



Direto ao núcleo:
células em divisão no
pulmão de camundongo
se tornam verdes ao
produzirem a proteína
fluorescente cujo gene
a crotamina transportou

O carteiro das células

Proteína do veneno da cascavel penetra nas células em multiplicação e mostra potencial como transportadora de medicamentos e antitumoral

CARLOS FIORAVANTI

Hábil em encontrar pessoas talentosas, que deixa trabalhando com liberdade, o químico Tetsuo Yamane formou no Brasil um grupo de pesquisa já com ramificações em outros países que em poucos anos levou à identificação das propriedades bastante raras de uma proteína do veneno de uma serpente típica do Cerrado e da Caatinga, a cascavel. A crotamina, como essa proteína é chamada, atravessa a membrana celular e transporta genes ou outras moléculas para o interior e mesmo para o núcleo das células – não qualquer célula, só as que estão se multiplicando. Por essa razão, essa proteína pode ser usada em diagnósticos de doenças, para conduzir medicamentos e, a julgar pelos experimentos mais recentes, para destruir tumores.

Yamane, hoje com 76 anos, à frente de um laboratório de biotecnologia no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (Ipen) e no Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA), começou a criar novas vertentes para o estudo da crotamina lá por 1993, quando pensava em voltar ao Brasil, depois de 40 anos vivendo nos Estados Unidos. Isolada na década de 1950 pelo bioquímico José Moura Gonçalves, a crotamina já havia sido bastante estudada, em razão de sua capacidade de paralisar os músculos de roedores. Quarenta anos depois parecia não oferecer mais grandes enigmas – a não ser para um químico, filho de japoneses, cuja ousadia havia sido nutrida dia a dia pela convivência com cientistas do nível de Richard Feynman e Linus Pauling, durante a graduação e a pós no Instituto de Tecnologia da Califórnia (Caltech); sua capacidade de fazer perguntas novas aprimorou-se ainda mais ao longo dos quase dez anos de trabalho com os físicos do Laboratórios Bell, onde foram inventados o transistor, o laser, o circuito integrado e a comunicação por satélite. Ao conhecer a crotamina, Yamane se deixou levar pelas dúvidas sobre os mecanismos então ainda nebulosos pelos quais a proteína age no organismo e pelas possíveis interações dessa molécula cuja estrutura lembra um dragão de lâ.

A crotamina poderia interferir na divisão das células? Foi com essa pergunta que Yamane, desde 1994 instalado no Instituto Butantan e então trabalhando apenas com os bioquímicos Gandhi Rádis-Baptista e Álvaro Prieto da Silva, atraiu o interesse do biólogo celular Alexandre Kerkis e de sua esposa, a bióloga Irina. Ambos são russos. Haviam trabalhado em um dos maiores centros de pesquisa da Rússia, na Sibéria, antes que a perestroica fragmentasse a estrutura de produção de conhecimento científico por lá. Depois de uns tempos na Universidade Estadual do Norte Fluminense, os Kerkis vieram em 1999 para São Paulo. Instalaram-se no Institu-

to de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP) e começaram a estudar células-tronco embrionárias de camundongo. Foi quando conheceram Yamane e, em conjunto, descobriram novas propriedades da toxina que parecia não ter mais nada para contar. Em doses muito baixas, verificaram, a crotamina chegava rapidamente – em apenas cinco minutos – ao núcleo não só de células-tronco embrionárias de camundongos como também a outros tipos de células.

Era a primeira vez que se demonstrava que uma proteína até então vista somente como toxina atuava também como carteiro celular: atravessava a membrana das células em divisão e chegava ao núcleo, onde estão os cromossomos. Lá dentro, essa pequena proteína adere aos centrômeros, o ponto por meio do qual os cromossomos duplicados se mantêm unidos durante a divisão celular. Em seguida, assim que os cromossomos se separam em células independentes, a crotamina sai da célula e permanece no espaço intercelular, como que à espera de outro momento para entrar em ação. Os resultados, publicados em julho de 2004 no *FASEB Journal*, abriram outras perspectivas de pesquisa e de uso dessa proteína. “Começamos a ver uma toxina por outra face”, conta a farmacologista Mirian Hayashi, que trabalhou com Yamane no Butantan durante três anos nessa pesquisa, depois de outros três em desenvolvimento de fármacos no Japão.

