



FARMACOLOGÍA

Directo al núcleo:  
células en división  
en el pulmón de un  
pequeño ratón doméstico  
se ponen verdes  
al producir la proteína  
fluorescente cuyo gen  
transportó la crotamina

# El cartero de las células

Una proteína del veneno de la serpiente cascabel penetra en las células en multiplicación y tiene potencial como transportadora de medicamentos y antitumoral

Publicado en septiembre de 2007

**H**ábil para encontrar personas talentosas, a quienes deja trabajando en libertad, el químico Tetsuo Yamane estructuró en Brasil un grupo de investigación, con ramificaciones ya en otros países, que en pocos años llevó a la detección de las propiedades bastante raras de una proteína del veneno de una serpiente típica de la sabana y de la vegetación agreste propia del nordeste del país conocida como 'caatinga', la cascabel. La crotamina, tal como se denomina a esa proteína, atraviesa la membrana celular y transporta genes u otras moléculas hacia el interior y hacia el núcleo de las células —no cualquier célula, solamente aquéllas que se están multiplicando. Por esta razón, dicha proteína puede usarse en diagnósticos de enfermedades, para conducir medicamentos y, a juzgar por los experimentos más recientes, para destruir tumores.

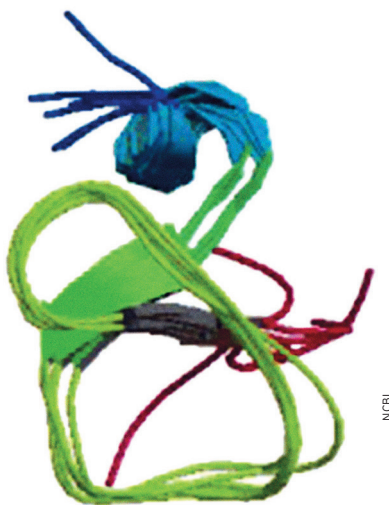
Yamane, quien tiene actualmente 76 años, está al frente de un laboratorio de biotecnología en el Instituto de Investigaciones Energéticas y Nucleares (Ipen, por sus siglas en portugués) y en el Centro de Biotecnología de la Amazonia (CBA), y comenzó a crear nuevas vertientes para el estudio de la crotamina en 1993, cuando pensaba en regresar a Brasil, luego de 40 años viviendo en Estados Unidos. Aislada en la década de 1950 por el bioquímico José Moura Gonçalves, la crotamina ya había sido bastante estudiada, en razón de su capacidad de paralizar los músculos de roedores. Cuarenta años después parecía no esconder ya grandes enigmas —a no ser para un químico, hijo de japoneses, cuya audacia había sido nutrida día a día por la convivencia con científicos del nivel de Richard Feynman y Linus Pauling, durante su carrera de grado y posgrado en el Instituto de Tecnología de California (Caltech). Y su capacidad de formular nuevas preguntas se perfeccionó aún más en el transcurso de los casi diez años de trabajo con los físicos del Laboratorio Bell, donde se inventaron el transistor, el láser, el circuito integrado y la comunicación por satélite. Al conocer la crotamina, Yamane se dejó llevar por las dudas acerca de los mecanismos, todavía nebulosos en ese entonces, por los cuales esta proteína actúa en el organismo y por las posibles interacciones de dicha molécula cuya estructura se asemeja a un dragón de lana.

¿La crotamina podría interferir en la división de las células? Fue con esa pregunta que Yamane, desde 1994 instalado en el Instituto Butantã y en aquel tiempo trabajando solamente con los bioquímicos Gandhi Rádis-Baptista y Álvaro Prieto da Silva, atrajo el interés del biólogo celular Alexandre Kerkis y su esposa, la bióloga Irina. Ambos son rusos. Habían trabajado en uno de los mayores centros de investigación de Rusia, en la Siberia, antes de que la *Perestroika* fragmentase la estructura de producción del conocimiento científico por aquellos lugares. Después de unos tiempos en la Universidad Estadual del Norte Fluminense, los Kerkis vinieron en 1999 a São

Paulo. Se instalaron en el Instituto de Ciencias Biomédicas (ICB) de la Universidad de São Paulo (USP) y comenzaron a estudiar las células madre embrionarias de los pequeños ratones domésticos. Fue cuando conocieron a Yamane y, en conjunto, descubrieron nuevas propiedades de la toxina que parecía no tener ninguna utilidad. En dosis muy bajas, verificaron que la crotamina llegaba rápidamente –en solamente cinco minutos– al núcleo no sólo de las células madre embrionarias de los ratones, sino también a otros tipos de células.

