

## Papel da Titina na Modulação da Função Cardíaca e suas Implicações Fisiopatológicas

*The Role of Titin in the Modulation of Cardiac Function and its Pathophysiological Implications*

Ricardo Castro-Ferreira, Ricardo Fontes-Carvalho, Inês Falcão-Pires, Adelino F. Leite-Moreira

Serviço de Fisiologia Faculdade de Medicina da Universidade do Porto - Portugal

### Resumo

A titina é uma proteína sarcomérica gigante que se estende desde a linha Z até a linha M. Em razão de sua localização, representa um importante sensor biomecânico com um papel fundamental na manutenção da integridade estrutural do sarcômero. A titina funciona como uma “mola bidirecional” que regula o comprimento sarcomérico e realiza ajustes adequados da tensão passiva sempre que o comprimento varia. Dessa forma, não só determina a rigidez ventricular e a função diastólica, como também influencia a função cardíaca sistólica, modulando o mecanismo de Frank-Starling.

O miocárdio expressa duas isoformas dessa macromolécula: a N2B, mais rígida, e a isoforma N2BA, mais complacente. As alterações na expressão relativa das duas isoformas da titina ou alterações do seu estado de fosforilação têm sido implicadas na fisiopatologia de várias doenças como a insuficiência cardíaca diastólica, a cardiomiopatia dilatada, a cardiomiopatia isquêmica e a estenose aórtica.

Neste artigo pretende-se descrever sumariamente a estrutura e localização da titina, a sua relação com diferentes cardiomiopatias, e compreender de que forma as alterações dessa macromolécula influenciam a fisiopatologia da insuficiência cardíaca diastólica, salientando o potencial terapêutico da manipulação dessa macromolécula.

### Introdução

A titina, descrita inicialmente como conectina, é uma proteína gigante com grande elasticidade e que pode ser encontrada apenas nos músculos cardíaco e esquelético. Estruturalmente, está localizada no interior dos sarcômeros, onde se liga e interage com outras importantes proteínas miofibrilares, nomeadamente com a actina e a miosina.

### Palavras-chave

Isoformas de proteínas, miosinas atriais, insuficiência cardíaca, cardiomiopatia dilatada.

**Correspondência:** Ricardo Luís Castro Silva Ferreira •

Serviço de Fisiologia, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Alameda Prof. Hernâni Monteiro - 4200-219 - Porto

E-mail: amoreira@med.up.pt

Artigo recebido em 16/09/09; revisado recebido em 05/11/09;

aceito em 26/01/10.

Na última década, tem sido demonstrado que a titina é uma proteína estruturalmente complexa que desempenha um papel importante no funcionamento do músculo estriado, particularmente do músculo cardíaco. Entre as suas diversas ações destaca-se seu papel na manutenção da estrutura e arquitetura do sarcômero permitindo o correto alinhamento dos miofilamentos de actina e miosina, bem como sua função “elástica”, que permite a regulação do comprimento e da distensibilidade do sarcômero, influenciando, desse modo, não só a função cardíaca diastólica, como também a função sistólica pela lei de Frank-Starling.

Com este artigo de revisão pretendemos rever a estrutura e as principais ações fisiológicas da titina, nomeadamente a sua importância na determinação da função cardíaca diastólica e sistólica e as implicações das alterações nessa macromolécula na fisiopatologia da insuficiência cardíaca (IC).

### Estrutura e localização da titina

A titina é a maior proteína encontrada nos mamíferos, variando entre 2.970 e 3.700 kD, dependendo da isoforma<sup>1</sup>. É codificada por um único gene, localizado no braço longo do cromossoma 2, na região 2q31, constituído por 363 exões. No coração, a titina possui duas isoformas, N2B e N2BA, que são geradas por *splicing* alternativo<sup>1</sup>.

A titina é constituída majoritariamente por dois tipos de domínios: uns semelhantes à fibronectina-3 (chamados domínios Fn3), e outros semelhantes à imunoglobulina (domínios Ig). Além desses domínios, a titina contém ainda um domínio cínase, localizado próximo do terminal carboxilo, e várias regiões de sequência única<sup>1-3</sup> (fig. 1 e 2).

A titina é uma proteína intrasarcomérica, com cerca de 1  $\mu$ m de comprimento, que se estende desde a linha Z até à linha M<sup>2</sup>. Desse modo, a titina abrange quatro zonas do sarcômero, pelo que tradicionalmente é dividida em quatro regiões distintas designadas respectivamente de região da linha M, da banda A, da banda I e da linha Z (fig. 1). A região da linha Z contém o terminal amina, enquanto na região da linha M está localizado o terminal carboxilo. Como veremos em seguida, na região da linha Z a titina interage com outras proteínas, estando ainda envolvida em mecanismos de sinalização intracelular, funcionando como um sensor biomecânico<sup>4</sup>. A região da banda A contém a maior parte da molécula de titina que, nesse local, é formada por repetições simples de domínios Ig e Fn3, e representa um componente integrante do filamento grosso (fig. 1). Dessa forma, essa região

