

Papel de la Titina en la Modulación de la Función Cardíaca y sus Implicaciones Fisiopatológicas

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

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

Resumen

La titina es una proteína sarcomérica gigante que se extiende desde la línea Z hasta la línea M. En razón de su ubicación, representa un importante sensor biomecánico con un papel fundamental en la manutención de la integridad estructural del sarcómero. La titina funciona como un “resorte bidireccional” que regula el largo sarcomérico y realiza ajustes adecuados de la tensión pasiva siempre que ese largo varía. De esa forma, no sólo determina la rigidez ventricular y la función diastólica, sino también influye en la función cardíaca sistólica, modulando el mecanismo de Frank-Starling.

El miocardio expresa dos isoformas de esa macromolécula: la N2B, más rígida, y la isoforma N2BA, más complaciente. Las alteraciones en la expresión relativa de las dos isoformas de la titina o alteraciones de su estado de fosforilación han sido implicadas en la fisiopatología de varias enfermedades como la insuficiencia cardíaca diastólica, la cardiomiopatía dilatada, la cardiomiopatía isquémica y la estenosis aórtica.

Este artículo pretende describir sumariamente la estructura y ubicación de la titina, su relación con diferentes cardiomiopatías, y comprender de qué forma las alteraciones de esa macromolécula influyen en la fisiopatología de la insuficiencia cardíaca diastólica, destacando el potencial terapéutico de la manipulación de esa macromolécula.

Introducción

La titina, descrita inicialmente como conectina, es una proteína gigante con gran elasticidad y que puede ser encontrada sólo en los músculos cardíaco y esquelético. Estructuralmente, está localizada en el interior de los sarcómeros, donde se une e interactúa con otras importantes proteínas miofilamentares, principalmente con la actina y la miosina.

En la última década, ha sido demostrado que la titina es una proteína estructuralmente compleja que desempeña

un papel importante en el funcionamiento del músculo estriado, particularmente del músculo cardíaco. Entre sus diversas acciones se destaca su papel en la manutención de la estructura y arquitectura del sarcómero permitiendo el correcto alineamiento de los miofilamentos de actina y miosina, así como su función “elástica”, que permite la regulación del largo y de la distensibilidad del sarcómero, influyendo, de ese modo, no sólo en la función cardíaca diastólica, sino también en la función sistólica por la ley de Frank-Starling.

Con este artículo de revisión pretendemos rever la estructura y las principales acciones fisiológicas de la titina, especialmente su importancia en la determinación de la función cardíaca diastólica y sistólica y las implicaciones de las alteraciones en esa macromolécula en la fisiopatología de la insuficiencia cardíaca (IC).

Estructura y ubicación de la titina

La titina es la mayor proteína encontrada en los mamíferos, variando entre 2970 y 3700 kD, dependiendo de la isoforma¹. Es codificada por un único gen, ubicado en el brazo largo del cromosoma 2, en la región 2q31, constituido por 363 exones. En el corazón, la titina posee dos isoformas, N2B y N2BA, que son generadas por *splicing* alternativo¹.

La titina está constituida mayoritariamente por dos tipos de dominios: unos semejantes a la fibronectina-3 (llamados dominios Fn3), y otros semejantes a la inmunoglobulina (dominios Ig). Además de esos dominios, la titina contiene aun un dominio quinasa, ubicado próximo al terminal carboxilo, y varias regiones de secuencia única¹⁻³ (fig. 1 y 2).

La titina es una proteína intrasarcomérica, con cerca de 1 μm de largo, que se extiende desde la línea Z hasta a la línea M². De ese modo, la titina abarca cuatro zonas del sarcómero, por lo que tradicionalmente es dividida en cuatro regiones distintas designadas respectivamente de región de la línea M, de la banda A, de la banda I y de la línea Z (fig. 1). La región de la línea Z contiene el terminal amina, mientras que en la región de la línea M está ubicado el terminal carboxilo. Como veremos en seguida, en la región de la línea Z la titina interactúa con otras proteínas, estando aun envuelta en mecanismos de señalización intracelular, funcionando como un sensor biomecánico⁴. La región de la banda A contiene la mayor parte de la molécula de titina que, en ese lugar, está formada por repeticiones simples de dominios Ig y Fn3, y representa un componente integrante del filamento grueso (fig. 1). De esa forma, esa región de la titina no es extensible y su constitución es semejante en las diferentes isoformas de la molécula (N2B y N2BA)⁵. Por el contrario, la región de la banda I es muy extensible, dada su capacidad de alargarse o

Palabras clave

Isoformas de proteínas, miosinas atriales, insuficiencia cardíaca, cardiomiopatía dilatada.

Correspondencia: 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

Artículo recibido el 16/09/09; revisado recibido el 05/11/09; aceptado el 26/01/10.