Contra dor e parasitas - Foi também no Butantan que outra equipe encontrou na cascavel uma substância com um poder de analgesia 600 vezes maior que o da morfina e aparentemente sem efeitos colaterais relevantes. Em um experimento realizado na USP, o veneno da *Crotalus durissus terrificus*, que rasteja pelas terras do sul e oeste do Brasil, foi o que se mostrou mais eficaz contra o parasita causador da leishmaniose, em comparação com o de outras duas subespécies, uma típica da Caatinga e outra das regiões Sudeste e Centro-Oeste. As frações mais ativas nos testes em células e em camundongos foram a giirotoxina e a crotamina.

Componente majoritário do veneno da cascavel, a crotamina é uma proteína pequena. Tem apenas 42 aminoá-



Estrutura da crotamina: componente majoritário do veneno da cascavel

cidos, quase tanto quanto a insulina, o hormônio de 51 aminoácidos que controla a quantidade de açúcar no sangue. Mas é minúscula se comparada, por exemplo, com a hemoglobina, a portentosa molécula de quatro cadeias de 140 aminoácidos cada uma que transporta oxigênio a toda célula do corpo. Como é pequena, é compreensível que atravessasse facilmente a membrana das células. Mas como?

Eis a resposta: unindo-se a moléculas da superfície celular conhecidas como proteoglicanos de heparam-sulfatos, que transitam pelo interior da célula. Não se trata de uma ligação fortuita. “O momento em que as células mais produzem heparam-sulfatos é durante o ciclo reprodutivo”, conta o bioquímico Ivarne Tersariol, professor da Univer-

sidade Federal do Estado de São Paulo (Unifesp) e da Universidade de Mogi das Cruzes (UMC). Como esse grupo demonstrou em um artigo no *Journal of Biological Chemistry*, a afinidade entre as moléculas de crotamina com o proteoglicano de heparam-sulfato se deve essencialmente a forças eletrostáticas: a crotamina é uma molécula com carga elétrica positiva e os heparans, negativa.

Ocorre que a crotamina não é inteiramente positiva: uma de suas faces é eletricamente neutra. Essa peculiaridade alimentou a perspectiva de ligar outras moléculas tanto do lado positivo quanto do neutro. Mas ainda era só teoria, como também era só hipótese a possibilidade de a crotamina, por ser positiva, ligar-se ao DNA, negativo. Havia indícios de que seria possível; no entanto a crotamina poderia se unir, não diretamente, mas a alguma outra proteína conjugada ao DNA.

Para tirar a dúvida, Mirian conversou com Vitor Oliveira. Químico formado pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), ele trabalhava em projetos de análise de estrutura de proteínas em uma universidade particular. Era ele quem operava na Unifesp um equipamento que analisa como as moléculas absorvem os componentes de um tipo especial de luz. A resposta veio em cinco minutos, por meio de um gráfico: sim, a crotamina se unia diretamente ao DNA. Pouco depois, um experimento do grupo demonstrou que a crotamina poderia de fato transportar uma forma de DNA circular conhecida como plasmídeo para o núcleo de células de fígado, pulmão e medula óssea que se encontram em multiplicação contínua. O DNA forasteiro funcionou normalmente, como se fosse nativo, em uma em cada quatro células: um resultado notável.