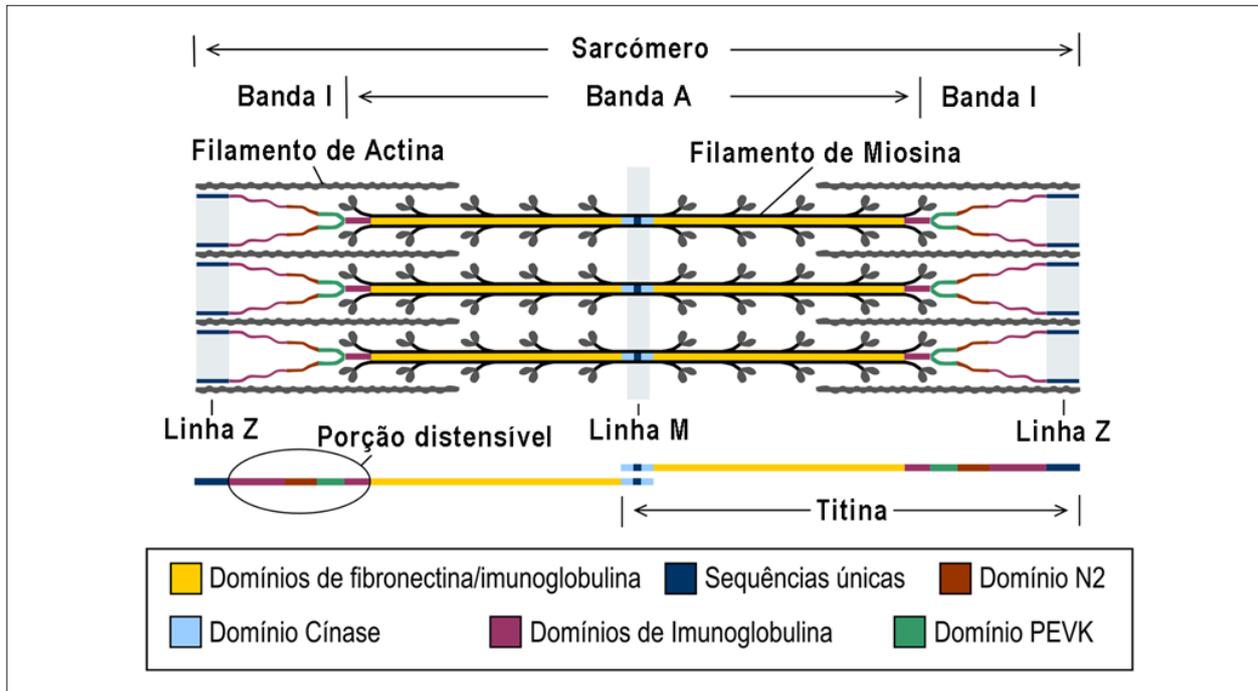


Fig. 1 - Estrutura da titina e sua posição no sarcômero. A titina atravessa o sarcômero desde a linha M até à linha Z onde interage com numerosas proteínas estruturais capazes de responder ao estiramento muscular. Nesta imagem podemos ver representada a porção extensível da titina sobreposta com a banda I.

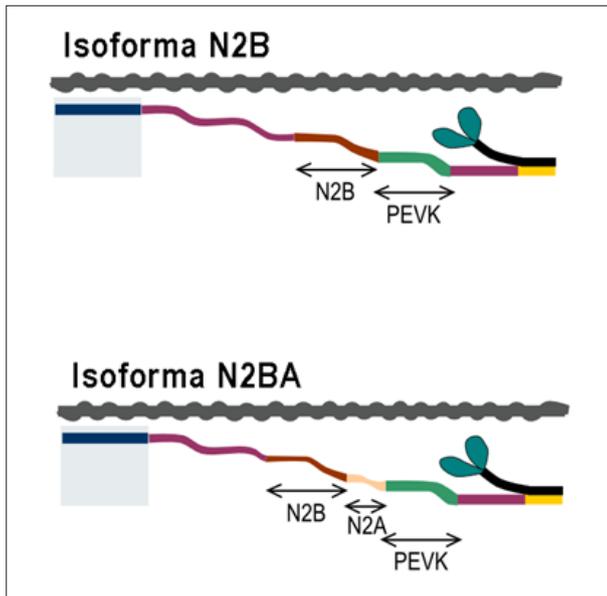


Fig. 2 - A isoforma N2BA possui mais um elemento elástico em série na região N2 (segmento N2A), o que lhe confere uma maior elasticidade. Dessa forma, para qualquer comprimento, a tensão passiva desenvolvida pela isoforma N2BA é menor que a desenvolvida pela N2B.

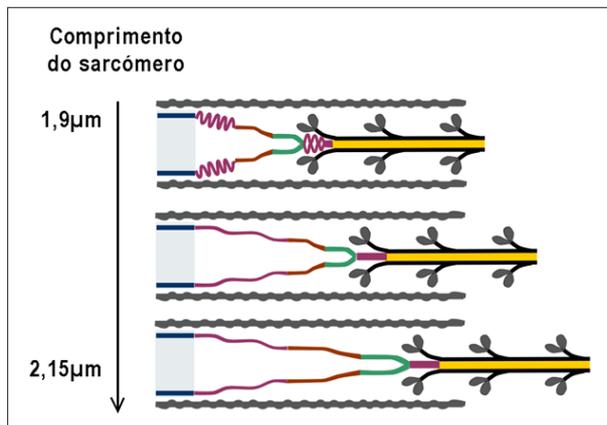
da titina não é extensível e a sua constituição é semelhante nas diferentes isoformas da molécula (N2B e N2BA)<sup>5</sup>. Pelo contrário, a região da banda I é muito extensível, dada a sua capacidade de se alongar ou enrolar, funcionando assim como uma ligação “elástica” entre o filamento grosso e a linha Z

(fig. 3). Estruturalmente, a porção da titina presente na banda I é muito mais complexa do que a região da banda A, sendo constituída por domínios Ig, pela região N2 e pelo segmento PEVK (rico nos aminoácidos prolina (P), glutamato (E), valina (V) e lisina (K))<sup>3,6</sup> (fig. 2). Além disso, é a região da banda I que diferencia as diferentes isoformas da titina<sup>6</sup>, uma vez que a sub-região N2 pode ter dois elementos distintos: N2A e/ou N2B (fig. 2). O elemento N2A é composto por uma região com quatro domínios Ig e uma região única de 106 resíduos e o elemento N2B é constituído por uma região com três domínios Ig e uma região única de 572 resíduos. As sequências N2A estão presentes quer no músculo cardíaco quer no esquelético, enquanto as sequências N2B são exclusivas do músculo cardíaco<sup>6</sup>.

### Propriedades elásticas da titina

A principal característica da titina é a sua elevada elasticidade, que lhe permite distender-se e encurtar-se regulando assim o comprimento do sarcômero e a função muscular. Para comprimentos sarcoméricos fisiológicos, a titina constitui o principal determinante da tensão passiva dos cardiomiócitos. E, para comprimentos supra-fisiológicos, o colagénio da matriz extracelular adquire maior relevo<sup>2</sup>.

Como foi referido anteriormente, as propriedades elásticas da titina devem-se sobretudo à região na banda I, já que, na banda A, a titina é praticamente inextensível<sup>7,8</sup>. A elasticidade da titina na região da banda I é conferida por uma estrutura molecular constituída por vários segmentos extensíveis, nomeadamente por um grande número de segmentos Ig, por um segmento PEVK e pela região N2 (fig. 1, 2 e 3). O comportamento desses diferentes segmentos



**Fig. 3** - No comprimento de repouso do sarcômero (1,9 µm) os elementos elásticos da titina encontram-se num estado contraído (A). Com o aumento do comprimento o domínio de imunoglobulina é o primeiro a esticar (por estiramento das ligações entre as Ig) (B). A partir do comprimento de 2,15 µm o segmento PEVK e N2 começam a desenrolar permitindo acomodar o aumento do comprimento sem um desenvolvimento excessivo de tensão passiva (C).

durante a distensão muscular e o desenvolvimento de tensão passiva é complexo, uma vez que os vários segmentos têm diferentes relações tensão passiva-comprimento e, além disso, cada um se distende em diferentes momentos conforme o comprimento do sarcômero.

