

Tesina para optar por el título de Biólogo

**MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA
DE LA ACETILCOLINESTERASA
ERITROCITARIA BOVINA INDUCIDA POR
CAMBIOS EN SU AMBIENTE MOLECULAR.**

**CONTRIBUCIÓN AL DESARROLLO DE UN BIOSENSOR
PARA LA DETECCIÓN DE ANAPLASMOSIS BOVINA.**

por

Jeremías Dutto

Director: Dr. Eduardo Matías Clop

Co-directora: Dra. Anahí del Valle Turina

**Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Exactas
Físicas y Naturales. Cátedra de Química Biológica, Córdoba,
Argentina.**

**Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas
(CONICET), Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas
(IIBYT), Córdoba, Argentina**

Córdoba, Argentina

25 de marzo de 2019

Modulación de la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa eritrocitaria bovina inducida por cambios en su ambiente molecular.

Contribución al desarrollo de un biosensor para la detección de anaplasmosis bovina.

Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. Cátedra de Química Biológica, Córdoba, Argentina.

Tesinista Jeremías Dutto

Director Dr. Eduardo Matías Clop

Co-directora Dra. Anahí del Valle Turina

Calificación obtenida

.....
Dra. María Verónica Nolan

.....
Dra. María Paula Zunino

.....
Dra. Nilda Anahí Franchi

Agradecimientos

Con el riesgo de olvidar mencionar a alguien, quiero agradecer especialmente a todos los que me acompañaron en el desarrollo de este proceso:

A las instituciones que financiaron las investigaciones, el Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (CONICET-UNC) y la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la UNC.

Al Consejo Interuniversitario Nacional por otorgarme una beca de incentivo a la investigación científica.

A la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (UNC), a la Escuela de Biología, a la educación pública.

- A mis directores, Chicho y Anahí por todo lo que me enseñaron y por la paciencia que siempre me tuvieron.

- A todos los que forman parte del Laboratorio, con quienes compartí momentos increíbles, a Marieca por permitirme formar parte, a Iván, Meli, Milí y Nico que siempre me ayudaron y a todas las y los investigadores y CPAs.

- A mi familia por su apoyo incondicional.

- A todos mis compañeros y amigos de la facultad, especialmente a mi grupo el "Palan Palan", por tantos momentos vividos.

- A todos mis amigos y amigas externos a la facultad que siempre me acompañan.

ÍNDICE

RESUMEN.....	7
ABSTRACT	8
I.1. INTRODUCCIÓN	10
I.1.1. Acetilcolinesterasa, estructura y función	10
I.1.2. Proteínas asociadas a membranas.....	12
I.1.3. Terpenos.....	13
I.1.4. Anaplasmosis.....	15
I.1.5. Modelo de membrana (Filmes de Langmuir-Blodgett)	16
I.2. HIPÓTESIS.....	17
I.3. OBJETIVOS	17
I.3.1. Objetivos generales	17
I.3.2. Objetivos específicos	18
II. MATERIALES Y MÉTODOS	19
II.1. Purificación de MEB	19
II.2. Composición de las muestras	20
II.3. Ensayos de actividad enzimática utilizando MEB en suspensión y MTs.....	21
II.4. Anisotropía de fluorescencia de DPH y TMA-DPH	22
II.5. Análisis reológico de monocapas a partir MEB y terpenos.....	24
II.5.1. Preparación de Filmes de Langmuir.....	24
II.5.3. Cálculo de módulos de compresibilidad	25
II.5.4. Diferencia de potencial de superficie (ΔV)-área	26
II.5.5. Experimentos de penetración de los MT	26
II.6. Filmes de Langmuir-Blodgett y Langmuir-Schaefer.....	26
II.7. Caracterización topológica de los filmes	28
II.8. Experimentos utilizando dipalmitoil fosfatidil serina (dpPS).....	28
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
III.1. Caracterización de la muestra	30
III.2. Actividad enzimática de la AEB de “ghosts” en suspensión	31

III.2.1. Efectos de Cineol y Alcanfor en la actividad enzimática de AEB	32
III.3. Fluorescencia.....	38
III.4.1 Films de Langmuir	41
III.4.2. Capacidad de penetración de los terpenos.....	44
III.4.3 Topología del filme	46
III.5. Actividad enzimática de la AEB en monocapas transferidas por LS	48
III.6. Efecto de DPPS sobre la actividad de AEB.....	54
IV. CONCLUSIONES.....	58
V. BIBLIOGRAFÍA	62

Palabras Claves:

Acetilcolinesterasa Eritrocitaria Bovina; Membrana Eritrocitaria Bovina; Acetilcolina; Terpenos; Anaplasmosis Bovina, Alzheimer.

Abreviaturas:

A: Actividad / Anisotropía

ACH: Acetilcolina

ADPH: Anisotropía de DPH

AEB: Acetilcolinesterasa Eritrocitaria Bovina

ALC: Alcanfor

$A_{m\acute{a}x}$: Actividad máxima

$A_{m\acute{i}n}$: Actividad mínima

ATC: Acetilcolina

ATMA-DPH: Anisotropía de TMA-DPH

$B_{m\acute{a}x}$: Binding Máximo

BZD: Benzodiazepina

CIN: Cineol

dilC18: 1,1'-Dioctadecil-3,3',3'-Tetrametilindocarbocianina-5,5'-Acido Disulfónico

DPH: difenilhexatrieno

dpPS: 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina

DTNB: 5,5'-Dithiobis (ácido 2-nitrobenzoico) o reactivo de Ellman

GPI: Glycosyl Phosphatidyl Inositol (Glicosilfosfatidilinositol)

IC₅₀: Concentración inhibitoria cincuenta

K: Módulo de Compresibilidad

K_i: Constante de disociación

K_m: Constante de Michaelis-Menten

LB: Langmuir Blodgett

LSMEB: Film de Langmuir Schaefer de Membrana Eritrocitaria Bovina

LS: Langmuir Schaefer

MEB: Membrana Eritrocitaria Bovina

MT: Monoterpeno

P_{m/a}: Coeficiente de partición membrana/agua

PM-IRRAS: Polarization modulation-infrared reflection-adsorption spectroscopy

poPC: 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

R-GABA_A: Receptor ácido γ -aminobutírico tipo A

RPM: Revoluciones por minuto

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate (dodecilsulfato sódico o laurilsulfato sódico)

SUVs: Small Unilamellar Vesicles (Liposomas unilamelares pequeños)

TMA-DPH: trimetil amino difenilhexatrieno

V₀: Velocidad inicial

V_{máx}: Velocidad máxima

$\Delta\pi$: Diferencia entre la presión lateral final (con terpeno) e inicial (sin terpeno)