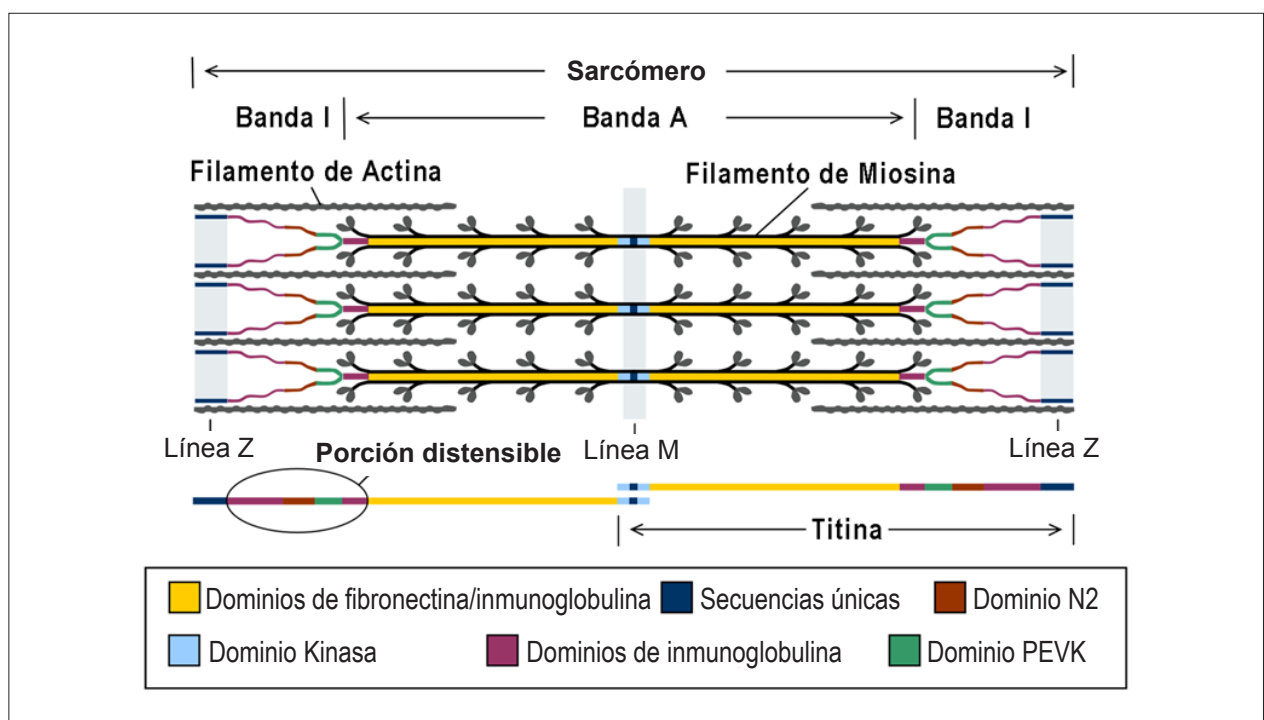


Fig. 1 - Estructura de la titina y su posición en el sarcómero. La titina atraviesa el sarcómero desde la línea M hasta la línea Z donde interactúa con numerosas proteínas estructurales capaces de responder al estiramiento muscular. En esta imagen podemos ver representada la porción extensible de la titina superpuesta a la banda I.

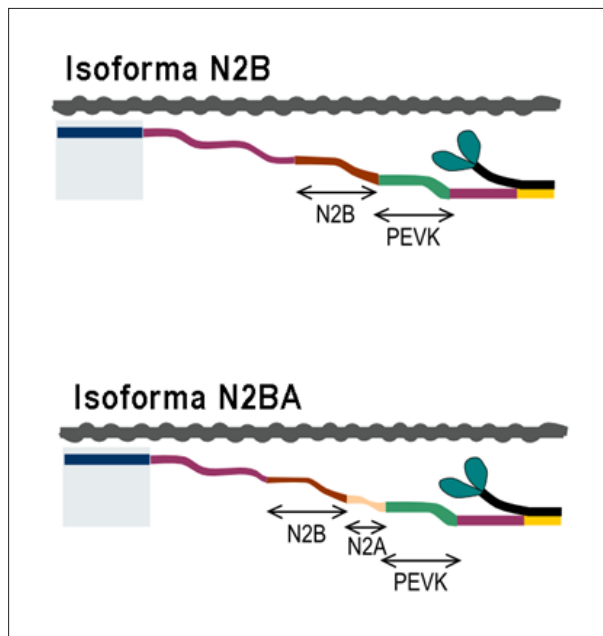


Fig. 2 - La isoforma N2BA posee un elemento elástico más en serie en la región N2 (segmento N2A), lo que le confiere una mayor elasticidad. De esa forma, para cualquier largo, la tensión pasiva desarrollada por la isoforma N2BA es menor que la desarrollada por la N2B.

enrollarse, funcionando así como una unión “elástica” entre el filamento grueso y la línea Z (fig. 3). Estructuralmente, la porción de la titina presente en la banda I es mucho más compleja que la región de la banda A, siendo constituida

por dominios Ig, por la región N2 y por el segmento PEVK (rico en los aminoácidos prolina (P), glutamato (E), valina (V) y lisina (K))^{3,6} (fig. 2). Además de eso, es la región de la banda I que diferencia las diferentes isoformas de la titina⁶, una vez que la subregión N2 puede tener dos elementos distintos: N2A y/o N2B (fig. 2). El elemento N2A está compuesto por una región con cuatro dominios Ig y una región única de 106 residuos y el elemento N2B está constituido por una región con tres dominios Ig y una región única de 572 residuos. Las secuencias N2A están presentes tanto en el músculo cardíaco como en el esquelético, mientras que las secuencias N2B son exclusivas del músculo cardíaco⁶.

Propiedades elásticas de la titina

La principal característica de la titina es su elevada elasticidad, que le permite distenderse y acortarse regulando así el largo del sarcómero y la función muscular. Para largos sarcoméricos fisiológicos, la titina constituye el principal determinante de la tensión pasiva de los cardiomiocitos. Y, para largos suprafisiológicos, el colágeno de la matriz extracelular adquiere mayor relieve².