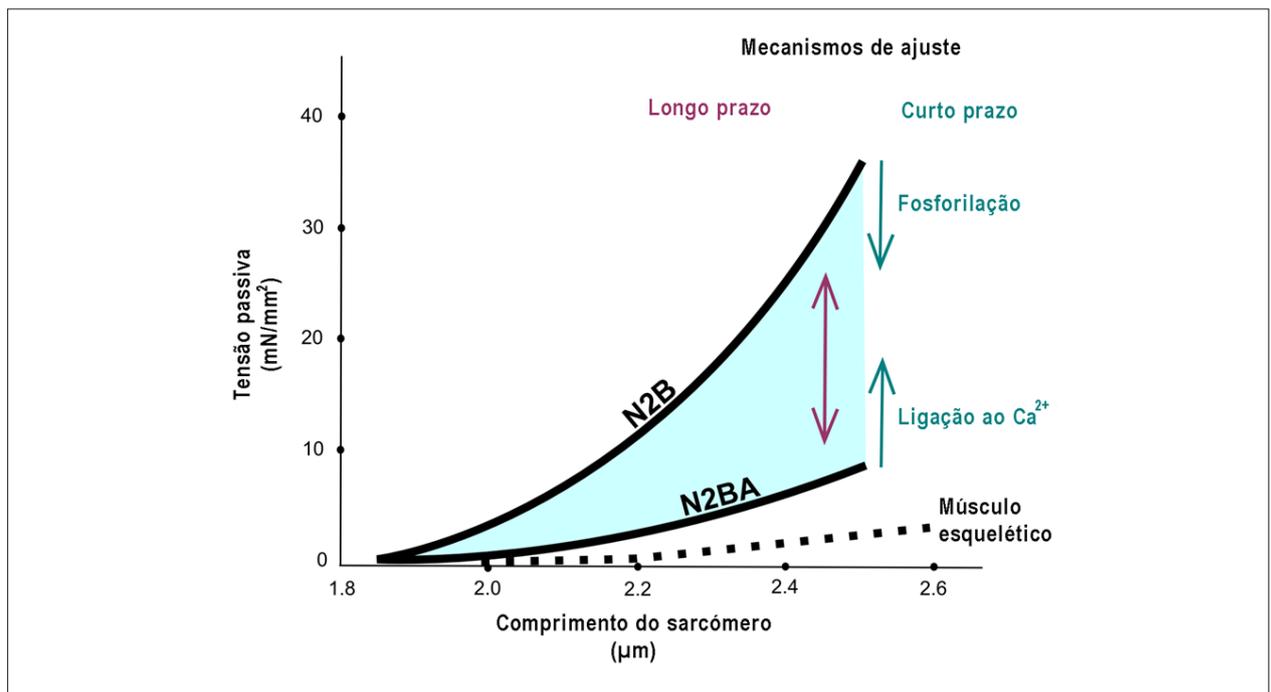
Na ausência de forças externas, os sarcômeros dos cardiomiócitos têm um tamanho de 1,9 µm, e nessas condições de repouso a titina está no seu estado contraído (fig. 3)<sup>2</sup>. Com

o estiramento progressivo do sarcômero, inicialmente ocorre o alongamento da sequência Ig, por meio do estiramento das ligações entre os diferentes domínios Ig. Só a partir dos 2,15 µm é que ocorre o alongamento dos segmentos PEVK, e posteriormente do segmento N2, em especial por intermédio do desenrolar dos seus domínios<sup>8</sup>. É esse comportamento complexo observado na região extensível da titina que faz com que a curva tensão passiva-comprimento do sarcômero não seja linear, ou seja, como se pode observar na figura 4, quanto maior o comprimento do sarcômero, maior é a inclinação da curva comprimento-tensão passiva<sup>1-3,7</sup>. Esse comportamento permite que, durante o alongamento do sarcômero que ocorre durante a diástole, não se desenvolva uma tensão passiva excessiva, o que iria prejudicar a função diastólica.

A titina é, não só o principal determinante da tensão passiva em resposta ao estiramento, como funciona também como uma mola elástica bidirecional. Isso porque, pelo contrário, quando o comprimento do sarcômero é encurtado para valores inferiores ao comprimento de repouso, a titina também gera uma força elástica que tem uma direção contrária à da tensão passiva tradicional. Essa força, designada “força de restauração”, permite o rápido restabelecimento do comprimento do sarcômero para os valores de repouso, empurrando o filamento grosso para longe da linha Z<sup>9</sup>.

### A titina no músculo cardíaco

No músculo cardíaco existem duas isoformas de titina: a isoforma N2B e a isoforma N2BA. A isoforma N2B é a mais pequena (2.970 kDa) uma vez que na sub-região N2 é



**Fig. 4** - Relação tensão passiva/comprimento do sarcômero em cardiomiócitos cardíacos que expressam maioritariamente a isoforma N2B ou a isoforma N2BA. A coexpressão das duas isoformas da titina em variadas razões permite atingir propriedades passivas intermédias (dupla seta vermelha) que, desta forma, pode funcionar como um mecanismo de ajuste da rigidez em longo prazo. Formas de alterar as propriedades das duas isoformas em curto prazo, tais como a fosforilação ou a interação com o cálcio, também estão demonstradas (setas azuis). (adaptado de Henk e cols., 2004).

constituída apenas pelo elemento N2B. Por sua vez, a isoforma N2BA tem maiores dimensões (3.200 a 3.400 kDa) e contém ambos os elementos: N2B e N2A. No ser humano, em cada metade do sarcômero estão presentes as isoformas N2BA e N2B, numa razão aproximada de 30/70<sup>10</sup>.

A isoforma N2BA possui mais um elemento extensível na região da banda I, pelo que essa isoforma é mais distensível e menos rígida que a N2B (fig. 2). Desse modo, os cardiomiócitos que expressam maiores quantidades da isoforma N2B possuem uma maior rigidez do que aqueles que expressam uma maior proporção relativa da isoforma N2BA<sup>1,3,11</sup>. Adicionalmente, a proporção relativa das diferentes isoformas determina também o recolhimento elástico após a contração ventricular. Os cardiomiócitos com um elevado grau de expressão da isoforma N2B, mais rígida, possuem também maior força de restauração, ou seja, após a contração o comprimento do sarcômero regressa mais rapidamente ao comprimento de repouso. Isso ocorre porque, como a isoforma N2B é menos extensível, não só exerce uma maior tensão passiva durante o estiramento, como também gera uma maior força para retomar o comprimento de repouso após a contração. Desse modo, nos ventrículos com elevadas proporções da isoforma N2B, há uma maior velocidade de recolhimento elástico, levando a um encurtamento da duração da fase inicial da diástole<sup>6</sup>.