Era la primera vez que se demostraba que una proteína hasta entonces vista solamente como una toxina actuaba también como cartero celular: atravesaba la membrana de las células en división y llegaba al núcleo, donde están los cromosomas. Allá adentro, esta pequeña proteína se adhiere a los centrómeros, el punto mediante el cual los cromosomas duplicados se mantienen unidos durante la división celular. Luego, tan pronto como los cromosomas se separan en células independientes, la crotamina sale de la célula y permanece en el espacio intercelular, como a la espera de otro momento para entrar en acción. Estos resultados, publicados en julio de 2004 en el *FASEB Journal*, abrieron otras perspectivas de investigación y de uso de esa proteína. “Comenzamos a ver a la toxina por otra cara”, comenta la farmacóloga Mirian Hayashi, que trabajó con Yamane en el Butantã durante tres años en el marco de esta investigación, al cabo otros tres en el desarrollo de fármacos en Japón.

**Contra el dolor y los parásitos** - Fue también en el Butantã que otro equipo encontró en la cascabel una sustancia con un poder analgésico 600 veces mayor que el de la morfina y aparentemente sin efectos colaterales relevantes. En el marco de un experimento realizado en la USP, el veneno de la *Crotalus durissus terrificus*, que reptar por las tierras del sur y del oeste de Brasil, fue el que se mostró más eficaz contra el parásito causante de la leishmaniasis, en comparación con el de otras dos subespecies, una típica de la ‘caatinga’, característica del nordeste de Brasil y otra de las regiones sudeste y centro oeste del país. Las fracciones más activas en las pruebas en células y en pequeños ratones domésticos fueron la girotoxina y la crotamina.



**Estructura de la crotamina: es el componente mayoritario del veneno de la cascabel**

Componente mayoritario del veneno de la serpiente cascabel, la crotamina es una proteína pequeña. Tiene solamente 42 aminoácidos, casi tanto como la insulina, la hormona de 51 aminoácidos que controla la cantidad de azúcar en la sangre. Pero es más minúscula si se la compara por ejemplo con la hemoglobina, la portentosa molécula de cuatro cadenas de 140 aminoácidos cada una que transporta oxígeno a todas las células del cuerpo. Como es pequeña, es comprensible que atravesase fácilmente la membrana de las células. Pero, ¿cómo?

He aquí la respuesta: uniéndose a moléculas de la superficie celular conocidas como proteoglicanos de heparan-sulfatos, que transitan por el interior de la célula. No se trata de un enlace fortuito. “El momento en que las células producen más heparan-sulfatos es durante el ciclo reproductivo”, comenta el bioquímico Ivarne Tersariol, docente de la Universidad Federal del Estado de São

Paulo (Unifesp) y de la Universidad de Mogi das Cruzes (UMC), también en São Paulo. Tal como ese grupo demostró en un artículo publicado en el *Journal of Biological Chemistry*, la afinidad entre las moléculas de crotamina con el proteoglicano de heparan-sulfato se debe esencialmente a fuerzas electrostáticas: la crotamina es una molécula con carga eléctrica positiva y los heparan, negativa.

Sucede que la crotamina no es enteramente positiva: una de sus caras es eléctricamente neutra. Esta peculiaridad alimentó la perspectiva de unirle a otras moléculas tanto del lado positivo como del neutro. Pero aún era solamente teoría, como también era sólo una hipótesis la posibilidad de que la crotamina, por ser positiva, se vinculase al ADN, negativo. Había indicios de que sería posible; sin embargo la crotamina podría unirse, no directamente, pero a alguna otra proteína conjugada al ADN.

Para despejar la duda, Mirian conversó con Vitor Oliveira. Químico graduado en la Universidad Federal de São Carlos (UFSCar), Oliveira trabajaba en proyectos de análisis de la estructura de proteínas en una universidad privada. Era él quien operaba en la Unifesp un aparato que analiza de qué manera las moléculas absorben los componentes de un tipo especial de luz. La respuesta vino en cinco minutos, por medio de un gráfico: en efecto, la crotamina se unía directamente al ADN. Poco después, un experimento del grupo demostró que la crotamina podría efectivamente transportar una forma de ADN circular, conocida como plásmido, al núcleo de células del hígado, el pulmón y la médula ósea que se encuentran en multiplicación constante. El ADN forastero funcionó normalmente, como si fuera autóctono, en una de cada cuatro células: un resultado notable.