Como fue referido anteriormente, las propiedades elásticas de la titina se deben sobre todo a la región en la banda I, ya que, en la banda A, la titina es prácticamente inextensible^{7,8}. La elasticidad de la titina en la región de la banda I es conferida por una estructura molecular constituida por varios segmentos extensibles, principalmente por un gran número de segmentos Ig, por un segmento PEVK y por la región N2 (fig. 1, 2 y 3). El comportamiento de esos diferentes segmentos durante la distensión muscular y el desarrollo de tensión pasiva es

Artículo de Revisión

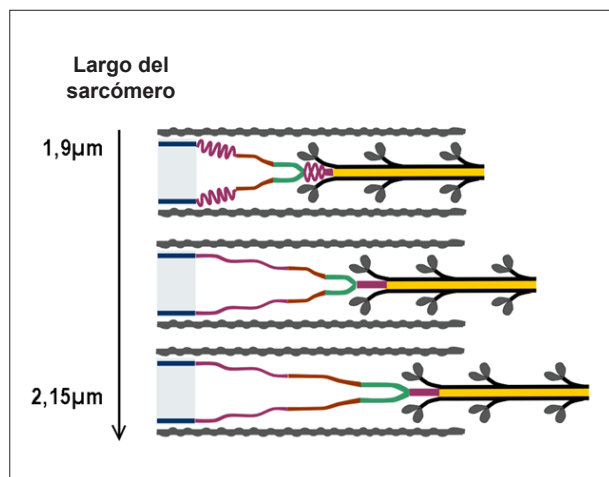


Fig. 3 - En el largo de reposo del sarcómero (1,9 µm) los elementos elásticos de la titina se encuentran en un estado contraído (A). Con el aumento del largo el dominio de inmunoglobulina es el primero que se estira (por estiramiento de las uniones entre las Ig) (B). A partir del largo de 2,15 µm el segmento PVEK y N2 comienzan a desenrollarse permitiendo acomodar el aumento del largo sin un desarrollo excesivo de tensión pasiva (C).

complejo, una vez que los varios segmentos tienen diferentes relaciones tensión pasiva-largo y, además de eso, cada uno se distiende en diferentes momentos según el largo del sarcómero.

En ausencia de fuerzas externas, los sarcómeros de los cardiomiocitos tienen un tamaño de 1,9 µm, y en esas condiciones de reposo la titina está en su estado contraído (fig.

3)². Con el estiramiento progresivo del sarcómero, inicialmente ocurre el alargamiento de la secuencia Ig, por medio del estiramiento de las uniones entre los diferentes dominios Ig. Sólo a partir de los 2,15 µm es que ocurre el alargamiento de los segmentos PVEK, y posteriormente del segmento N2, en especial por intermedio del desenrollamiento de sus dominios⁸. Es ese comportamiento complejo observado en la región extensible de la titina que hace que la curva tensión pasiva-largo del sarcómero no sea lineal, o sea, como se puede observar en la figura 4, cuanto mayor es el largo del sarcómero, mayor es la inclinación de la curva largo-tensión pasiva^{1,3,7}. Ese comportamiento permite que, durante el alargamiento del sarcómero que ocurre durante la diástole, no se desarrolle una tensión pasiva excesiva, lo que perjudicaría la función diastólica.

La titina es, no sólo el principal determinante de la tensión pasiva en respuesta al estiramiento, sino que funciona también como un resorte elástico bidireccional. Esto es así, porque, por el contrario, cuando el largo del sarcómero es acortado a valores inferiores al largo de reposo, la titina también genera una fuerza elástica que tiene una dirección contraria a la de la tensión pasiva tradicional. Esa fuerza, designada “fuerza de restauración”, permite el rápido restablecimiento del largo del sarcómero a los valores de reposo, empujando al filamento grueso lejos de la línea Z⁹.

La titina en el músculo cardíaco

En el músculo cardíaco existen dos isoformas de titina: la isoforma N2B y la isoforma N2BA. La isoforma N2B es la