Acumulam-se também evidências de que a crotamina poderia estar ligada à defesa do organismo – e não só por ser parte de um veneno. Sua estrutura tridimensional é semelhante à da beta-defensina, uma proteína encontrada na saliva e no muco (do nariz, por exemplo) dos seres humanos e de outros animais. “Moléculas como essas fazem parte das primeiras defesas dos organismos”, conta Irina. De modo semelhante às beta-defensinas, a crotamina poderia integrar o sistema imune inato, que funciona intensamente durante

O PROJETO

Estudo do sistema de transporte mediado por peptídeos catiônicos

MODALIDADE

Linha Regular de Auxílio a Pesquisa

COORDENADOR

TETSUO YAMANE - IPEN

INVESTIMENTO

R\$ 65.649,56 (FAPESP)

a gestação e nos primeiros meses após o nascimento, enquanto o organismo ainda não produz anticorpos contra microorganismos. Portanto, as serpentes também usam algo de si, mas em quantidade maior, como veneno, para se defenderem: a glândula de veneno é uma glândula salivar modificada, lembra Mirian. Nem todas as *Crotalus durissus terrificus*, porém, produzem crotamina. Gandhi Rádís-Baptista verificou que todas têm o gene responsável pela produção da crotamina; algumas das representantes dessa espécie – de até 1,5 metro de comprimento e facilmente reconhecíveis pela cauda com guizo – produzem uma proteína com uma estrutura semelhante, chamada crotasina, de efeito ainda desconhecido.

Rádís-Baptista está agora na Universidade Federal de Pernambuco, cumprindo o que parece ser a sina dos participantes dessa história: não criar raízes ou, ao menos, partir logo para trabalhos ainda mais desafiadores. Mirian saiu do Butantan há um ano, pouco depois de Yamane, e está agora na Unifesp como professora de farmacologia; Vitor Oliveira deixou a universidade particular e voltou à Unifesp como professor de biofísica. Irina Kerkis saiu da USP e está agora no Butantan, enquanto Alexandre Kerkis trabalha agora em um laboratório de uma clínica médica. O bioquímico Fábio Nascimento, que executou os experimentos com os heparam-sulfatos, encontra-se hoje em uma empresa de biotecnologia na Suíça.

Incertezas à frente - Mesmo distantes, aparentemente não perderam o fôlego de trabalhar em conjunto em problemas que talvez não consigam resolver sozinhos. Extraída e purificada com destreza por Eduardo Oliveira na USP de Ribeirão Preto, a crotamina forma conjuntos de duas ou três unidades que reduzem sua capacidade de transportar moléculas. Evitar a formação desses agregados talvez seja mais difícil do que produzir uma versão sintética da crotamina, que evitaria a dependência da purificação do veneno de serpentes.

Embora com muito trabalho pela frente, os pesquisadores já negociam com empresas interessadas em usar trechos da crotamina como transportadores de genes. Em 2004 solicitaram a patente dos usos potenciais dessa molécula



EDUARDO CESAR

A *Crotalus*: esperança também contra parasitas como o da leishmaniose

la porque não querem repetir a história de outras moléculas descobertas por brasileiros que, por não terem sido patenteadas nem contarem com o apoio de empresas, foram incorporadas por outros grupos de pesquisa. Eles sabem que ter uma patente é apenas um dos requisitos para iniciar o longo caminho de desenvolvimento de um fármaco.

Mais à frente, se os próximos testes de laboratório confirmarem o potencial da crotamina, o grupo terá outro desafio: produzir a molécula em maior quantidade – em escala piloto e, depois, em escala industrial –, de modo a facilitar as negociações com empresas ou ins-

tituições interessadas em fazer os testes finais, antes que a molécula se torne um medicamento ou um marcador para diagnósticos contra o câncer. “Quem tiver boas idéias pode entrar em contato”, diz Yamane. “Somos um grupo aberto.” Pouco a pouco, Yamane já atraiu outros grupos – da Alemanha, Polônia, Estados Unidos e Japão – para trabalhar com a crotamina. “Cada um pode contribuir; só assim a ciência avança”, diz, sem abdicar da ousadia que marcou sua carreira científica: “Linus Pauling sempre lembrava que, ao começar um trabalho, devemos pensar em como contribuir de modo original”. ■