Se acumulan también evidencias de que la crotamina podría estar vinculada a la defensa del organismo –y no solamente por formar parte de un veneno. Su estructura tridimensional es semejante a la de la beta-defensina, una proteína hallada en la saliva y en el moco (de la nariz, por ejemplo) de los seres humanos y de otros animales. “Moléculas como éstas forman parte de las primeras defensas de los organismos”, comenta Irina. De modo similar a las beta-defensinas, la crotamina podría integrar el sistema inmune innato, que funciona intensamen-

### EL PROYECTO

*Estudio del sistema de transporte mediado por péptidos catiónicos*

#### MODALIDAD

Línea Regular de Auxilio a la Investigación

#### COORDINADOR

TETSUO YAMANE - IPEN

#### INVERSIÓN

65.649,56 reales (FAPESP)

te durante el embarazo y en los primeros meses después del nacimiento, mientras que el organismo aún no produce anticuerpos contra los microorganismos. Por ende, las serpientes también usan algo de sí, pero en cantidades mayores, como veneno, para defenderse: la glándula del veneno es una glándula salivar modificada, recuerda Mirian. No obstante, no todas las *Crotalus durissus terrificus* producen crotamina. Gandhi Rádís-Baptista verificó que todas tienen el gen responsable de la producción de la crotamina; pero algunas representantes de esta especie –de hasta 1,5 metros de largo y fácilmente reconocibles por la cola con un cascabel– producen una proteína con una estructura similar, llamada crotasina, de efecto aún desconocido.

Rádís-Baptista está ahora en la Universidad Federal de Pernambuco, cumpliendo lo que parece ser el destino de los participantes de esta historia: no crear raíces o, al menos, partir inmediatamente para encarar trabajos aún más desafiantes. Mirian salió del Butantan hace un año, poco después de Yamane, y está ahora en la Unifesp como docente de farmacología; Vitor Oliveira dejó la universidad particular y regresó a la Unifesp como profesor de biofísica. Irina Kerkis salió de la USP y está ahora en el Butantã, mientras que Alexandre Kerkis trabaja ahora en un laboratorio de una clínica médica. El bioquímico Fábio Nascimento, que ejecutó los experimentos con los heparam-sulfatos, se encuentra hoy en una empresa de biotecnología en Suiza.

**Incertidumbres por delante** - Aun estando distantes, aparentemente no han perdido las ganas de trabajar juntos en problemas que tal vez no logren resolver solos. Extraída y purificada con destreza por Eduardo Oliveira en la USP de Ribeirão Preto, la crotamina forma conjuntos de dos o tres unidades que reducen su capacidad de transportar moléculas. Evitar la formación de estos agregados quizá sea más difícil que producir una versión sintética de la crotamina, que evitaría la dependencia de la purificación del veneno de serpientes.

Aunque con mucho trabajo por delante, los investigadores ya negocian con empresas interesadas en usar tramos de la crotamina como transportadores de genes. En 2004 solicitaron la patente de los usos potenciales de esta molécula por-



EDUARDO CESAR

La *Crotalus*: una esperanza también contra parásitos como el de la leishmaniasis

que no quieren repetir la historia de otras moléculas descubiertas por brasileños que, por no haber sido patentadas ni contar con el apoyo de empresas, fueron incorporadas por otros grupos de investigación. Ellos saben que tener una patente es solamente uno de los requisitos para iniciar el largo camino hacia el desarrollo de un fármaco.

Más adelante, si las próximas pruebas de laboratorio confirman el potencial de la crotamina, el grupo tendrá otro desafío: producir la molécula en mayor cantidad –en escala piloto y, posteriormente, en escala industrial–, de manera tal que facilite las negociaciones con empresas o instituciones interesadas en hacer las

pruebas finales, antes de que la molécula se convierta en un medicamento o en un marcador para diagnósticos contra el cáncer. “Quien tenga buenas ideas puede entrar en contacto”, dice Yamane. “Somos un grupo abierto”. Poco a poco, Yamane ha ido atrayendo a otros grupos –de Alemania, Polonia, Estados Unidos y Japón– para trabajar con la crotamina. “Cada uno puede hacer su aporte; solo así es que la ciencia avanza”, dice, sin abdicar de su arrojo, que signó su carrera científica: “Linus Pauling siempre recordaba que, al comenzar un trabajo, debemos pensar en cómo contribuir de manera original”. ■

CARLOS FIORAVANTI