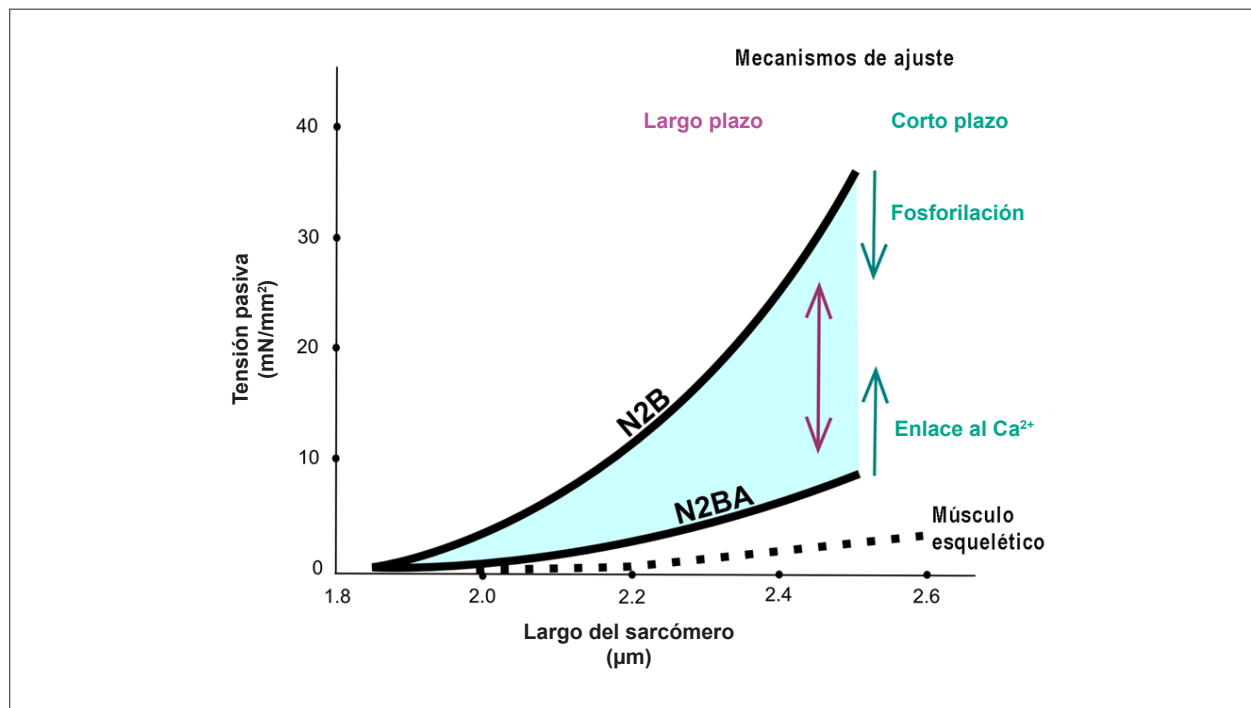


Fig. 4 - Relación tensión pasiva/largo del sarcómero en cardiomiocitos cardíacos que expresan mayoritariamente la isoforma N2B o la isoforma N2BA. La coexpresión de las dos isoformas de la titina en variadas razones permite alcanzar propiedades pasivas intermedias (doble flecha roja) que, de esta forma, puede funcionar como un mecanismo de ajuste de la rigidez a largo plazo. Formas de alterar las propiedades de las dos isoformas a corto plazo, tales como la fosforilación o la interacción con el calcio, también están demostradas (flechas azules). (Adaptado de Henk et al., 2004).

más pequeña (2.970 kDa) una vez que en la subregión N2 es constituida apenas por el elemento N2B. A su vez, la isoforma N2BA tiene mayores dimensiones (3.200 a 3.400 kDa) y contiene ambos elementos: N2B y N2A. En el ser humano, en cada mitad del sarcómero están presentes las isoformas N2BA y N2B, en una razón aproximada de 30/70¹⁰.

La isoforma N2BA posee un elemento extensible más en la región de la banda I, por lo que esa isoforma es más distensible y menos rígida que la N2B (fig. 2). De ese modo, los cardiomiocitos que expresan mayores cantidades de la isoforma N2B poseen una mayor rigidez que aquellos que expresan una mayor proporción relativa de la isoforma N2BA^{1,3,11}. Adicionalmente, la proporción relativa de las diferentes isoformas determina también el recogimiento elástico después de la contracción ventricular. Los cardiomiocitos con un elevado grado de expresión de la isoforma N2B, más rígida, poseen también mayor fuerza de restauración, o sea, después la contracción el largo del sarcómero regresa más rápidamente al largo de reposo. Eso ocurre porque, como la isoforma N2B es menos extensible, no sólo ejerce una mayor tensión pasiva durante el estiramiento, como también genera una mayor fuerza para retomar el largo de reposo después de la contracción. De ese modo, en los ventrículos con elevadas proporciones de la isoforma N2B, hay una mayor velocidad de recogimiento elástico, llevando a un acortamiento de la duración de la fase inicial de la diástole⁶.

Funciones de la titina en el músculo cardíaco

La titina como determinante de la función cardíaca diastólica

Los principales determinantes de la función cardíaca diastólica son el relajamiento del miocardio y las propiedades pasivas del ventrículo. Mientras que el relajamiento miocárdico es modulado por la carga, por la inactivación (asociada a la cinética del calcio y a la disociación de los miofilamentos) y por la no uniformidad de la pared ventricular, las propiedades pasivas miocárdicas son influenciadas por la rigidez miocárdica, por el espesor de la pared del ventrículo izquierdo y por la geometría de las cámaras cardíacas¹².

La disfunción diastólica es causada por una lentificación del relajamiento miocárdico y/o por alteraciones de las propiedades pasivas del ventrículo, principalmente por el aumento de la rigidez ventricular¹².

Influencia de la titina en las propiedades pasivas del ventrículo

El aumento de la rigidez ventricular puede ser causado por alteraciones de las características intrínsecas de los propios cardiomiocitos - como por modificaciones en la constitución de las proteínas del citoesqueleto o de las proteínas endosarcoméricas (como alteraciones en la titina o en la alfa-actinina) - o por alteraciones de la constitución de la matriz extracelular, principalmente por el aumento de la red de colágeno y fibrosis extracelular¹².