ΔV : Diferencia de Potencial de Superficie

ΔV -A: Diferencia de Voltaje vs Área

π -A: Presión lateral vs Área

RESUMEN

La Acetilcolinesterasa Eritrocitaria Bovina (AEB) es una enzima con anclaje tipo GPI que hidroliza acetilcolina sérica. El subsitio “aniónico” ubicado en el sitio activo determina su especificidad, orientando la colina del sustrato a través de interacciones electrostáticas. Dado que cambios en el entorno molecular de las enzimas con anclaje GPI afectan sus parámetros cinéticos y que los monoterpenos (MT) afectan el orden y la electrostática de las membranas, en el presente trabajo evaluamos el efecto de 1-8 cineol, CIN y alcanfor, ALC sobre la hidrólisis de acetiltiocolina (ATC, método de Ellman) catalizada por AEB presente en Membrana Eritrocitaria Bovina (MEB). Además, presentamos y evaluamos el uso de AEB como sensor para ser usado en diagnósticos, tales como el de la enfermedad bovina Anaplasmosis. La afinidad del complejo AEB-MEB en ausencia de MTs ($K_m=0,1$) fue significativamente afectado por CIN el cual resultó ser un potente inhibidor ($K_m=0,96$) en comparación con ALC ($K_m=0,11$) (Ambos a 0,3mM). Por otro lado, CIN exhibió una $IC_{50}=0,246$ mM mientras que la IC_{50} del ALC fue mucho mayor a 0,8 mM. Las mediciones de anisotropía de fluorescencia (A) de DPH y TMA-DPH en MEB, demostraron que CIN afecta la organización tanto de la región interna como la de los grupos polares de la bicapa (redujo aproximadamente un 1% de ADPH y ATMA-DPH a 0,3 mM) mientras que ALC apenas afectó. El efecto de los MTs sobre las isothermas de compresión presión lateral (π) y potencial de superficie (ΔV) vs Área sobre filmes de Langmuir también se estudió. En presencia de CIN, la transición encontrada en la isoterma π -A control se volvió menos cooperativa y el π_{colapso} disminuyó. A bajas π , las pendientes de ambas isothermas (π -A y ΔV -A) cambiaron, por ej. encontramos un $\Delta\Delta V \sim 10$ mV con respecto al control sin CIN. A altas π , la convergencia de las isothermas control y con CIN sugieren la expulsión de las moléculas del terpeno del film durante la compresión. ALC no produjo un gran efecto sobre ΔV , pero expandió ligeramente toda la isoterma π -A hasta el punto de colapso. El efecto de la actividad enzimática de AEB debido a la adición de fosfolípidos cargados también se estudió, considerando esto como un mecanismo indudable para disminuir la diferencia de potencial de superficie, resultando en una potente inhibición de la AEB. Concluyendo, la actividad inhibitoria de CIN sobre la AEB puede estar relacionada a su accionar sobre el orden y electrostática

de la membrana, lo cual puede interferir inespecíficamente con la interacción ATC-AEB en el sitio activo. El alcanfor mostró menos interacción con la membrana, pero su mecanismo inhibitorio está fuertemente influenciado por los cambios en su entorno y por ende en la conformación de la enzima. A través del análisis del biosensor obtenido, vimos que cambios del entorno molecular de AEB producidos por la transferencia al soporte sólido, lo cual produjo cambios de empaquetamiento, inmovilización de la enzima y cambios en el dipolo general de la monocapa, disminuyeron la $V_{m\acute{a}x}$ sin afectar la afinidad por el sustrato.

ABSTRACT

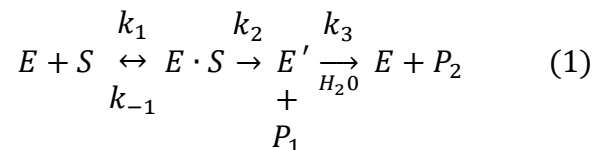
Bovine Erythrocyte Acetylcholinesterase (BEA) is a GPI-anchored enzyme that hydrolyzes seric acetylcholine. The 'anionic' subsite in the active site determines the specificity with respect to the choline moiety through electrostatic interactions. Since a) changes on the molecular environment of GPI-anchored enzymes affect their kinetic parameters and b) monoterpenes (MT) affects biomembranes order and electrostatics according to their dipole moment modulus and orientation, here we tested the effects of MTs (1-8 cineol, CIN and camphor, CAM) on the hydrolysis of acetylthiocholine (ATC, Ellman's method) catalyzed by BEA present in Bovine Erythrocyte Membrane (BEM). Also, we introduced and tested the use of the AEB as a sensor to be used on diagnostics, such the bovine disease anaplasmosis. The affinity of the BEA-ATC complex in the absence of MTs ($K_M=0.1$) was significantly affected by CIN which resulted a stronger inhibitor ($K_M= 0.96$) than CAM ($K_M=0.11$) (both at 0.3 mM). Moreover, CIN exhibited an $IC_{50}=0.246mM$ whereas the IC_{50} of CAM was $\gg 0.8$ mM. Measurements of the fluorescence anisotropy (A) of DPH and TMA-DPH in BEM, demonstrated that CIN affected the organization of the inner and the polar head group regions of the bilayer (reduced about a 1% the ADPH and ATMA-DPH at 0,3mM) whereas ALC barely affected. The effect of MTs on the lateral pressure (π) and surface potential (ΔV) vs Area compression isotherms in Langmuir films were also studied. In the presence of CIN, the transition found in the control π -A isotherm become less cooperative and the $\pi_{collapse}$ decreased. At low π , the slopes of both isotherms (π -A and ΔV -A) changed; e.g. we found

a $\Delta\Delta V \sim 10\text{mV}$ with respect to the control without CIN. At high π , CIN and control isotherms converged suggesting the CIN molecules expulsion from the film upon compression. CAM did not produce significant effects on ΔV , but expanded slightly the whole π -A isotherm upto the collapse point. The effect on BEA enzymatic activity by addition of charged phospholipids was also studied as an undoubted mechanism for decreasing the Surface Potential difference, resulting in a strong inhibition of the AEB. Concluding, the inhibitory activity of CIN on BEA may be related with its effect on the membrane order and electrostatics which may be interfering unspecifically with the BEA-ATC electrostatic interaction at the active site. Camphor showed less interaction with the membrane but its inhibitory mechanism is strongly sensitive to changes on the conformation of the enzyme. We saw it through the analysis of the biosensor, in which the changes on conformation of the enzyme modifies $V_{\text{m}\acute{\text{a}}\text{x}}$ without affecting the affinity for the substrate.