### Funções da titina no músculo cardíaco

#### A titina como determinante da função cardíaca diastólica

Os principais determinantes da função cardíaca diastólica são o relaxamento do miocárdio e as propriedades passivas do ventrículo. Enquanto o relaxamento miocárdico é modulado pela carga, pela inativação (associada à cinética do cálcio e à dissociação dos miofilamentos) e pela não uniformidade da parede ventricular, as propriedades passivas miocárdicas são influenciadas pela rigidez miocárdica, pela espessura da parede do ventrículo esquerdo e pela geometria das câmaras cardíacas<sup>12</sup>.

A disfunção diastólica é causada por uma lentificação do relaxamento miocárdico e/ou por alterações das propriedades passivas do ventrículo, nomeadamente pelo aumento da rigidez ventricular<sup>12</sup>.

#### Influência da titina nas propriedades passivas do ventrículo

O aumento da rigidez ventricular pode ser causado por alterações das características intrínsecas dos próprios cardiomiócitos – como por modificações na constituição das proteínas do citosqueleto ou então das proteínas endossarcoméricas (como alterações na titina ou na alfa-actinina) – ou por alterações da constituição da matriz extracelular, nomeadamente pelo aumento da rede de colagênio e fibrose extracelular<sup>12</sup>.

A titina é um importante determinante da função diastólica, uma vez que influencia a rigidez do cardiomiócito e, dessa forma, as propriedades passivas do ventrículo. Como foi visto anteriormente, atendendo à sua localização estratégica no sarcômero, e às suas propriedades elásticas únicas, a titina é

o principal determinante da tensão passiva do cardiomiócito, para comprimentos fisiológicos do sarcômero<sup>7,13</sup>, sendo a contribuição relativa dos filamentos intermédios e dos microtúbulos inferior a 10%<sup>14</sup>. Para comprimentos superiores a 2,3 mm, dificilmente atingidos no coração intato, a tensão passiva passa a ser determinada essencialmente pelo colagênio e pela matriz extracelular<sup>7,11</sup>.

A importância da titina na determinação da função diastólica tem impacto no nível fisiopatológico, uma vez que, como veremos mais à frente, foi demonstrado que doentes com IC diastólica apresentam uma alteração na proporção relativa das isoformas da titina, com aumento da isoforma N2B (mais rígida) o que parece explicar o aumento da rigidez ventricular observado nesses doentes<sup>15</sup>.

#### Influência da titina no relaxamento ventricular

A titina não determina apenas a rigidez ventricular. Como foi referido anteriormente, a titina possui propriedades elásticas que funcionam de forma bidirecional, ou seja, se por um lado gera tensão passiva quando o músculo é estirado, por outro, quando há encurtamento do sarcômero, a titina gera uma “força de restauração”, que tem uma direção oposta à da tensão passiva e permite uma rápida recuperação do comprimento de repouso do sarcômero<sup>9</sup>.

Em termos hemodinâmicos, essa “força de restauração” gerada pela titina permite aumentar a velocidade de relaxamento ventricular e permite a formação de um fenómeno de “sucção ventricular”. Essa força permite aumentar o enchimento ventricular, sobretudo na fase inicial da diástole, o que pode ser particularmente importante nas situações de exercício físico ou outras situações de taquicardia<sup>16</sup>.

Além disso, ainda antes do início da diástole, a titina intervém também na determinação do fim da contração miocárdica, um processo que também é dependente do comprimento do sarcômero. Na verdade, quando há o encurtamento do sarcômero para valores inferiores ao comprimento de repouso a titina vai facilitar o processo de desativação das pontes cruzadas, influenciando e determinando o fim da contração muscular<sup>9,16</sup>.

#### A titina como um determinante da função cardíaca sistólica

A titina é um importante determinante da função cardíaca diastólica mas influencia também a função sistólica, pelo efeito que exerce na modulação da relação de Frank-Starling<sup>17</sup>.

Segundo a Lei de Frank-Starling, o aumento da pré-carga, ou seja, o aumento do volume telediastólico melhora a função sistólica originando um aumento do volume de ejeção. A titina, como determinante da rigidez ventricular e das propriedades passivas do ventrículo, influencia a relação pressão-volume telediastólica e, assim, o enchimento ventricular e o volume telediastólico<sup>18</sup>.

Em nível celular, o mecanismo de Frank-Starling é explicado pela ocorrência de um aumento da sensibilidade dos miofilamentos ao Ca<sup>2+</sup> em resposta ao aumento do comprimento do sarcômero<sup>19</sup>. A titina desempenha um papel fundamental na regulação desse mecanismo, uma vez que a tensão passiva exercida pela titina determina diretamente o

aumento da sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio<sup>17,20,21</sup>. Além disso, a titina, como elemento estrutural do filamento grosso na região da banda A, é também capaz de influenciar diretamente a ligação entre os miofilamentos de actina e miosina, conforme o comprimento do sarcômero. Ou seja, quando aumenta o comprimento do sarcômero a titina parece potencializar a ligação entre os filamentos de actina e de miosina, com o conseqüente aumento da força de contração<sup>22</sup>. Desse modo, a titina é capaz de “potenciar” o ciclo das pontes cruzadas quando o sarcômero é estirado, e que quando ele é encurtado para dimensões abaixo do seu comprimento de repouso, a titina é também capaz de inibir a formação das pontes cruzadas<sup>16</sup>.

#### A titina na sinalização intracelular: um sensor biomecânico

Além da sua função estrutural e elástica, a titina funciona também como um sensor biomecânico. Dada a sua capacidade de distender e encurtar, a titina é sensível ao grau de estiramento do cardiomiócito<sup>6,23</sup> sendo depois capaz de transmitir esse sinal biomecânico pela ligação e interação que estabelece com várias proteínas estruturais e sinalizadoras. Essa sinalização ocorre sobretudo em três regiões principais: na linha Z, na parte central da banda I e na linha M<sup>1,6,23</sup>.