La titina es un importante determinante de la función diastólica, una vez que influye la rigidez del cardiomiocito

y, de esa forma, las propiedades pasivas del ventrículo. Como fue visto anteriormente, considerando su ubicación estratégica en el sarcómero, y sus propiedades elásticas únicas, la titina es el principal determinante de la tensión pasiva del cardiomiocito, para largos fisiológicos del sarcómero^{7,13}, siendo la contribución relativa de los filamentos intermedios y de los microtúbulos inferior a 10%¹⁴. Para largos superiores a 2,3 mm, difícilmente alcanzados en el corazón intacto, la tensión pasiva pasa a ser determinada esencialmente por el colágeno y por la matriz extracelular^{7,11}.

La importancia de la titina en la determinación de la función diastólica tiene impacto en el nivel fisiopatológico, una vez que, como veremos más adelante, fue demostrado que enfermos con IC diastólica presentan una alteración en la proporción relativa de las isoformas de la titina, con aumento de la isoforma N2B (más rígida) lo que parece explicar el aumento de la rigidez ventricular observado en esos enfermos¹⁵.

Influencia de la titina en el relajamiento ventricular

La titina no determina apenas la rigidez ventricular. Como fue referido anteriormente, la titina posee propiedades elásticas que funcionan de forma bidireccional, o sea, si por un lado genera tensión pasiva cuando el músculo es estirado, por el otro, cuando hay acortamiento del sarcómero, la titina genera una "fuerza de restauración", que tiene una dirección opuesta a la de la tensión pasiva y permite una rápida recuperación del largo de reposo del sarcómero⁹.

En términos hemodinámicos, esa "fuerza de restauración" generada por la titina permite aumentar la velocidad de relajamiento ventricular y permite la formación de un fenómeno de "succión ventricular". Esa fuerza permite aumentar el llenado ventricular, sobre todo en la fase inicial de la diástole, lo que puede ser particularmente importante en las situaciones de ejercicio físico u otras situaciones de taquicardia¹⁶.

Además de eso, aun antes del inicio de la diástole, la titina interviene también en la determinación del fin de la contracción miocárdica, un proceso que también es dependiente del largo del sarcómero. En verdad, cuando existe el acortamiento del sarcómero a valores inferiores al largo de reposo la titina facilitará el proceso de desactivación de los puentes cruzados, influyendo y determinando el fin de la contracción muscular^{9,16}.

La titina como un determinante de la función cardíaca sistólica

La titina es un importante determinante de la función cardíaca diastólica pero influye también la función sistólica, por el efecto que ejerce en la modulación de la relación de Frank-Starling¹⁷.

Según la Ley de Frank-Starling, el aumento de la precarga, o sea, el aumento del volumen telediastólico mejora la función sistólica originando un aumento del volumen de eyección. La titina, como determinante de la rigidez ventricular y de las propiedades pasivas del ventrículo, influye en la relación presión-volumen telediastólica y, así, el llenado ventricular y el volumen telediastólico¹⁸.

A nivel celular, el mecanismo de Frank-Starling es explicado por la ocurrencia de un aumento de la sensibilidad de los

Artículo de Revisión

miofilamentos al Ca^{2+} en respuesta al aumento del largo del sarcómero¹⁹. La titina desempeña un papel fundamental en la regulación de ese mecanismo, una vez que la tensión pasiva ejercida por la titina determina directamente el aumento de la sensibilidad de los miofilamentos al calcio^{17,20,21}. Además de eso, la titina, como elemento estructural del filamento grueso en la región de la banda A, es también capaz de influenciar directamente la unión entre los miofilamentos de actina y miosina, según el largo del sarcómero. O sea, cuando aumenta el largo del sarcómero la titina parece potenciar la unión entre los filamentos de actina y de miosina, con el consecuente aumento de la fuerza de contracción²². De ese modo, la titina es capaz de “potenciar” el ciclo de los puentes cruzados cuando el sarcómero es estirado, y e cuando éste es acortado a dimensiones por debajo de su largo de reposo, la titina es también capaz de inhibir la formación de los puentes cruzados¹⁶.

La titina en la señalización intracelular: un sensor biomecánico

Además de su función estructural y elástica, la titina funciona también como un sensor biomecánico. Dada su capacidad de distenderse y acortarse, la titina es sensible al grado de estiramiento del cardiomiocito^{6,23} siendo después capaz de transmitir esa señal biomecánica por la unión e interacción que establece con varias proteínas estructurales y señalizadoras. Esa señalización ocurre sobre todo en tres regiones principales: en la línea Z, en la parte central de la banda I y en la línea M^{1,6,23}.

En la región de la línea Z la titina se une a la proteína teletonina (T-cap), que funciona como un lugar de interligación entre la titina y varias otras moléculas estructurales y de enlace^{23,24}. Entre esas moléculas se encuentran proteínas presentes en los túbulos T y en el retículo sarcoplasmático (RS), principalmente la anquirina 1 (sANK 1), la obscurina (RS) y canales de potasio (minK/isk). De esa forma, la titina interviene no sólo en la manutención de la estructura del sarcómero, como también de la estructura y correcta organización de los túbulos T y del retículo sarcoplasmático^{23,24}.