I.1. INTRODUCCIÓN

I.1.1. Acetilcolinesterasa, estructura y función

La Acetilcolinesterasa Eritrocitaria Bovina (AEB) pertenece al grupo de las hidrolasas (EC 3.1.1.7) y es una isoforma de la enzima acetilcolinesterasa presente en los terminales sinápticos, donde la principal función es regular la estimulación nerviosa degradando al neurotransmisor acetilcolina a colina y ácido acético. Las estructuras primarias de ambas enzimas son casi idénticas, aunque AEB posee una secuencia más corta en el extremo carboxílico. La AEB es una proteína homodimérica, conformada por dos subunidades catalíticas idénticas de unos 77 kDa cada una, unidas entre sí por puentes disulfuros [1]. Cada monómero se encuentra anclado a la membrana plasmática del eritrocito mediante un grupo glicosilfosfatidilinositol (GPI) unido covalentemente a su extremo carboxilo [2]. Pertenece al grupo de las hidrolasas de serina que, como la tripsina, poseen un sitio catalítico conformado por serina, histidina y un residuo ácido que en este caso es glutamato. La serina forma con el sustrato un intermediario acetil-acetilcolinesterasa liberando la colina al medio, posteriormente el intermediario acetil-enzima se hidroliza con la subsecuente liberación de acetato [3]. El mecanismo se encuentra representado por la siguiente fórmula [4]:



Donde S es acetilcolina, E es acetilcolinesterasa, E' es acetil-acetilcolinesterasa, P₁ es colina y P₂ es ácido acético.

Dicha tríada serina-histidina-glutamato, encargada de la catálisis, también se denomina subsitio “esterático”, el cual conforma el sitio activo junto con otro subsitio denominado “aniónico”. Este está formado por residuos aromáticos de triptófano, tirosina y fenilalanina y es clave por su participación en la orientación del sustrato catiónico.

La enzima presenta un fuerte dipolo electrostático que explicaría la gran velocidad catalítica, ya que podría actuar atrayendo al sustrato catiónico (a pH fisiológico) hacia el

sitio activo (fig. 1 a) que se encuentra en la base de una profunda “garganta” recubierta por aminoácidos aromáticos que evitan el contacto directo de la acetilcolina con las cargas aniónicas [5], restringen su movimiento una vez dentro de la enzima [6] y moldean el sitio de unión. Sin embargo, esta teoría es

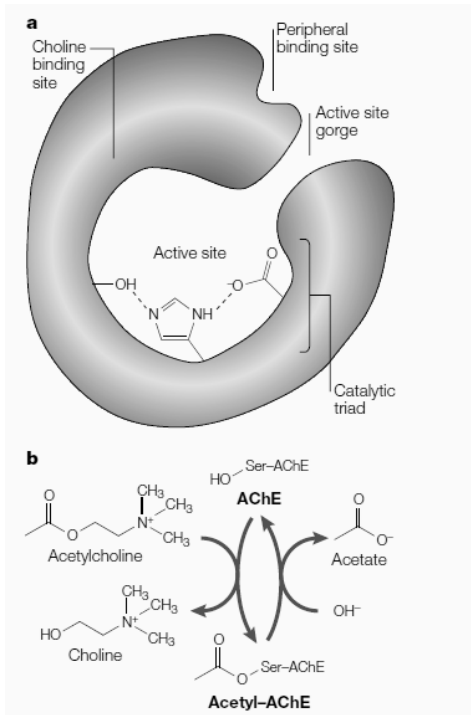


Figura 1. Esquema tomado de “Acetylcholinesterase — new roles for an old actor” de Hermona Soreq y Shlomo Seidman [3], donde se muestra el sitio activo de la enzima en la base de una estrecha “garganta”, según fue determinado por cristalografía con rayos x (a), y una representación del mecanismo de la AEB (b).

controvertida ya que investigaciones demostraron que cambios mutacionales que reducen la cantidad de residuos cargados negativamente no disminuirían significativamente su actividad [7], mientras que por otro lado se observó que la unión de ligandos catiónicos a un sitio periférico (fig. 1, a) disminuye la velocidad de reacción en el centro activo [8].

Este sitio periférico se encuentra a unos 20Å del sitio activo, en la superficie de la enzima cerca del borde de la “garganta”, y se ha postulado su participación en la inhibición por sustrato. Se propuso que la unión de la acetilcolina a este sitio produce una cadena de cambios conformaciones que se desplaza hasta el sitio catalítico, bloqueándolo. Mutantes para el residuo Y341, el cual participaría en esta transducción de la señal, presenta una inefectiva inhibición por sustrato[9].

Si bien la función de la AEB en la sangre continúa siendo desconocida, la acetilcolina cumple una importante función en la regulación del sistema inmunológico, por lo que la existencia de una enzima capaz de hidrolizar dicho neurotransmisor debería ser clave para mantener la homeostasis. Sustentando esta hipótesis, se ha visto que en enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple la actividad de esta enzima esta exacerbada al tiempo que se observan bajos niveles de acetilcolina en el suero [10].

I.1.2. Proteínas asociadas a membranas

Una proteína de membrana se encuentra inserta en un entorno molecular complejo. Es de esperar que cambios en la micro-viscosidad, curvatura, grado de empaquetamiento y organización dipolar de la membrana que la contiene modulen su actividad. Se ha visto que cambios en el entorno molecular de proteínas con anclaje tipo GPI, como la fosfatasa alcalina placentaria, afectan los parámetros cinéticos de la misma [11]. Resultados recientes sobre la actividad de AEB presente en membranas purificadas de eritrocitos bovinos (MEB) muestran cambios en los parámetros cinéticos inducidos en respuesta a cambios de curvatura y empaquetamiento molecular [12]. También se sabe que cambios en la membrana inducidos por detergentes o eventos fisiológicos como el estrés, pueden modular proteínas transmembrana como es el receptor $GABA_A$, modificando la exposición del sitio para benzodiazepinas aumentando la $B_{máx}$ [13]. Por otro lado, un monoterpeno como el timol, es capaz de modificar la topología de la membrana, producir un incremento en su polaridad y, por encima de su concentración micelar crítica, aumentar la unión del ligando flunitrazepam al receptor $GABA_A$ sin aumentar $B_{máx}$ [14].

Estos antecedentes permiten postular que cambios en el entorno de la AEB podrían modular su funcionamiento. De ser así, el estudio de esta modulación, mediante la medición de la actividad catalítica de la enzima, permitiría inferir acerca del estado del sistema, permitiendo detectar la presencia de tóxicos, patógenos y también explorar nuevas drogas capaces de inhibir la enzima de manera inespecífica con fines medicinales. Dada la gran cercanía que existe entre la AEB y la membrana celular, cambios en la diferencia de potencial a ambos lados de la misma deberían afectar

considerablemente al dipolo de la enzima (ubicada exclusivamente en la hemicapa externa[15]) con consecuencias en su actividad, pudiendo afectar tanto la velocidad de reacción (debido a una menor atracción del sustrato hacia el sitio activo), como la afinidad, ya que la estrecha unión esta moldeada por las cargas existentes.