Na região da linha Z a titina liga-se à proteína teletonina (T-cap), que funciona como um local de interligação entre a titina e várias outras moléculas estruturais e de ligação<sup>23,24</sup>. Entre essas moléculas encontram-se proteínas presentes nos túbulos T e no retículo sarcoplasmático (RS), nomeadamente a anquirina 1 (sANK 1), a obscurina (RS) e canais de potássio (minK/isk). Dessa forma, a titina intervém não só na manutenção da estrutura do sarcômero, como também da estrutura e correta organização dos túbulos T e do retículo sarcoplasmático<sup>23,24</sup>.

Na região da linha Z formam-se complexos de proteínas que funcionam como sinalizadores de tensão e que respondem tanto à força passiva, gerada pelos filamentos de titina durante o estiramento, como à força ativa, transmitida pelos filamentos de actina<sup>23,24</sup>. Nesse nível, existem várias proteínas que ao interagirem com a titina participam em seguida em cascatas de sinalização intracelular, promovendo a expressão de genes envolvidos na remodelagem cardíaca. Uma dessas proteínas é a MLP (*muscle LIM protein* – membro da família de proteínas LIM), tendo sido mesmo observado que mutações pontuais dessa proteína podem participar no desenvolvimento quer da cardiomiopatia hipertrófica, quer da cardiomiopatia dilatada<sup>24</sup>. Contudo, não está ainda estabelecido o mecanismo pelo qual a titina, interagindo com a MLP, é capaz de regular a transcrição genética. Aparentemente, quando, durante o estiramento, se geram tensões elevadas no nível da linha Z, ocorre a separação entre as ligações entre a titina e o MLP que, uma vez livre, migra para o núcleo, onde vai promover a transcrição de vários genes envolvidos na remodelagem cardíaca<sup>24</sup>.

No nível da região central da banda I, os elementos N2B e N2BA funcionam como os locais de ligação da titina a diversas proteínas sinalizadoras. A sequência única N2B, exclusiva do músculo cardíaco, liga-se, por intermédio de um membro da família de proteínas LIM (proteínas que contêm domínios LIM – arranjo de oito resíduos de cisteína e histidina na configuração

(C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>16/23</sub>-H-X<sub>2</sub>-C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>16/21</sub>-C-X<sub>2/3</sub>-C/D/H)) conhecido como DRAL/FHL 2, a diversas enzimas metabólicas. Em estados de maior necessidade energética a função do DRAL/FHL 2 como ponte de ligação entre a titina e enzimas como a creatinina cínase ou a cínase do adenilato adquire uma importância crescente aumentando o aporte de ATP<sup>24</sup>.

Os ligandos da titina na região da banda I, assim como as proteínas a eles associadas, também são encontrados no núcleo, onde funcionam como reguladores da transcrição e do ciclo celular, podendo também estar envolvidos nas alterações das propriedades passivas do cardiomiócito em longo prazo<sup>1</sup>. É o exemplo da interação com a obscurina, uma proteína com diversos domínios de sinalização. Esse complexo titina-obscurina responde ao estiramento do sarcômero, estando envolvido na reestruturação sarcométrica que ocorre por exemplo na adaptação muscular e na insuficiência cardíaca<sup>2</sup>.

A região da titina adjacente à linha M também possui locais potencialmente envolvidos na sensibilidade dos miofilamentos para o Ca<sup>2+</sup> e participa extensamente nos mecanismos de sinalização intracelular<sup>2,23</sup>.

#### Outras funções da titina

Para além das funções já referidas, começa a investigar-se o envolvimento da titina no processo de dobragem de proteínas, na regulação de expressão de genes e na regulação de vários canais iônicos<sup>23</sup>.

Além disso, a titina é ainda importante no processo de miofibrillogênese formando uma espécie de molde estrutural para a correta disposição e organização dos filamentos de actina e miosina<sup>25</sup>. A perda da titina origina uma organização anormal do sarcômero como foi demonstrado recentemente<sup>26</sup>.

#### Modulação das propriedades da titina

A titina funciona no sarcômero como um elemento dinâmico, cujas funções podem ser moduladas, quer em curto, quer em longo prazos, por diversos fatores, o que permite ao miocárdio modificar a sua elasticidade em razão das diversas alterações hemodinâmicas a que está sujeito<sup>11,27</sup>.

Como é demonstrado na figura 4, a rigidez do músculo cardíaco varia em razão de alterações na composição e no estado de fosforilação da titina. Tais alterações podem ocorrer em longo prazo, mediante uma modificação da proporção relativa entre as duas isoformas da titina, ou, em curto prazo, por alterações pós-translacionais, como a alteração do estado de fosforilação da titina ou da sua ligação ao íon cálcio<sup>11,27</sup>.

#### Mecanismos de regulação em curto prazo

##### Alteração do estado de fosforilação da Titina

O segmento N2B da titina cardíaca pode ser fosforilado pela proteína cínase A (PKA) originando uma diminuição da sua tensão passiva (fig. 4)<sup>28,29</sup>. Como seria de esperar, foi também observado que a redução da tensão passiva induzida pela fosforilação da titina pela PKA é mais pronunciada no músculo cardíaco com níveis mais elevados de expressão do segmento N2B<sup>30,31</sup>.

A ativação da PKA que ocorre, por exemplo, após a estimulação beta-adrenérgica constitui um dos principais mecanismos de regulação fisiológica em curto prazo da distensibilidade da titina. É sabido que a estimulação simpática, para além dos seus efeitos cronotrópico e inotrópico positivo, é também capaz de melhorar a função diastólica, aumentando não só a velocidade de relaxamento ventricular, mas também a complacência ventricular. Este último efeito depende, entre outros fatores, da fosforilação da isoforma N2B da titina pela PKA<sup>27,32,33</sup>.

Os efeitos da fosforilação da isoforma N2B pela PKA também se repercutem no nível na fase final da sístole, uma vez que a diminuição da rigidez do cardiomiócito vai conduzir também a uma diminuição da força de restauração dos cardiomiócitos<sup>31</sup>. Esse efeito, teoricamente pouco benéfico, pode ser contraposto pelo fato de a PKA acelerar a velocidade de relaxamento do miocárdio, por meio da fosforilação simultânea do fosfolamban e da troponina<sup>34</sup>. São necessários mais estudos para compreender o papel da fosforilação da titina na função cardíaca.

Muito recentemente foi também demonstrado que quer a proteína cínase G (PKG)<sup>35,36</sup>, quer a isoforma alfa da proteína cínase C (PKC)<sup>37</sup> promovem igualmente a fosforilação da titina. No caso da PKG a fosforilação dá-se no segmento PEVK da isoforma N2B, levando a uma diminuição da tensão passiva cardiomiocitária<sup>35</sup>. Já no caso da fosforilação pela PKC, essa ocorre no segmento PEVK tanto da isoforma N2B como da N2BA e o efeito global dessa fosforilação é o aumento da tensão passiva<sup>35-37</sup>.