En la región de la línea Z se forman complejos de proteínas que funcionan como señalizadores de tensión y que responden tanto a la fuerza pasiva, generada por los filamentos de titina durante el estiramiento, como a la fuerza activa, transmitida por los filamentos de actina^{23,24}. En ese nivel, existen varias proteínas que al interactuar con la titina participan en seguida en cascadas de señalización intracelular, promoviendo la expresión de genes envueltos en el remodelado cardíaco. Una de esas proteínas es la MLP (*muscle LIM* proteín - miembro de la familia de proteínas LIM), habiendo sido aun observado que mutaciones puntuales de esa proteína pueden participar en el desarrollo ya sea de la cardiomiopatía hipertrófica, como de la cardiomiopatía dilatada²⁴. Con todo, no está aun establecido el mecanismo por el cual la titina, interactuando con la MLP, es capaz de regular la transcripción genética. Aparentemente, cuando, durante el estiramiento, se generan tensiones elevadas en el nivel de la línea Z, ocurre la separación de las uniones entre la titina y el MLP que, una vez libre, migra al núcleo, donde va a promover la transcripción de varios genes envueltos en el remodelado cardíaco²⁴.

A nivel de la región central de la banda I, los elementos N2B y N2BA funcionan como los lugares de unión de la titina a diversas proteínas señalizadoras. La secuencia única N2B, exclusiva del músculo cardíaco, se une, por intermedio de un miembro de la familia de proteínas LIM (proteínas que contienen dominios LIM - agrupamiento de ocho residuos de cisteína y histidina en la configuración (C-X2-C-X16/23-H-X2-C-X2-C-X2-C-X16/21-C-X2/3-C/D/H)) conocido como DRAL/FHL 2, a diversas enzimas metabólicas. En estados de mayor necesidad energética la función del DRAL/FHL 2 como puente de unión entre la titina y enzimas como la creatinina kinaso o la kinaso del adenilato adquiere una importancia creciente aumentando el aporte de ATP²⁴.

Los ligandos de la titina en la región de la banda I, así como las proteínas a ellos asociadas, también son encontrados en el núcleo, donde funcionan como reguladores de la transcripción y del ciclo celular, pudiendo también estar envueltos en las alteraciones de las propiedades pasivas del cardiomiocito a largo plazo¹. Es el ejemplo de la interacción con la obscurina, una proteína con diversos dominios de señalización. Ese complejo titina-obscurina responde al estiramiento del sarcómero, estando envuelto en la reestructuración sarcométrica que ocurre por ejemplo en la adaptación muscular y en la insuficiencia cardíaca².

La región de la titina adyacente a la línea M también posee lugares potencialmente envueltos en la sensibilidad de los miofilamentos al Ca^{2+} y participa extensamente en los mecanismos de señalización intracelular^{2,23}.

Otras funciones de la titina

Además de las funciones ya referidas, comienza a investigarse el involucramiento de la titina en el proceso de doblaje de proteínas, en la regulación de expresión de genes y en la regulación de varios canales iónicos²³.

Además de eso, la titina es aun importante en el proceso de miofibrillogénesis formando una especie de molde estructural para la correcta disposición y organización de los filamentos de actina y miosina²⁵. La pérdida de la titina origina una organización anormal del sarcómero como fue demostrado recientemente²⁶.

Modulación de las propiedades de la titina

La titina funciona en el sarcómero como un elemento dinámico, cuyas funciones pueden ser moduladas, ya sea a corto o largo plazo, por diversos factores, lo que le permite al miocardio modificar su elasticidad en razón de las diversas alteraciones hemodinámicas a que está sujeto^{11,27}.

Como es demostrado en la figura 4, la rigidez del músculo cardíaco varía en razón de alteraciones en la composición y en el estado de fosforilación de la titina. Tales alteraciones pueden ocurrir a largo plazo, mediante una modificación de la proporción relativa entre las dos isoformas de la titina, o, a corto plazo, por alteraciones post traslacionales, como la alteración del estado de fosforilación de la titina o de su unión al ión calcio^{11,27}.

Mecanismos de regulación a corto plazo

Alteración del estado de fosforilación de la titina

El segmento N2B de la titina cardíaca puede ser fosforilado por la proteína quinasa A (PKA) originando una disminución de su tensión pasiva (fig. 4)^{28,29}. Como sería de esperar, fue también observado que la reducción de la tensión pasiva inducida por la fosforilación de la titina por la PKA es más pronunciada en el músculo cardíaco con niveles más elevados de expresión del segmento N2B^{30,31}.

La activación de la PKA que ocurre, por ejemplo, después de la estimulación betaadrenérgica constituye uno de los principales mecanismos de regulación fisiológica a corto plazo de la distensibilidad de la titina. Es sabido que la estimulación simpática, más allá de sus efectos cronotrópico e inotrópico positivo, es también capaz de mejorar la función diastólica, aumentando no sólo la velocidad de relajamiento ventricular, sino también la complacencia ventricular. Este último efecto depende, entre otros factores, de la fosforilación de la isoforma N2B de la titina por la PKA^{27,32,33}.

Los efectos de la fosforilación de la isoforma N2B por la PKA también repercuten en el nivel en la fase final de la sístole, una vez que la disminución de la rigidez del cardiomiocito conducirá también a una disminución de la fuerza de restauración de los cardiomiocitos³¹. Ese efecto, teóricamente poco benéfico, puede ser contrapuesto por el hecho de que la PKA acelera la velocidad de relajamiento del miocardio, por medio de la fosforilación simultánea del fosfolamban y de la troponina³⁴. Son necesarios más estudios para comprender el papel de la fosforilación de la titina en la función cardíaca.