I.1.3. Terpenos

Desde los comienzos de la humanidad, diferentes culturas han utilizado los productos naturales que obtenían para tratar distintas afecciones. Entre estos extractos, los aceites esenciales son ampliamente utilizados en la medicina por la amplia gama de propiedades que poseen, son claves en la aromaterapia por su volatilidad y riqueza en aromas, son muy usados como bálsamos y pomadas de uso tópico debido a su gran liposolubilidad y capacidad para ser absorbidos a través de la piel. Las moléculas de monoterpenos (MT) son esqueletos hidrocarbonados de 10 carbonos constituidos por unidades de isopreno con uniones cabeza-cola; constituyen el componente principal de los aceites esenciales de plantas y muchos de los efectos atribuidos a hierbas medicinales han sido relacionados con la presencia de estos compuestos [16].

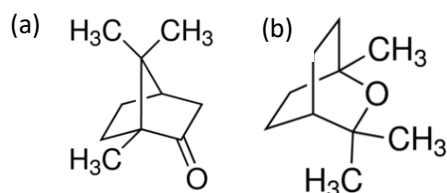


Figura 2. Estructura molecular del alcanfor, una cetona bicíclica (a) y del 1,8-cineol, un éter bicíclico (b).

El alcanfor (fig. 2, a), se extrae principalmente de *Cinnamomum camphora* y es muy utilizado como analgésico tópico, expectorante, descongestivo nasal, antiespasmódico, antiinflamatorio y muchos estudios han demostrado su eficiencia en el tratamiento y prevención del cáncer [17]. El eucaliptol (fig. 2, b) o 1,8-cineol, es el principal MT en el aceite esencial de *Eucalyptus* sp., se ha usado en medicina tradicional como secretolítico para tratar bronquitis, sinusitis y resfríos, también es un potencial antiinflamatorio por inhibir la ciclooxigenasa y se ha visto que es muy eficiente para el tratamiento del asma

[18]. En Alemania está registrado como producto medicinal y se encuentra disponible en cápsulas que contienen 100 mg de cineol [18].

Al analizar la estructura química de los MT, es esperable que estos compuestos muestren un comportamiento anfipático o hidrofóbico. Dado que tienden a particionar desde la fase acuosa hacia las membranas, logran afectar la organización estructural de las mismas [19, 20]. En trabajos previos de nuestro laboratorio donde se estudió la capacidad de una serie de MT para afectar la organización de membranas naturales de cerebro bovino, se demostró que cineol y alcanfor son capaces de desordenar dichas membranas con un efecto más marcado en la región de las cadenas hidrocarbonadas, induciendo además un aumento en la exposición de sitios de unión de ligando del R-GABA_A[21]. Si bien, ambos presentan una estructura globular, difieren en la magnitud de sus momentos dipolares (alcanfor= 2,52 Debye y cineol= 1,4 Debye) lo cual le confiere a la interfase en la que se particionan distintas propiedades electrostáticas[22].

Debido a su gran liposolubilidad, los MT poseen una muy buena absorción dérmica. Para el cineol, se ha determinado el pico de concentración en plasma a los 10 min y una rápida eliminación a través de orina [23].

La aplicación que podrían tener estos MT en medicina es realmente considerable, el mal de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa con una incidencia alta en la sociedad, y es cada vez más conspicuo debido al aumento en la esperanza de vida. Los principales tratamientos de esta enfermedad están dirigidos a inhibir la acetilcolinesterasa para lograr aumentar los niveles de acetilcolina en el cerebro y mejorar las funciones cognitivas de los pacientes; por otro lado, se busca evitar la formación de las placas seniles o destruirlas, existe evidencia de que la acetilcolinesterasa promueve el ensamble de fibras amiloides y que el mismo puede ser inhibido mediante drogas que se unen al sitio periférico de la enzima [24]. Los medicamentos inhibidores del sitio activo de la enzima producen varios efectos adversos [25] por lo que se han estudiado muchos MT como alternativa. Mediante el método de acoplamiento molecular o docking, un estudio reveló posibles candidatos para la inhibición de la acetilcolinesterasa y la agregación de beta-amiloide. Entre ellos se estudió el alcanfor y cineol que no resultaron ser muy buenos inhibidores ($K_i(\text{alcanfor})=29,38$; $K_i(\text{eucaliptol})=40,04$) comparado con galantamina ($K_i=0,74$) que

es un inhibidor conocido, además en el caso del alcanfor se vio una muy buena capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica [26]. El 1,8-cineol también es un muy buen candidato para distribuirse en los distintos compartimientos del organismo, especialmente el sistema nervioso, se demostró que la inhalación de 1,8-cineol proveniente del aceite esencial de romero es un estimulante de la actividad locomotora de ratones[27].

Otros estudios demostraron cierta inhibición de la AEB por parte de estos MT, también se analizó que la misma sería del tipo no competitiva, lo que podría significar que su acción no es específica, apoyando la hipótesis de que los terpenos pueden regular la actividad de la enzima mediante la modificación del entorno [28-30].

Por otro lado, los terpenos son una herramienta potencial en el control de plagas debido a su baja toxicidad ambiental y en mamíferos, gran liposolubilidad y baja presión de vapor[31]. Esta última característica los hace buenos candidatos como fumigantes para controlar las plagas de granos almacenados[32]. Muchos estudios han demostrado el efecto insecticida tanto del alcanfor y del cineol y su correlación con el efecto que ejercen sobre la acetilcolinesterasa[31-34].

I.1.4. Anaplasmosis

Anaplasma marginale es un parásito intracelular obligado (bacteria del orden Rickettsiales [35]), que se transmite principalmente por garrapatas [36]. La Anaplasmosis, se distribuye en áreas tropicales y subtropicales en todo el mundo siendo una de las principales infecciones que restringen la producción de ganado vacuno. *A. marginale*, en contraste con *A. phagocytophilum* tiene un rango de hospedadores muy específico, infectando sólo a rumiantes, principalmente ganado vacuno [36].

El único sitio conocido de infección in-vivo por *A. marginale* en bovinos son los eritrocitos [37, 38]. El microorganismo, una vez dentro del torrente sanguíneo, penetra al glóbulo rojo por endocitosis, formando una vacuola alrededor de *Anaplasma*. Los eritrocitos infectados son posteriormente fagocitados por las células reticuloendoteliales, dando como resultado el desarrollo de una anemia de leve a severa e ictericia sin hemoglobinemia y hemoglobinuria. Los síntomas clínicos pueden incluir fiebre, pérdida

de peso, el aborto, letargia, ictericia, y con frecuencia muerte en los animales mayores de 2 años [35]. Existen antecedentes que indican una importante disminución de la actividad de acetilcolinesterasa eritrocitaria bovina a partir de la inoculación de *A. marginale* en bovinos [39].

