios en la respuesta estacionaria al Ca²⁺ de los miofilamentos al restablecerse el flujo después de períodos largos de isquemia total (40 min); no se examinó la cinética de la formación de enlaces cruzados. Aunque los autores se refirieron a este fenómeno como «miocardio aturrido», se considera en general que 40 min de isquemia total producen un daño irreversible más que un aturdimiento (véase más adelante). Más recientemente, VanEyck et al¹³ examinaron la relación que existía entre la duración de la isquemia y el restablecimiento del flujo sobre las propiedades de los miofilamentos en haces de fibras sin membrana obtenidas de corazones aislados de rata. Encontraron una marcada disminución de la fuerza máxima (alrededor de un 45%) cuando una isquemia igual o superior a 15 min era seguida por el restablecimiento de flujo, pero esto no se producía cuando había 15 min de isquemia sola. Es interesante señalar que la lesión funcional de los miofilamentos en ese estudio fue atribuible por completo a la reducción de la fuerza máxima; de hecho, la sensibilidad fue ligeramente superior (es decir, desviada hacia una concentración menor de Ca²⁺ intracelular) tanto en los grupos de isquemia e isquemia/reperfusión como en los controles no isquémicos.

PAPEL DE LAS ALTERACIONES EN LAS PROTEÍNAS CONTRÁCTILES

El mecanismo que subyace a la disminución en la respuesta al Ca²⁺ parece estar relacionado con una modificación estructural de una o varias proteínas miofibrilares (o proteínas asociadas a miofibrillas). Los resultados obtenidos en miocardio al que se ha solubilizado la membrana de sus células, aunque no son muy homogéneos, sugieren que el aturdimiento refleja alteraciones en los propios miofilamentos¹⁴. Además de las modificaciones estructurales de los miofilamentos, otros mecanismos pueden tener influencia sobre la sensibilidad al Ca²⁺ del miocardio aturrido *in vivo*. Por ejemplo, existen numerosas evidencias, que se resumen más adelante, que implican a los radicales libres del oxígeno en la patogenia del aturdimiento miocárdi-

co. Los radicales libres del oxígeno, además de tener efectos sobre la homeostasis del Ca^{2+} , promueven la formación de peróxido de hidrógeno que, a su vez, es metabolizado por el sistema catalasa/peroxidasa, lo que resulta en una disminución en el contenido de glutatión reducido y en un aumento de glutatión oxidado¹⁵. Se ha descrito que el glutatión oxidado es capaz de disminuir la sensibilidad al Ca^{2+} del músculo cardíaco sin membranas celulares, mientras que el glutatión reducido tiene el efecto contrario¹⁶; así pues, los cambios en el estado redox del glutatión citosólico pueden contribuir a la desensibilización de los miofilamentos aturridos. Sin embargo, un examen minucioso del mismo tejido muscular antes y después de la solubilización química de la membrana permitió a Gao et al¹⁴ demostrar que los cambios cardinales que habían observado en el miocardio aturrido intacto (una acusada disminución de la fuerza máxima y una disminución modesta de la sensibilidad de los miofilamentos) persistían después del proceso de eliminación de la membrana celular. Esta observación demuestra la relevancia de las alteraciones dentro de la matriz proteica de la célula, frente al papel que desempeñan los factores solubles (como el Mg^{2+} o el glutatión¹⁷), que estarían equilibrados después de eliminar la membrana.

El hallazgo de que la función de los miofilamentos está deprimida y que esta disminución de su función persiste después del proceso de eliminación de la membrana celular ha motivado el análisis estructural de varias proteínas clave dentro del aparato contráctil. Matsumura et al¹⁸ observaron mediante inmunohistoquímica una degradación parcheada de la alfaactinina, una proteína de anclaje asociada a los miofilamentos, en el miocardio aturrido. Gao et al¹⁹ utilizaron la técnica de inmunoblotting para analizar varias proteínas clave involucradas en el proceso cíclico de formación de enlaces cruzados. Entre ellas, la troponina I (TnI), que es una proteína reguladora de filamento fino, fue la única que presentaba una degradación parcial en el miocardio aturrido (pero no en las muestras de miocardio isquémico no reperfundido). La degradación de la TnI podía ser prevenida mediante modificaciones del medio de reperfusión diseñadas para mitigar la sobrecarga de Ca^{2+} y mejorar la recuperación funcional. VanEyck et al¹³ confirmaron las observaciones sobre la degradación de la TnI y de la alfaactinina, e identificaron otro grupo de alteraciones que se producían durante la isquemia prolongada y/o el restablecimiento de flujo²⁰⁻²². La observación de que la TnI se degrada en parte en el miocardio aturrido es especialmente intrigante si se tiene en cuenta el papel crucial que desempeña esta proteína como intermediaria entre la activación del calcio y la formación cíclica de enlaces cruzados.