Muy recientemente fue también demostrado que tanto la proteína quinasa G (PKG)^{35,36}, como la isoforma alfa de la proteína quinasa C (PKC)³⁷ promueven igualmente la fosforilación de la titina. En el caso de la PKG la fosforilación se da en el segmento PEVK de la isoforma N2B, llevando a una disminución de la tensión pasiva cardiomiocitaria³⁵. Ya en el caso de la fosforilación por la PKC, ésta ocurre en el segmento PEVK tanto de la isoforma N2B como de la N2BA y el efecto global de esa fosforilación es el aumento de la tensión pasiva³⁵⁻³⁷.

En resumen, la titina funciona como un “resorte ajustable” que, por medio de la fosforilación/desfosforilación sobre todo de su segmento N2B, permite la adaptación de la función ventricular a las necesidades del organismo.

Regulación de la titina por el ión calcio

El Ca^{2+} tiene un papel importante como regulador de la distensibilidad del cardiomiocito, sobre todo en razón de la modulación de la interacción entre la titina y los filamentos finos. Estudios revelan que el dominio PEVK en la región extensible de la isoforma N2B se une a la F-actina y que esa interacción podrá contribuir a la rigidez pasiva de los cardiomiocitos³⁸. Aunque el Ca^{2+} aisladamente no interfiera en esa unión, cuando ese ión se encuentra unido a la proteína S100A1, existente en elevadas concentraciones en el miocardio, esa interacción es inhibida, disminuyendo la rigidez del cardiomiocito. La observación del aumento de la rigidez del músculo cardíaco paralelamente a

la declinación de la concentración de Ca^{2+} durante la diástole apoya ese mecanismo^{1,2,23,39}.

Mecanismos de regulación de la titina a largo plazo

Como fue anteriormente referido, los cardiomiocitos expresan las dos isoformas de la titina, permitiéndoles alcanzar un nivel intermedio de tensión pasiva (fig. 3), que puede ser modificado según la proporción relativa de expresión N2B/N2BA. Una mayor expresión de la isoforma N2B está asociada a un aumento de la rigidez miocárdica, mientras que el aumento de la expresión N2BA se asocia a un aumento de su complacencia. Con todo, permanecen por aclarar los mecanismos moleculares subyacentes a la expresión preferencial de una de las isoformas. Se sabe que en respuesta a diferentes estados hemodinámicos pueden ocurrir alteraciones a largo plazo en la razón de expresión de las dos isoformas de la titina, lo que, como veremos enseguida, ocurre por ejemplo en la insuficiencia cardíaca¹⁵ y en la estenosis aórtica^{40,41}.

Es importante referir que, por medio de la alteración de la proporción relativa de las isoformas de la titina, apenas son modificadas las propiedades elásticas de la titina, no siendo alteradas sus propiedades estructurales, una vez que de esa forma sólo la porción de la titina presente en la banda I (o sea, el componente distensible) es el que sufre alteraciones¹¹.

En resumen, la función cardíaca puede ser modificada por alteraciones de las propiedades elásticas de la titina, que pueden ocurrir tanto a corto como a largo plazo. Tal como podemos ver en la figura 4, el aumento de la expresión de la isoforma N2B está asociado a un aumento de la rigidez de la titina. Esa rigidez puede ser reducida por la fosforilación de la titina por la PKA o PKG o aumentada por la interacción titina-actina, que es inhibida por el complejo Ca^{2+} /S100A1.

Implicaciones fisiopatológicas

Las alteraciones de la titina están envueltas en la fisiopatología de algunas enfermedades cardíacas, principalmente en la insuficiencia cardíaca diastólica (ICD) y en la cardiomiopatía dilatada (CMD). Hay cada vez mayor evidencia de que las alteraciones en la razón de expresión de las dos isoformas de la titina, así como la alteración de su estado de fosforilación están en la base del desarrollo y progresión de esas enfermedades.

Alteraciones en la proporción relativa de las isoformas de la titina (N2BA/N2B)

En la disfunción diastólica ocurre una lentificación del relajamiento del miocardio y/o un aumento de la rigidez ventricular. En un ventrículo más rígido, el aumento del volumen de sangre durante la diástole sólo es conseguido a costa de un aumento de las presiones de llenado ventricular, con aumento de la relación presión-volumen telediastólica, lo que puede originar un cuadro clínico de IC diastólica.

La titina, como principal determinante de la tensión pasiva del cardiomiocito, determina la rigidez ventricular. Como fue demostrado recientemente, los cardiomiocitos extraídos de biopsias endomiocárdicas de enfermos con ICD exhibían un

Artículo de Revisión

aumento relativo de la expresión de la isoforma más rígida de la titina, N2B. Se observó que, mientras que en un corazón humano sano la razón N2BA/N2B normal es de cerca de 30/70¹⁰, en los enfermos con ICD esa relación era de 17/83; y en la IC sistólica la razón fue de 35/65¹⁵. Sin embargo, ese mismo grupo demostró recientemente que la hipofosforilación del segmento N2B de la titina parece contribuir más significativamente al aumento de la tensión pasiva verificada en los casos de ICD⁴¹.

En enfermos con cardiomiopatía dilatada y remodelado excéntrico fue observada una alteración de la relación entre las isoformas de la titina, pero aquí con un aumento relativo de la isoforma más distensible, la N2BA¹⁰.