I.1.5. Modelo de membrana (Filmes de Langmuir-Blodgett)

Los filmes de Langmuir Blodgett (LB) constituyen un modelo de membrana que permite modificar de manera controlada el entorno molecular de las proteínas. La construcción de un filme LB consiste en la transferencia vertical a un soporte sólido de una capa monomolecular auto-organizada en la interfase agua-aire (con topología plana constante y grado de empaquetamiento molecular controlado [40]) conservando la organización molecular de la monocapa flotante inicial [41-43]. Si el filme LB se construye a partir de una monocapa de una membrana natural, es posible estudiar la modulación que el entorno molecular ejerce sobre las proteínas presentes en dicha membrana. Una variante a los filmes LB son los denominados filmes de Langmuir-Schaefer (LS) donde la deposición de la monocapa se realiza de manera horizontal no necesitando sumergir el soporte sólido en la subfase.

Por otra parte, el desarrollo de una superficie funcionalizada, que implica la inmovilización de biomoléculas en una superficie sólida, es un área en gran crecimiento para el desarrollo de biosensores [44-47]. Los filmes LB presentan la ventaja de permitir la transferencia de estructuras supramoleculares que sólo pueden obtenerse en medios acuosos [45]. En nuestro laboratorio se han desarrollado superficies funcionalizadas con membranas sinaptosomales bovinas que contienen al receptor GABA_A, con una alquil-BZD para aplicarse a procesos de purificación basados en la combinación de precipitación y afinidad [48-50] y con enzimas [11, 51, 52] como la fosfatasa alcalina placentaria que también se ancla a la membrana por medio de un grupo GPI [53].

En el presente trabajo se estudiará el efecto sobre la actividad de la AEB de dos MT, alcanfor y 1,8-cineol, cuando la enzima se encuentra en suspensión y en filmes LS.

En base a nuestra experiencia sobre el efecto del entorno molecular sobre la actividad de enzimas ancladas por enlace GPI [11] proponemos que modificaciones en la dinámica de la membrana celular tales como las causadas por la interacción membrana-parásito (que se producen durante el proceso de internalización de *A. marginale*) podría ser detectado y sentido por la acetilcolinesterasa eritrocitaria bovina, expresado como cambios en la actividad enzimática, siendo ésta la base para postular un potencial biosensor basado en esta enzima.

I.2. HIPÓTESIS

Dada la naturaleza electroestática de la interacción de la acetilcolina con el sitio activo de la acetilcolinesterasa, es esperable que una modificación en el ambiente dipolar de la membrana producido por el agregado de terpenos sea capaz de ser sentido a través de los parámetros cinéticos de AEB.

La obtención de una superficie funcionalizada con acetilcolinesterasa eritrocitaria bovina (AEB) permite sentir cambios en la actividad enzimática de la misma, inducidos por moduladores de membrana eritrocitaria bovina (MEB).

I.3. OBJETIVOS

I.3.1. Objetivos generales

- Evaluar el efecto de la modulación de la organización molecular y dipolar de membranas eritrocitarias bovinas (MEB) inducido por la partición de pequeñas moléculas (MT de coeficiente de partición y momento dipolar conocidos) y su correlación con la actividad de proteínas ancladas en MEB, tomando AEB como modelo.
- Establecer las bases para el desarrollo de un biosensor para *A. marginale* basado en MEB conteniendo AEB como sonda capaz de detectar cambios en la dinámica de su entorno molecular inducidos por la unión/adsorción del parásito.

I.3.2. Objetivos específicos

- Preparar las MEB a partir de glóbulos rojos y caracterizar parámetros de fluidez, hidratación y de orden de las suspensiones de membrana en presencia de los MT.
- Preparar y caracterizar química, reológica y topográficamente, las capas monomoleculares obtenidas a partir de MEB en la interfase agua-aire en presencia de MT y su posterior transferencia para preparar filmes Langmuir-Schaefer (LSMEB).
- Caracterizar la modulación de la actividad catalítica de la AEB tanto en filmes LSMEB, como en las MEB en suspensión en presencia de MT.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Purificación de MEB

La sangre de ganado vacuno se obtuvo por punción en vena y posterior recolección en una bolsa de extracción estéril en presencia de anticoagulantes y dextrosa monohidrato. La extracción fue realizada por un profesional veterinario*.

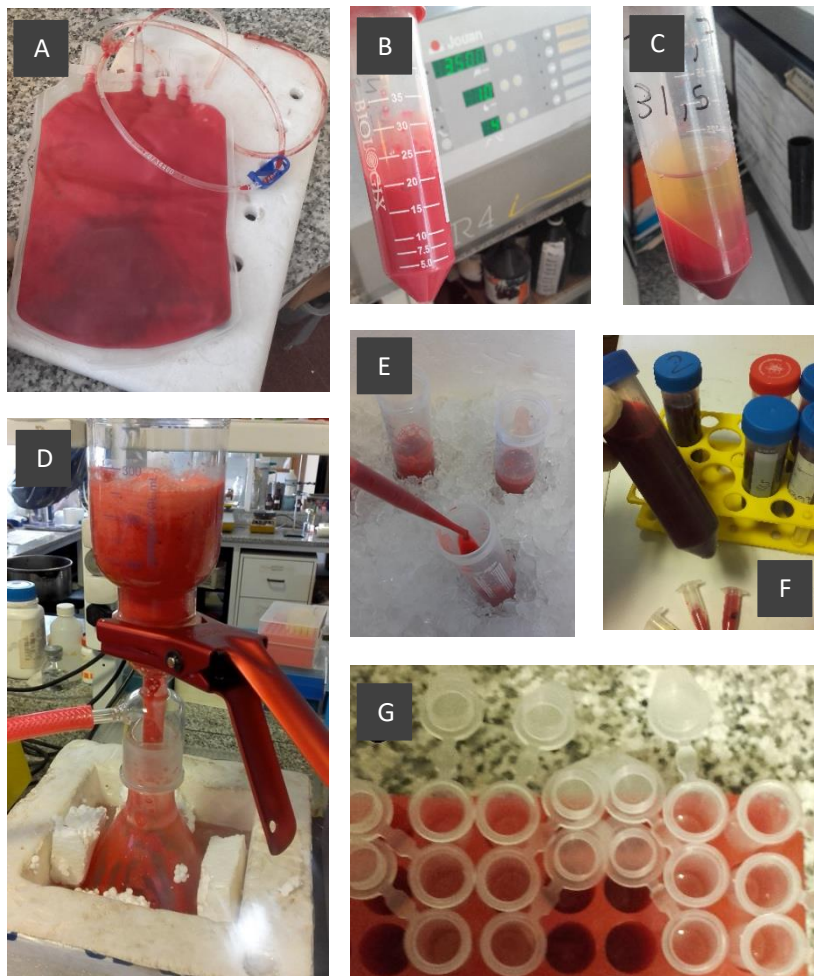


Figura 3. Fotografías del proceso de purificación de las MEB. Sangre obtenida en una bolsa de extracción estéril (a); tubo tipo "falcon" con sangre, previo a ser centrifugado (b); tubo tipo "falcon" una vez centrifugado mostrando las distintas fracciones de la sangre (c); filtrado a través de celulosa en polvo usando un kit de filtración Millipore asociado a una bomba de vacío (d); Los glóbulos rojos concentrados se fraccionaron en tubos tipo "falcon", en frío (e); Agregado del *buffer* de lisis (f); Fraccionamiento en tubos tipo "ependorf" previo al almacenamiento a -20°C (g).