Em resumo, a titina funciona como uma “mola ajustável” que, por meio da fosforilação/desfosforilação sobretudo do seu segmento N2B, permite a adaptação da função ventricular às necessidades do organismo.

### Regulação da titina pelo íon cálcio

O  $Ca^{2+}$  tem um papel importante como regulador da distensibilidade do cardiomiócito, sobretudo em razão da modulação da interação entre a titina e os filamentos finos. Estudos revelam que o domínio PEVK na região extensível da isoforma N2B se liga à F-actina e que essa interação poderá contribuir para a rigidez passiva dos cardiomiócitos<sup>38</sup>. Embora o  $Ca^{2+}$  isoladamente não interfira nessa ligação, quando esse íon se encontra ligado à proteína S100A1, existente em elevadas concentrações no miocárdio, essa interação é inibida, diminuindo a rigidez do cardiomiócito. A observação do aumento da rigidez do músculo cardíaco paralelamente ao declínio da concentração de  $Ca^{2+}$  durante a diástole suporta esse mecanismo<sup>1,2,23,39</sup>.

### Mecanismos de regulação da titina em longo prazo

Como foi anteriormente referido, os cardiomiócitos expressam as duas isoformas da titina, permitindo-lhes atingir um nível intermediário de tensão passiva (fig. 3), que pode ser modificada conforme a proporção relativa de expressão N2B/N2BA. Uma maior expressão da isoforma N2B está associada a um aumento da rigidez miocárdica, enquanto

o aumento da expressão N2BA se associa a um aumento da sua complacência. Contudo, permanecem por esclarecer os mecanismos moleculares subjacentes à expressão preferencial de uma das isoformas. Sabe-se que em resposta a diferentes estados hemodinâmicos podem ocorrer alterações em longo prazo na razão de expressão das duas isoformas da titina, o que, como veremos em seguida, ocorre por exemplo na insuficiência cardíaca<sup>15</sup> e na estenose aórtica<sup>40,41</sup>.

É importante referir que, por meio da alteração da proporção relativa das isoformas da titina, apenas são modificadas as propriedades elásticas da titina, não sendo alteradas as suas propriedades estruturais, uma vez que dessa forma só a porção da titina presente na banda I (ou seja, o componente distensível) é que sofre alterações<sup>11</sup>.

Em resumo, a função cardíaca pode ser alterada por alterações das propriedades elásticas da titina, que podem ocorrer tanto em curto como em longo prazos. Tal como podemos ver na figura 4, o aumento da expressão da isoforma N2B está associado a um aumento da rigidez da titina. Essa rigidez pode ser reduzida pela fosforilação da titina pela PKA ou PKG ou aumentada pela interação titina-actina, que é inibida pelo complexo  $Ca^{2+}$ /S100A1.

### Implicações fisiopatológicas

As alterações da titina estão envolvidas na fisiopatologia de algumas doenças cardíacas, nomeadamente na insuficiência cardíaca diastólica (ICD) e na cardiomiopatia dilatada (CMD). Há cada vez maior evidência de que as alterações na razão de expressão das duas isoformas da titina, bem como a alteração do seu estado de fosforilação estão na base do desenvolvimento e progressão dessas doenças.

#### Alterações na proporção relativa das isoformas da titina (N2BA/N2B)

Na disfunção diastólica ocorre uma lentificação do relaxamento do miocárdio e/ou um aumento da rigidez ventricular. Num ventrículo mais rígido, o aumento do volume de sangue durante a diástole só é conseguido à custa de um aumento das pressões de enchimento ventricular, com aumento da relação pressão-volume telediastólica, o que pode originar um quadro clínico de IC diastólica.

A titina, como principal determinante da tensão passiva do cardiomiócito, determina a rigidez ventricular. Como foi demonstrado recentemente, os cardiomiócitos extraídos de biopsias endomiocárdicas de doentes com ICD exibiam um aumento relativo da expressão da isoforma mais rígida da titina, N2B. Observou-se que, enquanto num coração humano saudável a razão N2BA/N2B normal é de cerca de 30/70<sup>10</sup>, nos doentes com ICD essa relação era de 17/83; e na IC sistólica a razão foi de 35/65<sup>15</sup>. Porém, esse mesmo grupo demonstrou recentemente que a hipofosforilação do segmento N2B da titina parece contribuir mais significativamente para o aumento da tensão passiva verificada nos casos de ICD<sup>41</sup>.

Em doentes com cardiomiopatia dilatada e remodelagem excêntrica foi observada uma alteração da relação entre as isoformas da titina, mas aqui com um aumento relativo da isoforma mais distensível, a N2BA<sup>10</sup>.

Numa fase inicial da insuficiência cardíaca sistólica, alterações das isoformas da titina podem funcionar como um mecanismo de adaptação, uma vez que o aumento da complacência ventricular permite um aumento do volume telediastólico, e conseqüentemente um aumento do débito cardíaco de acordo com o mecanismo de Frank-Starling<sup>32</sup>. Além disso, prevê-se que a menor força de restauração desenvolvida pelos cardiomiócitos durante a sístole (em razão do aumento da proporção da isoforma mais complacente) permitiria uma diminuição do volume telessistólico final para qualquer pós-carga. Essa diminuição ocorreria pelo decréscimo da resistência ao encurtamento do cardiomiócito, aumentando assim o volume de ejeção. De fato, está provado que indivíduos com maior proporção de N2BA têm melhor tolerância ao exercício em razão do aumento da pressão venosa de oxigênio<sup>10</sup>. Esse efeito teoricamente benéfico acaba por não ocorrer na prática, uma vez que, na IC sistólica, a relação de Frank-Starling está alterada em consequência da diminuição da sensibilidade dos miofilamentos para o  $Ca^{2+}$ , em razão, nomeadamente, do menor desenvolvimento de tensão passiva na presença de um aumento da isoforma N2BA<sup>10</sup>. Finalmente, no coração insuficiente pode ocorrer um aumento da degradação da titina, o que poderá igualmente contribuir para a atenuação do mecanismo de Frank-Starling<sup>42</sup>. Além disso, esse processo torna-se posteriormente desadaptativo, uma vez que o aumento do volume telediastólico do ventrículo origina mais estresse sobre as paredes ventriculares, estimulando e agravando o processo de remodelagem cardíaca<sup>13,32,43</sup>.