Es posible, aunque no está todavía probado, que la lesión que se produce en la TnI sea suficiente para explicar la disminución de la función de los miofilamen-

tos que subyace al aturdimiento. Por este motivo, en nuestro grupo hemos creado ratones transgénicos que expresan en el corazón el fragmento predominante asociado a la degradación que se produce durante el aturdimiento, el TnI₁₋₁₉₃²³. Estos ratones desarrollan el fenotipo completo del aturdimiento: sus corazones están ligeramente dilatados y presentan una alteración de la contractilidad. Las mediciones de la concentración intracelular de Ca^{2+} y de la fuerza contráctil en el músculo ventricular intacto de estos ratones reprodujeron los principales hallazgos del corazón aturrido: unos transitorios de Ca^{2+} no disminuidos, acompañados sin embargo por una acusada depresión de la fuerza máxima. Estas nuevas observaciones apoyan la idea de que la proteólisis de la TnI causa aturdimiento, en vez de ser considerada sólo como un marcador del miocardio postisquémico.

Esta hipótesis presenta varios corolarios atractivos: el aturdimiento miocárdico es benigno desde el punto de vista histológico; la proteólisis, si fuera parcial y de alguna manera selectiva, tendría que romper el sarcómero de forma no visible para alterar la función. Varias proteínas de filamento fino son notablemente susceptibles a la degradación proteolítica^{20,22,24}; aunque las consecuencias funcionales de este proceso no han hecho más que empezar a ser elucidadas, la exposición directa de los miofilamentos a la calpaína reproduce las anormalidades funcionales observadas en el aturdimiento¹⁴. La idea de la proteólisis de los miofilamentos es también plenamente consistente con las observaciones de que el miocardio aturrido responde de forma normal a la estimulación inotrópica, ya que los mecanismos proximales que controlan la concentración intracelular de Ca^{2+} están supuestamente intactos²⁵. La disminución de la respuesta de los miofilamentos al Ca^{2+} justifica la gran eficacia que presentan los sensibilizadores al calcio en el tratamiento del miocardio aturrido²⁶. Quizá el hecho más interesante del aturdimiento es su eventual reversibilidad, con un patrón característico de recuperación a lo largo del tiempo de un día o más. La hipótesis proteolítica es la única que propone una justificación específica y comprobable de la lenta reversibilidad: las proteínas contráctiles parcialmente degradadas tendrían que ser reemplazadas por otras de nueva síntesis para poder reparar los miofilamentos, y el tiempo empleado para la degradación y síntesis de nuevas proteínas se aproxima bastante al observado^{27,28}.

PARALELISMOS CON LA INSUFICIENCIA CARDÍACA

La insuficiencia cardíaca congestiva crónica es una alteración común, y a menudo letal, de la contractilidad cardíaca. Sigue sin conocerse claramente la fisiología del fallo contráctil, aunque se ha atribuido a una alteración en el comportamiento cíclico del Ca^{2+} , a

pesar de que hay evidencias crecientes de una función disminuida de los miofilamentos. En un estudio reciente, medimos la concentración intracelular de Ca^{2+} y la fuerza contráctil en músculo ventricular intacto de ratas SHHF que presentaban insuficiencia cardíaca espontánea y en controles que tenían una edad equivalente²⁹. A las concentraciones fisiológicas de Ca^{2+} extracelular, los aumentos transitorios de Ca^{2+} fueron iguales en amplitud en los dos grupos, pero el pico de Ca^{2+} intracelular se alcanzaba más tarde en el músculo de las ratas SHHF. La fuerza de contracción alcanzaba su pico de manera lenta y era equivalente o ligeramente menor en amplitud con respecto a los controles. El análisis bidimensional de las relaciones instantáneas entre el Ca^{2+} y la fuerza reveló una disminución mucho mayor (53%) de la fuerza máxima activada por el Ca^{2+} en el miocardio de ratas SHHF, que habría producido una supresión equivalente de la fuerza de contracción si los otros factores hubieran sido iguales. El análisis de fase reveló que el enlentecimiento de los cambios cíclicos del Ca^{2+} prolongó el tiempo del que dispone el Ca^{2+} para activar los miofilamentos en el músculo con insuficiencia, lo que compensa parcialmente la acusada disfunción de la maquinaria contráctil. Nuestros resultados indican que la activación de los miofilamentos está severamente dañada en el corazón con insuficiencia, pero los cambios concomitantes que se producen en la cinética del Ca^{2+} intracelular minimizan la depresión contráctil²⁹. Estos resultados desafían los conceptos prevalentes sobre la patofisiología de la insuficiencia cardíaca: los miofilamentos aparecen como factores centrales, mientras que los cambios en el comportamiento cíclico del Ca^{2+} son reinterpretados como factores compensatorios más que causales.