*Agradecemos la valiosa colaboración del Médico Veterinario Jorge Carcedo, profesor de la Catedra de Mejoramiento Animal de la Facultad de Agronomía, UNC.

Como primera medida el plasma se separó por centrifugación a 3500 rpm (1500 g) por 10 min a 4°C (fig. 3, c), utilizando una centrífuga marca Jouan Br4i. Se aspiró el mismo junto con la delgada zona que contiene los glóbulos blancos (“*buffy coat*”). Este procedimiento se repitió tres veces, lavando la fase de glóbulos rojos en condiciones isotónicas con buffer fosfato sódico 5mM, ClNa 154,5mM, ClK 4,5mM, pH 7,4.

Finalmente, dicha fase se filtró, manteniendo en frío, a través de celulosa en polvo usando un kit de filtración Millipore asociado a una bomba de vacío (fig. 3, d) para eliminar los glóbulos blancos que pudieran haber quedado, los cuales son retenidos por la celulosa. Mediante una última centrifugación, a 4500 rpm (2500 g), se obtuvieron los eritrocitos concentrados “*packed*”. Los eritrocitos fueron resuspendidos en condiciones hipotónicas en buffer fosfato 5 mM, pH 8 con el objetivo de lisar las células (fig.3, f) y se realizaron sucesivas centrifugaciones a 10.000 rpm (12500 g) durante 40 min, hasta obtener un “*pellet*” libre de hemoglobina, en donde se encuentran las membranas aisladas (“*ghost*”) [54]. Finalmente, se fraccionaron y congelaron las membranas obtenidas (fig. 3, g).

II.2. Composición de las muestras

Se liofilizaron tres muestras de 0,5ml cada una para conocer la concentración de membrana promedio, además se cuantificó la cantidad de proteínas y fosfato para conocer la relación fosfolípidos/proteínas y se observaron las muestras al microscopio óptico para determinar la calidad de las membranas obtenidas.

La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Lowry [55], una técnica fotométrica que se basa en la formación de enlaces de coordinación entre el nitrógeno de los enlaces peptídicos y el ion cobre (II) y la consecuente reducción del reactivo Folin-Ciocalteu a un compuesto coloreado cuya absorbancia se mide a 750nm. Se realizó una curva testigo utilizando distintas concentraciones de albúmina sérica bovina y se cuantificaron tres diluciones de la muestra, todo por triplicado, en una placa de 96 wells. Para esto se agregó en cada pocillo 10µl de la muestra y 100µl de EDTA-CU⁺⁺, luego de 30 minutos se agregó 10 µl del reactivo Folin-Ciocalteu diluido 1:1 con agua bidestilada. Luego de 1 hora se midió la absorbancia a 750nm.

La cuantificación de fosfolípidos se infirió de la concentración de fosfato de la muestra de membrana. La cuantificación de fosfato presentó cierta complicación debido a que las muestras se encontraban en un buffer que poseía dicho elemento, por lo que se debió realizar blancos extras para restar dicha cantidad de fosfato al presente en los fosfolípidos de las membranas. Se utilizó el método de Fiske y Subbarow [56] con modificaciones, el fundamento de esta técnica es la formación en medio ácido de un compuesto entre el ion molibdato y el fósforo inorgánico que luego se reduce produciendo un compuesto coloreado medible fotométricamente. Las muestras a cuantificar se secaron y se les agregó 0,1ml de ácido perclórico, luego se quemaron a 200°C durante dos horas. Posteriormente se agregó a cada tubo una mezcla conteniendo 1,75ml de agua bidestilada, 0,225 ml de ácido perclórico y 0,25 ml de molibdato de amonio (2,5% P/V). Luego de 1 hora se agregó 0,25ml de ácido ascórbico (10% P/V) y se llevaron los tubos a baño maría durante 5 minutos, finalmente se midió la absorbancia de las muestras a 340nm. Para el cálculo de la relación proteína/fosfolípido se estimó una concentración P/V de fosfolípido a partir de la concentración molar de fosfato asumiendo un peso molecular promedio de 750 gr/mol.

II.3. Ensayos de actividad enzimática utilizando MEB en suspensión y MTs.

Todos los ensayos de actividad enzimática se realizaron siguiendo el protocolo de Ellman [57], con algunas modificaciones. Se cuantificó el producto de la hidrólisis de acetiltiocolina en tiocolina y acetato, acoplado a la reacción del tiol con el ácido ditiobisnitrobenzoico (DTNB 2mM), para producir un anión de color amarillo, en presencia de buffer fosfato 0,1 M, pH 8. En este caso la fuente de enzima fue una dilución de la suspensión de membranas eritrocitarias (“ghosts”). Se realizaron ensayos para determinar la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) de cineol y alcanfor y posteriormente ensayos para determinar el tipo de inhibición utilizando el modelo de Michaelis-Menten. Para este

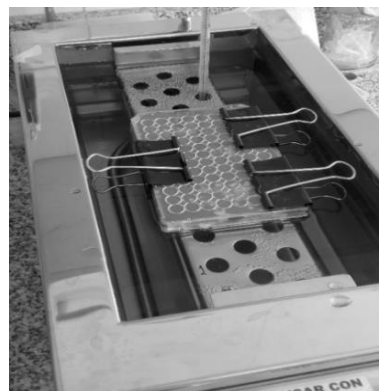


Figura 4. Sistema de incubación consistente de una placa de 96 “wells” parcialmente sumergida en un baño termostatzado a 37°C. Cada pocillo se encuentra sellado con una lámina de silicona para evitar la evaporación del MT.

ensayo fue necesario realizar previamente curvas de tiempo y enzima para elegir los valores apropiados de estas variables. Según los supuestos del modelo de Michaelis y Menten, es imprescindible que el tiempo de la reacción y la dilución de la enzima usada permitan estar en condiciones de velocidad inicial y que no se haya consumido más del 5% del sustrato. Se incubó a 37°C en un baño termostatzado y se cuantificó el producto formado ($[\epsilon]=13.600\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) utilizando un espectrofotómetro de Thermo Scientific midiendo la Absorbancia a 412 nm.