Também na cardiomiopatia isquêmica ocorre um aumento da razão N2BA/N2B, apesar de geralmente ocorrer um aumento da rigidez ventricular<sup>44</sup>. Essa observação, aparentemente paradoxal, pode ser explicada pelo fato de, nessa situação, o aumento da rigidez ventricular ser devido não a alterações a nível dos cardiomiócitos, mas a alterações na matriz extracelular com aumento da fibrose miocárdica. Aqui, o aumento da isoforma N2BA da titina (menos rígida) pode mesmo ser um mecanismo de compensação ao aumento da rigidez ventricular secundário ao processo de fibrose. Na verdade, na cardiomiopatia isquêmica ocorre mesmo uma diminuição da tensão passiva de cada cardiomiócito, provavelmente em razão do aumento da isoforma N2BA<sup>10</sup>.

#### Alterações no estado de fosforilação da titina

Como abordado anteriormente, a titina pode também sofrer modulação da sua rigidez mediante alterações pós-translacionais, nomeadamente pela fosforilação do segmento N2B<sup>29</sup>. A titina pode ser fosforilada pela proteína cinase A (PKA) e pela proteína cinase G (PKG), levando a uma diminuição da sua rigidez<sup>28,29,31,35</sup>, induzindo assim, e de forma aguda, alterações em curto prazo na rigidez ventricular.

Essas descobertas são particularmente relevantes, uma vez que podem inclusivamente ser alvo de intervenção terapêutica

nos doentes com insuficiência cardíaca. Na verdade, o tratamento com PKA de cardiomiócitos extraídos de doentes com IC diastólica permitiu uma redução da sua tensão passiva, para valores semelhantes aos dos indivíduos controle<sup>30</sup>. Essa diminuição da tensão passiva foi diretamente proporcional à rigidez inicial dos cardiomiócitos, o que é concordante com a ideia de que o aumento da rigidez cardíaca está diretamente relacionado não só com alterações da expressão relativa das isoformas, como também do estado de hipofosforilação da isoforma rígida da titina. Tal como seria de esperar pela menor rigidez dos cardiomiócitos provenientes de doentes com IC sistólica, o mesmo tratamento com PKA não causou uma queda tão significativa da tensão passiva<sup>13</sup>.

Tanto a estenose aórtica como a cardiomiopatia hipertensiva apresentam disfunção diastólica, mas apenas na última se verifica um aumento substancial da rigidez miocárdica. Em ambas os casos, a expressão relativa das isoformas N2BA/N2B, assim como o seu grau de total de fosforilação são semelhantes. Contudo, na cardiomiopatia hipertensiva observou-se uma hipofosforilação relativa da isoforma mais rígida, a N2B, tendo sido proposto como o mecanismo subjacente ao aumento da rigidez miocárdica e disfunção diastólica nessa doença<sup>40,45</sup>.

Também na cardiomiopatia dilatada parecem ocorrer alterações na fosforilação da titina. Nesses doentes foi observada uma diminuição da atividade da PKA cardíaca, que poderá ser um mecanismo compensador, em resposta à elevada complacência observada nos cardiomiócitos desses doentes<sup>13</sup>.

Em resumo, a titina, por meio da modificação da expressão das suas isoformas e/ou do seu estado de fosforilação, parece ser um elemento-chave na fisiopatologia de várias doenças cardíacas. Além disso, a titina pode ainda ser um potencial alvo de manipulação farmacológica constituindo assim um novo alvo terapêutico, sobretudo na insuficiência cardíaca.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem a preciosa ajuda de Pedro Daniel Miranda Couto na preparação das figuras.

#### Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

#### Fontes de Financiamento

O presente estudo foi parcialmente financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia.

#### Vinculação Acadêmica

Não há vinculação deste estudo a programas de pós-graduação.