RELACIÓN ENTRE EL ATURDIMIENTO Y LA INSUFICIENCIA CARDÍACA

Los cambios en la capacidad de respuesta de los miofilamentos al Ca^{2+} revelados en este estudio recuerdan a aquellos descritos previamente para el miocardio aturdido^{7,25}. Esta forma reversible de insuficiencia contráctil ocurre de forma aguda, sin cambios compensatorios en el comportamiento cíclico del Ca^{2+} . Así, la depresión profunda de la fuerza máxima (típicamente de un 50-60%, comparable a la que se observa en las ratas SHHF) es correspondida con una depresión equivalente de las contracciones cíclicas. En la insuficiencia cardíaca crónica, los aumentos transitorios de Ca^{2+} se vuelven más lentos y de alguna manera amortiguados en su amplitud (especialmente a altas concentraciones de Ca^{2+} extracelular). El enlentecimiento de los aumentos transitorios de calcio tiende a mitigar la depresión funcional durante el acoplamiento fisiológico en la excitación-contracción. Estos cambios cinéticos permiten que el Ca^{2+} intracelular se aproxime al equilibrio con las proteínas contráctiles durante cada ciclo

cardíaco; por tanto, una amplitud menor en el aumento transitorio de Ca^{2+} es suficiente para alcanzar una activación fraccional de los miofilamentos equivalente (o mayor). Sin embargo, estos cambios adaptativos de la homeostasis del Ca^{2+} exigen el pago de un peaje, al empeorar la relajación y predisponer a la disfunción diastólica²⁶.

BIBLIOGRAFÍA

- Hanich RF, Levine JH, Prood C, Weiss JL, Gallans DJ, Spear JF et al. Electrophysiologic recovery in postischemic, stunned myocardium despite persistent systolic dysfunction. *Am Heart J* 1993; 25: 23-32.
- Kusuoka H, Porterfield JK, Weisman HF, Weisfeldt ML, Marban E. Pathophysiology and pathogenesis of stunned myocardium: depressed Ca^{2+} activation of contraction as a consequence of reperfusion-induced cellular calcium overload in ferret hearts. *J Clin Invest* 1987; 79: 950-961.
- Marban E, Kitakaze M, Kotetsune Y, Yue DT, Chacko VP, Pike M. Quantification of $(\text{Ca}^{2+})_i$ of perfused hearts: critical evaluation of the 5F-BAPTA and nuclear magnetic resonance method as applied to the study of ischemia and reperfusion. *Circ Res* 1990; 66: 1255-1267.
- Marban E, Kitakaze M, Chacko VP, Pike MM. Ca^{2+} transients in perfused ferret hearts revealed by gated 19F NMR spectroscopy. *Circ Res* 1988; 63: 673-678.
- Kusuoka H, Koretsune Y, Chacko VP, Weisfeldt ML, Marban E. Excitation-contraction coupling in postischemic myocardium: does failure of activator Ca^{2+} transients underlie «stunning»? *Circ Res* 1990; 66: 1268-1276.
- Carozza Jr JP, Bentivegna LA, Williams CP, Kuntz RE, Grossman W, Morgan JP. Decreased myofilament responsiveness in myocardial stunning follows transient calcium overload during ischemia and reperfusion. *Circ Res* 1992; 71: 1334-1340.
- Gao WD, Atar D, Backx PH, Marban E. Relationship between intracellular calcium and contractile force in stunned myocardium: direct evidence for decreased myofilament Ca^{2+} sensitivity and altered diastolic function in intact ventricular muscle. *Circ Res* 1995; 76: 1036-1048.
- Hofmann PA, Miller WP, Moss RL. Altered calcium sensitivity of isometric tension in myocyte-sized preparations of porcine postischemic stunned myocardium. *Circ Res* 1993; 72: 50-56.
- Miller WP, McDonald KS, Moss RL. Time course of decreased myofilament Ca^{2+} sensitivity in isolated skinned myocytes during ischemia and reperfusion. *Circulation* 1993; 88: 1188.
- McDonald KS, Mammen PPA, Moss RL, Miller WP. Decreased myofilament Ca^{2+} sensitivity alone may not account for the depressed contractile state of stunned myocardium. *Circulation* 1993; 88: 1130.
- Backx PH, Gao WD, Azan-Backx MD, Marban E. Mechanism of force inhibition by 2,3-butanedione monoxime in rat cardiac muscle: roles of $(\text{Ca}^{2+})_i$ and cross-bridge kinetics. *J Physiol* 1994; 476: 487-500.
- Dietrich DLL, van Leeuwen GR, Stienen GJM, Elzinga G. Stunning does not change the relation between calcium and force in skinned rat trabeculae. *J Mol Cell Cardiol* 1993; 25: 541-549.
- VanEyck JE, Powers F, Law W, Larue C, Hodges RS, Solaro RJ. Breakdown and release of myofilament proteins during ischemia and reperfusion in rat hearts. Identification of degradation products and effects on the $p\text{Ca}$ -force relation. *Circ Res* 1998; 82: 261-271.
- Gao WD, Liu Y, Marban E. Mechanism of decreased myofilament Ca^{2+} responsiveness in stunned rat ventricular myocardium:

- relative roles of soluble cytosolic factors versus structural alterations. *Circ Res* 1996; 78: 455-465.
- 15 Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Guarnieri C, Caldarera CM, Albertini A et al. The role of oxygen in myocardial ischemic and reperfusion damage: role of cellular defenses against oxygen toxicity. *J Mol Cell Cardiol* 1985; 17: 937-945.
 - 16 Bauer SF, Schwarz K, Ruegg JC. Glutathione alters calcium responsiveness of cardiac skinned fibers. *Basic Res Cardiol* 1989; 84: 591-596.
 - 17 Murphy E, Stenbergen C, Levy LA, Raju B, London RE. Cytosolic free magnesium levels in ischemic rat heart. *J Biol Chem* 1989; 264: 5622-5627.
 - 18 Matsumura Y, Saeki E, Inoue M, Hori M, Kamada T, Kusuoka H. Inhomogeneous disappearance of myofilament-related cytoskeletal proteins in stunned myocardium of guinea pig. *Circ Res* 1996; 79: 447-454.
 - 19 Gao WD, Atar D, Liu Y, Perez NG, Murphy AM, Marban E. Role of troponin I proteolysis in the pathogenesis of stunned myocardium. *Circ Res* 1997; 80: 393-399.
 - 20 Toyo-oka T, Ross J Jr. Ca-sensitivity change and troponin loss in cardiac natural actomyosin after coronary occlusion. *Am J Physiol* 1981; 240: H704-H708.
 - 21 Westfall MV, Solaro RJ. Alterations in myofibrillar function and protein profiles after complete global ischemia in rat hearts. *Circ Res* 1992; 70: 302-313.
 - 22 Barbato R, Menabo R, Dainese P, Carafoli E, Schiaffino S, DiLisa F. Binding of cytosolic proteins to myofibrils in ischemic rat hearts. *Circ Res* 1996; 78: 821-828.
 - 23 Murphy AM, Georgakopoulos J, Kogler H, Kass DA, VanEyck JE, Marban E. Transgenic expression of a truncated mutant of cardiac troponin I recapitulates myocardial stunning. *Circulation* 2000. En prensa.
 - 24 DiLisa F, de Tullio R, Salamino F, Barbato R, Melloni E, Siliprandi N et al. Specific degradation of troponin T and I by mu-calpain and its substrate phosphorylation. *Biochem J* 1995; 308: 57-61.
 - 25 Marban E, Gao WD. Stunned myocardium: a disease of the myofilaments? *Basic Res Cardiol* 1995; 90: 269-272.
 - 26 Soei LK, Sassen LMA, Fan DS, van Veen T, Krams R, Verdouw PD. Myofibrillar Ca²⁺ sensitization predominantly enhances function and mechanical efficiency of stunned myocardium. *Circ Res* 1994; 90: 959-969.
 - 27 McKee EE, Cheung JY, Rannels DE, Morgan HE. Measurement of the rate of protein synthesis and compartmentation of heart phenylalanine. *J Biol Chem* 1978; 253: 1030-1040.
 - 28 Martin AF. Turnover of cardiac troponin subunits: Kinetic evidence for a precursor pool of troponin-I. *J Biol Chem* 1981; 256: 964-968.
 - 29 Pérez NG, Hashimoto K, McCune S, Altschuld RA, Marban E. Origin of contractile dysfunction in heart failure: calcium cycling versus myofilaments. *Circulation* 1999; 99: 1077-1083.