El valor de IC_{50} fue determinado para obtener la concentración de trabajo donde los MT ejercen algún efecto significativo sobre la actividad, para aplicar en los siguientes experimentos. Se calculó a partir de los valores de % de actividad vs log de la concentración de MT (μM). Los datos se ajustaron a una ecuación sigmoidea. El valor de IC_{50} fue aquel valor de concentración de MT que indujo una disminución del 50% de la actividad.

II.4. Anisotropía de fluorescencia de DPH y TMA-DPH

A la suspensión de MEB se le incorporó 1,6-Difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) o 1-(4-trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene p-toluenesulfonate (TMA-DPH) con el objetivo de marcar diferentes regiones de la membrana y estudiar la organización molecular en el entorno de estas sondas, midiendo la anisotropía de fluorescencia en presencia y ausencia de MT.

Se prepararon muestras diluidas de forma tal, que la absorbancia de la muestra a 356nm (la longitud de onda de excitación) no superara 0,1 a fin de evitar el artefacto de la dispersión de la luz en las mediciones [58], resultando la concentración de proteínas 0,045mg/ml. Con todos los controles realizados esta dilución coincidió con la de los experimentos de inhibición de la actividad de la AEB lo cual fue importante para poder comparar.

Posteriormente se procedió a incubar las muestras con las sondas fluorescentes durante 3 horas. Las sondas (DPH 0,86mM y TMA-DPH 1,66mM) se depositaron en las muestras mediante una jeringa Hamilton y se homogeneizó agitando, usando un vortex y un baño

ultrasónico durante 15 minutos. La concentración final fue de 0,45µM, aproximadamente 0,77% de sonda por mol estimado de fosfolípido en membrana.

Los primeros experimentos de fluorescencia se realizaron utilizando las MEB en suspensión, sin embargo, cada medición presentaba mucho error. Esto podría haber sido, o bien por el gran tamaño de las vesículas (células vacías) o por la gran heterogeneidad en los tamaños de las mismas. Por esta razón se procedió a sonicar las muestras durante 15min, utilizando un sonicador “Ultrasonic Homogenizer” modelo 150 VT, para transformar las MEB en vesículas unilamelares pequeñas y aumentar la homogeneidad de la muestra. Este procedimiento, si bien podría estar cambiando algunos aspectos físicos de la membrana tales como la curvatura, la composición no debería verse afectada.

Se analizaron muestras con concentraciones crecientes de terpeno en el espectrofluorómetro FluoroLog (Horiba Scientific) utilizando micro-cubetas y un volumen final de 250µl. Un volumen de 4µl de la solución con terpeno se agregó al volumen de membrana en la cubeta, con una pipeta automática utilizando un tip de punta larga para garantizar el correcto homogeneizado de los mismos. Se respetó la misma concentración de etanol (el solvente) utilizada en los otros experimentos. Las muestras se mantuvieron a 37°C mientras que los terpenos se mantuvieron en frío hasta su uso, para evitar la evaporación de los mismos y la modificación de la concentración de la solución madre.

Se realizaron espectros de fluorescencia para analizar la intensidad y posición de los picos característicos de las sondas, así como el pico de luz dispersada “*light scattering*” para determinar el cambio de tamaño de las vesículas [58]. La anisotropía se calculó a una longitud de onda de excitación de 356nm. La intensidad de fluorescencia se determinó con los polarizadores (de excitación y de emisión) orientados de manera paralela o perpendicular entre sí. El ancho de las ranuras de excitación y de emisión se fijó en 2 nm. La anisotropía de fluorescencia (A) se calculó según Lakowics [59]:

$$A = \frac{VV - VH.G}{VV + 2.VH.G} \quad (2)$$

$$G = \frac{HV}{HH} \quad (3)$$

Donde VV, HH, VH y HV son los valores de las diferentes mediciones de intensidad de fluorescencia tomadas con ambos polarizadores orientados de manera vertical (VV) y horizontal (HH) o con el polarizador de excitación en posición vertical y el polarizador de emisión en posición horizontal (VH) o viceversa. G es un factor de corrección para las diferencias de sensibilidad en el sistema de detección de la luz polarizada horizontal y verticalmente.

II.5. Análisis reológico de monocapas a partir MEB y terpenos

II.5.1. Preparación de Filmes de Langmuir

Para la preparación de las monocapas (Filmes de Langmuir) a partir de MEB, se utilizó un equipamiento de KSV Instruments Ltd. La suspensión de membranas se dispersó sobre la interfase agua-aire según el método del Verger y Pattus [60], la siembra se realizó utilizando una varilla de vidrio con la punta redonda apenas sumergida en la subfase. La suspensión de membranas desciende por la varilla, goteando a una velocidad de 0.025ml/min, hasta llegar a la interfase. De esta forma, las vesículas al llegar a la fase acuosa se expanden en la superficie de alguna manera no muy bien conocida.

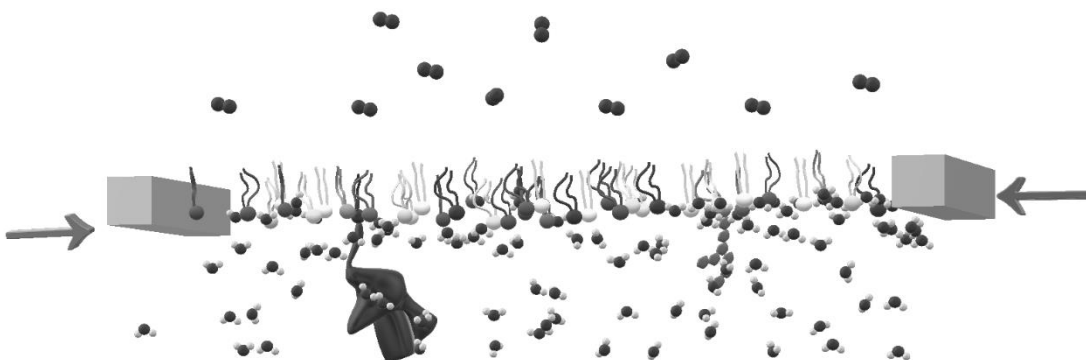


Figura 5. Esquema representando una monocapa de MEB flotando en la interfase agua-aire que está siendo comprimida por las barreras a los costados.