## Referências

1. LeWinter MM, Wu Y, Labeit S, Granzier H. Cardiac titin: structure, functions and role in disease. *Clin Chim Acta*. 2007; 375 (1-2): 1-9.
2. Granzier HL, Labeit S. The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circ Res*. 2004; 94 (3): 284-95.
3. Tskhovrebova L, Trinick J. Properties of titin immunoglobulin and fibronectin-3 domains. *J Biol Chem*. 2004; 279 (45): 46351-4.
4. Tskhovrebova L, Trinick J. Titin: properties and family relationships. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003; 4 (9): 679-89.
5. Maruyama K. Connectin/titin, giant elastic protein of muscle. *Faseb J*. 1997; 11 (5): 341-5.
6. Granzier H, Labeit S. Cardiac titin: an adjustable multi-functional spring. *J Physiol*. 2002; 541 (Pt 2): 335-42.
7. Freiburg A, Trombitas K, Hell W, Cazorla O, Fougousse F, Centner T, et al. Series of exon-skipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity. *Circ Res*. 2000; 86 (11): 1114-21.
8. Linke WA, Rudy DE, Centner T, Gautel M, Witt C, Labeit S, et al. I-band titin in cardiac muscle is a three-element molecular spring and is critical for maintaining thin filament structure. *J Cell Biol*. 1999; 146 (3): 631-44.
9. Helmes M, Trombitas K, Granzier H. Titin develops restoring force in rat cardiac myocytes. *Circ Res*. 1996; 79 (3): 619-26.
10. Nagueh SF, Shah G, Wu Y, Torre-Amione G, King NM, Lahmers S, et al. Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2004; 110 (2): 155-62.
11. Cazorla O, Freiburg A, Helmes M, Centner T, McNabb M, Wu Y, et al. Differential expression of cardiac titin isoforms and modulation of cellular stiffness. *Circ Res*. 2000; 86 (1): 59-67.
12. Leite-Moreira AF. Current perspectives in diastolic dysfunction and diastolic heart failure. *Heart*. 2006; 92 (5): 712-8.
13. Wu Y, Labeit S, Lewinter MM, Granzier H. Titin: an endosarcomeric protein that modulates myocardial stiffness in DCM. *J Card Fail*. 2002; 8 (6 Suppl): S276-286.
14. Granzier HL, Irving TC. Passive tension in cardiac muscle: contribution of collagen, titin, microtubules, and intermediate filaments. *Biophys J*. 1995; 68 (3): 1027-44.
15. van Heerebeek L, Borbely A, Niessen HW, Bronzwaer JG, van der Velden J, Stienen GJ, et al. Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure. *Circulation*. 2006; 113 (16): 1966-73.
16. Helmes M, Lim CC, Liao R, Bharti A, Cui L, Sawyer DB. Titin determines the Frank-Starling relation in early diastole. *J Gen Physiol*. 2003; 121 (2): 97-110.
17. Fukuda N, Granzier HL. Titin/connectin-based modulation of the Frank-Starling mechanism of the heart. *J Muscle Res Motil*. 2005; 26 (6-8): 319-23.
18. Katz AM. Ernest Henry Starling, his predecessors, and the "Law of the Heart". *Circulation*. 2002; 106 (23): 2986-92.
19. Kentish JC, Keurs HE, Ricciardi L, Bucx JJ, Noble MI. Comparison between the sarcomere length-force relations of intact and skinned trabeculae from rat right ventricle. Influence of calcium concentrations on these relations. *Circ Res*. 1986; 58 (6): 755-68.
20. Cazorla O, Wu Y, Irving TC, Granzier H. Titin-based modulation of calcium sensitivity of active tension in mouse skinned cardiac myocytes. *Circ Res*. 2001; 88 (10): 1028-35.
21. Fukuda N, Wu Y, Farman G, Irving TC, Granzier H. Titin isoform variance and length dependence of activation in skinned bovine cardiac muscle. *J Physiol*. 2003; 553 (Pt 1): 147-54.
22. Fukuda N, Sasaki D, Ishiwata S, Kurihara S. Length dependence of tension generation in rat skinned cardiac muscle: role of titin in the Frank-Starling mechanism of the heart. *Circulation*. 2001; 104 (14): 1639-45.
23. Miller MK, Granzier H, Ehler E, Gregorio CC. The sensitive giant: the role of titin-based stretch sensing complexes in the heart. *Trends Cell Biol*. 2004; 14 (3): 119-26.
24. Linke WA. Sense and stretchability: the role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction. *Cardiovasc Res*. 2008; 77 (4): 637-48.
25. Gregorio CC, Granzier H, Sorimachi H, Labeit S. Muscle assembly: a titanic achievement? *Curr Opin Cell Biol*. 1999; 11 (1): 18-25.
26. Udaka J, Ohmori S, Terui T, Ohtsuki I, Ishiwata S, Kurihara S, et al. Disuse-induced preferential loss of the giant protein titin depresses muscle performance via abnormal sarcomeric organization. *J Gen Physiol*. 2008; 131 (1): 33-41.
27. Granzier HL, Labeit S. The giant muscle protein titin is an adjustable molecular spring. *Exerc Sport Sci Rev*. 2006; 34(2): 50-3.
28. Yamasaki R, Wu Y, McNabb M, Greaser M, Labeit S, Granzier H. Protein kinase A phosphorylates titin's cardiac-specific N2B domain and reduces passive tension in rat cardiac myocytes. *Circ Res*. 2002; 90 (11): 1181-8.
29. Kruger M, Linke WA. Protein kinase-A phosphorylates titin in human heart muscle and reduces myofibrillar passive tension. *J Muscle Res Cell Motil*. 2006; 27 (5-7): 435-44.
30. Borbely A, van der Velden J, Papp Z, Bronzwaer JG, Edes I, Stienen GJ, et al. Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. *Circulation*. 2005; 111 (6): 774-81.
31. Fukuda N, Wu Y, Nair P, Granzier HL. Phosphorylation of titin modulates passive stiffness of cardiac muscle in a titin isoform-dependent manner. *J Gen Physiol*. 2005; 125 (3): 257-71.
32. Lim CC, Sawyer DB. Modulation of cardiac function: titin springs into action. *J Gen Physiol*. 2005; 125 (3): 249-52.
33. Falcao-Pires I, Fontes-Sousa AP, Bras-Silva C, Leite-Moreira A. Beta-adrenergic stimulation acutely increases myocardial distensibility - A PKA, PKC and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger mediated effect (abstract). *J Am Coll Cardiol*. 2007; 49 (9 Suppl. A): 408A.
34. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002; 415 (6868): 198-205.
35. Kruger M, Kotter S, Grutzner A, Lang P, Andresen C, Redfield MM, et al. Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. *Circ Res*. 2009; 104 (1): 87-94.
36. Borbely A, Falcao-Pires I, van Heerebeek L, Hamdani N, Edes I, Gavina C, et al. Hypophosphorylation of the stiff N2B titin isoform raises cardiomyocyte resting tension in failing human myocardium. *Circ Res*. 2009; 104 (6): 780-6.
37. Hidalgo C, Hudson B, Bogomolovas J, Zhu Y, Anderson B, Greaser M, et al. PKC Phosphorylation of titin's PEVK element: a novel and conserved pathway for modulating myocardial stiffness. *Circ Res*. 2009; 105 (7): 631-8.
38. Yamasaki R, Berri M, Wu Y, Trombitas K, McNabb M, Kellermayer MS, et al. Titin-actin interaction in mouse myocardium: passive tension modulation and its regulation by calcium/S100A1. *Biophys J*. 2001; 81 (4): 2297-313.
39. Stuyvers BD, Miura M, Jin JP, ter Keurs HE. Ca<sup>2+</sup>-dependence of diastolic properties of cardiac sarcomeres: involvement of titin. *Prog Biophys Mol Biol*. 1998; 69 (2-3): 425-43.
40. Williams L, Howell N, Pagano D, Andreka P, Vertesaljai M, Pecor T, et al. Titin isoform expression in aortic stenosis. *Clin Sci (Lond)*. 2009; 117 (6): 237-42.
41. Borbely A, van Heerebeek L, Paulus WJ. Transcriptional and posttranslational modifications of titin: implications for diastole. *Circ Res*. 2009; 104 (1): 12-4.
42. Morano I, Hadicke K, Grom S, Koch A, Schwinger RH, Bohm M, et al. Titin, myosin light chains and C-protein in the developing and failing human heart. *J Mol Cell Cardiol*. 1994; 26 (3): 361-8.
43. Makarenko I, Opitz CA, Leake MC, Neagoe C, Kulke M, Gwathmey JK, et al. Passive stiffness changes caused by upregulation of compliant titin isoforms in human dilated cardiomyopathy hearts. *Circ Res*. 2004; 95 (7): 708-16.
44. Neagoe C, Kulke M, del Monte F, Gwathmey JK, de Tombe PP, Hajjar RJ, et al. Titin isoform switch in ischemic human heart disease. *Circulation*. 2002; 106 (11): 1333-41.
45. Warren CM, Jordan MC, Roos KP, Krzesinski PR, Greaser ML. Titin isoform expression in normal and hypertensive myocardium. *Cardiovasc Res*. 2003; 59 (1): 86-94.