En una fase inicial de la insuficiencia cardíaca sistólica, alteraciones de las isoformas de la titina pueden funcionar como un mecanismo de adaptación, una vez que el aumento de la complacencia ventricular permite un aumento del volumen telediastólico, y consecuentemente un aumento del débito cardíaco de acuerdo con el mecanismo de Frank-Starling³². Además de eso, se prevé que la menor fuerza de restauración desarrollada por los cardiomiocitos durante la sístole (en razón del aumento de la proporción de la isoforma más complaciente) permitiría una disminución del volumen telesistólico final para cualquier post carga. Esa disminución ocurriría por la declinación de la resistencia al acortamiento del cardiomiocito, aumentando así el volumen de eyección. De hecho, está probado que individuos con mayor proporción de N2BA tienen mejor tolerancia al ejercicio en razón del aumento de la presión venosa de oxígeno¹⁰. Ese efecto teóricamente benéfico acaba por no ocurrir en la práctica, una vez que, en la IC sistólica, la relación de Frank-Starling está alterada a consecuencia de la disminución de la sensibilidad de los miofilamentos al Ca^{2+} , en razón, principalmente, del menor desarrollo de tensión pasiva en presencia de un aumento de la isoforma N2BA¹⁰. Finalmente, en el corazón insuficiente puede ocurrir un aumento de la degradación de la titina, lo que podrá igualmente contribuir a la atenuación del mecanismo de Frank-Starling⁴². Además de eso, ese proceso se vuelve posteriormente desadaptativo, una vez que el aumento del volumen telediastólico del ventrículo origina más estrés sobre las paredes ventriculares, estimulando y agravando el proceso de remodelado cardíaco^{13,32,43}.

También en la cardiomiopatía isquémica ocurre un aumento de la razón N2BA/N2B, a pesar de que generalmente ocurre un aumento de la rigidez ventricular⁴⁴. Esa observación, aparentemente paradójica, puede ser explicada por el hecho de que, en esa situación, el aumento de la rigidez ventricular sea debido no a alteraciones a nivel de los cardiomiocitos, sino a alteraciones en la matriz extracelular con aumento de la fibrosis miocárdica. Aquí, el aumento de la isoforma N2BA de la titina (menos rígida) puede ser un mecanismo de compensación al aumento de la rigidez ventricular secundario al proceso de fibrosis. En verdad, en la cardiomiopatía isquémica ocurre una disminución de la tensión pasiva de cada cardiomiocito, probablemente en razón del aumento de la isoforma N2BA¹⁰.

Alteraciones en el estado de fosforilación de la titina

Como fue abordado anteriormente, la titina puede también sufrir modulación de su rigidez mediante alteraciones post traslacionales, principalmente por la fosforilación del segmento N2B²⁹. La titina puede ser fosforilada por la proteína

quinasa A (PKA) y por la proteína quinasa G (PKG), llevando a una disminución de su rigidez^{28,29,31,35}, induciendo así, y de forma aguda, alteraciones a corto plazo en la rigidez ventricular.

Esos descubrimientos son particularmente relevantes, una vez que pueden incluso ser blanco de intervención terapéutica en los enfermos con insuficiencia cardíaca. En verdad, el tratamiento con PKA de cardiomiocitos extraídos de enfermos con IC diastólica permitió una reducción de su tensión pasiva, a valores semejantes a los de los individuos control³⁰. Esa disminución de la tensión pasiva fue directamente proporcional a la rigidez inicial de los cardiomiocitos, lo que es concordante con la idea de que el aumento de la rigidez cardíaca está directamente relacionado no sólo a alteraciones de la expresión relativa de las isoformas, como también del estado de hipofosforilación de la isoforma rígida de la titina. Tal como sería de esperar por la menor rigidez de los cardiomiocitos provenientes de enfermos con IC sistólica, el mismo tratamiento con PKA no causó una caída tan significativa de la tensión pasiva¹⁵.

Tanto la estenosis aórtica como la cardiomiopatía hipertensiva presentan disfunción diastólica, pero apenas en la última se verifica un aumento sustancial de la rigidez miocárdica. En ambos casos, la expresión relativa de las isoformas N2BA/N2B, así como su grado de total de fosforilación son semejantes. Con todo, en la cardiomiopatía hipertensiva se observó una hipofosforilación relativa de la isoforma más rígida, la N2B, habiendo sido propuesto como el mecanismo subyacente al aumento de la rigidez miocárdica y disfunción diastólica en esa enfermedad^{40,45}.

También en la cardiomiopatía dilatada parecen ocurrir alteraciones en la fosforilación de la titina. En esos enfermos fue observada una disminución de la actividad de la PKA cardíaca, que podrá ser un mecanismo compensador, en respuesta a la elevada complacencia observada en los cardiomiocitos de esos enfermos¹³.

En resumen, la titina, por medio de la modificación de la expresión de sus isoformas y/o de su estado de fosforilación, parece ser un elemento clave en la fisiopatología de varias enfermedades cardíacas. Además de eso, la titina puede aun ser un potencial blanco de manipulación farmacológica constituyendo así un nuevo blanco terapéutico, sobre todo en la insuficiencia cardíaca.

Agradecimientos

Los autores agradecen la preciosa ayuda de Pedro Daniel Miranda Couto en la preparación de las figuras.

Potencial Conflicto de Intereses

Declaro no haber conflicto de intereses pertinentes.

Fuentes de Financiamiento

El presente estudio fue parcialmente financiado por la Fundação para a Ciência e Tecnologia.

Vinculación Académica

No hay vinculación de este estudio a programas de postgrado.

Referencias

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, Fougerousse 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⁺/H⁺ 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, Kellermayr 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. Ca²⁺-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.