II.5.2. Isotermas de compresión presión-área

Luego de la siembra, el film de Langmuir formado se dejó unos 30 min para que se estabilizara. Posteriormente se inyectaron los terpenos (o etanol como control) en la subfase utilizando una pipeta automática y un tip alargado para perturbar lo menos posible a la monocapa, nuevamente se dejó estabilizar el film por unos minutos. Se obtuvieron las isotermas a 25°C, comprimiendo la interfase agua-aire mediante dos barras de teflón dispuestas simétricamente, a una velocidad constante de 5 mm/min, y midiendo la presión lateral de superficie (π) por el método de la placa de Wilhelmy [11]. La concentración de MT usada en estos ensayos se eligió respetando la IC₅₀ obtenida en los experimentos de actividad enzimática, pero garantizando la misma concentración de MT en la membrana eritrocitaria. Para esto se recurrió a los coeficientes de partición ($P_{m/a}$) del alcanfor (9772,4) y del cineol (2344,2) entre vesículas multilamelares de poPC y agua obtenidos por Turina et al. [19] y se calculó la concentración total de MT mediante la ecuación:

$$P = \frac{(n_m(s)/V_m)}{(n_w(s)/V_w)} \quad (4)$$

II.5.3. Cálculo de módulos de compresibilidad

A partir de las isotermas π vs Área, utilizando el software SigmaPlot, se calculó el Módulo de compresibilidad (K) según la ecuación 5. Luego, se graficó K en función del Área. El valor de K da una idea de la elasticidad de la membrana en cada transición de estado.

$$K = -A \left(\frac{d\pi}{dA} \right)_T \quad (5)$$

Al trabajar con membranas naturales no se evidencian de la misma manera las típicas transiciones de fase de las membranas modelo, formadas a partir de lípidos puros dispersados en la interfase por un solvente apolar, por este motivo el análisis de K es un buen indicador de los cambios que sufre la monocapa durante su compresión.

II.5.4. Diferencia de potencial de superficie (ΔV)-área

La medición del potencial de superficie se realizó durante la compresión de los films de Langmuir descrita anteriormente, mediante un potenciómetro de superficie KSV SPOT. El electrodo superior se coloca a unos milímetros de la superficie de la subfase (en el aire), está programado para vibrar aproximadamente a 150 Hz. El electrodo inferior consiste de una placa de platino sumergida que se apoya en la base de la cuba.

II.5.5. Experimentos de penetración de los MT

Para determinar la estabilidad de los MT en la interfase realizamos experimentos de adsorción interfacial. Estos experimentos permiten determinar, para cada MT, el valor de presión lateral máxima de la monocapa hasta la que pueden penetrar los MT inyectados en la subfase. Esta presión se denomina $\pi_{\text{cut-off}}$.

Se utilizó una cuba circular y de teflón, con 4,5 cm de diámetro y 0,5 cm de profundidad. Se sembró la MEB hasta obtener la presión deseada, una vez estabilizada la monocapa y obtenida la línea de base (π_{inicial} constante), los MT en solución etanólica se inyectaron en la subfase (9ml). Durante todo el experimento la homogeneidad de la subfase se mantuvo por agitación magnética. La concentración final de los MT en la subfase se eligió y calculó como se explicó anteriormente, utilizando la ecuación 4. La concentración de los MT en la membrana se obtuvo para un promedio del volumen sembrado en estos experimentos.

II.6. Filmes de Langmuir-Blodgett y Langmuir-Schaefer

Para poder realizar ensayos de actividad enzimática con la AEB presente en la monocapa, los filmes de Langmuir de MEB fueron transferidos a una π constante de 35mN/m a un soporte sólido hidrofóbico (fig. 6). La transferencia se realizó mediante la técnica de deposición horizontal o de Langmuir-Schaefer (LS). Los filmes LS se conservaron a 4°C, en ambiente húmedo hasta ser usados como fuente de enzima [61] (fig. 7). Para la preparación de los soportes hidrofóbicos se utilizaron vidrios de 9x6 cm y cubreobjetos de 24x24 mm, silanizados de acuerdo al método de VonTscherner y McConnell, 1981 [62]. Para cuantificar la cantidad de proteína presente en estos vidrios, se obtuvieron seis cubreobjetos mediante el método de Langmuir Blodgett (LB), los cuales se transfirieron en sus dos caras, a una velocidad de 5mm/minuto, mientras eran sumergidos de manera perpendicular a la superficie del agua. Luego se aspiró todo el líquido del trough y se recuperaron los vidrios, los cuales para ser cuantificados mediante la técnica de Lowry descrita anteriormente se rompieron hasta obtener pedazos muy pequeños que fueran cubiertos en su totalidad por 500ul del reactivo EDTA-Cu⁺⁺ con el agregado de un 3% P/V de SDS. Además, la mezcla fue sonicada por media hora para favorecer la liberación de las proteínas desde la superficie del vidrio.

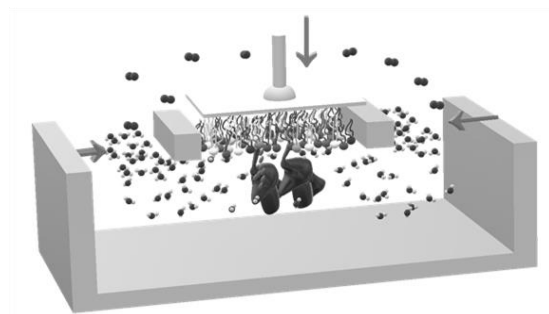


Figura 6. Esquema donde se representa un film de Langmuir comprimido hasta la presión preestablecida, a punto de ser transferido a un vidrio hidrofóbico (film de Langmuir-Schaefer) previamente silanizado.

II.7 Caracterización topológica de los filmes

Los filmes de Langmuir tanto como los filmes LS formados a partir de ellos fueron observados mediante microscopía de epifluorescencia, utilizando un microscopio de fluorescencia invertido Nikon Eclipse TE-U 2000 con una platina modificada para poder montar el equipo de monocapas. Los filmes fueron marcados con dilC18 (1,1'-Dioctadecil-3,3,3',3'-Tetrametilindocarbocianina-5,5'-Acido Disulfonico) como sonda fluorescente, la cual es capaz de particionarse en dominios fluidos de la interfase lipídica [63].



Figura 7. Fotografía que muestra el sistema utilizado para medir la actividad de la AEB una vez transferida al soporte de vidrio.

II.8. Experimentos utilizando dipalmitoil fosfatidil serina (dpPS)

Para evaluar los efectos en la actividad de la AEB inducidos por cambios en la diferencia de potencial de la membrana, se prepararon, analizaron y transfirieron monocapas de MEB con el agregado del lípido aniónico dipalmitoil-fosfatidilserina (dpPS). De esta forma pudimos modificar la diferencia de potencial sin depender del efecto no tan claro de los terpenos. Se prepararon soluciones de dpPS utilizando metanol como solvente (3,8mg/ml). Utilizando una jeringa Hamilton de 5 μ l se introdujo 1 μ l de esta solución por cada 10 μ l de membranas (7% de dpPS), luego de ser homogeneizadas se incubaron durante 4h, posteriormente se diluyeron y utilizaron como fuente de enzima en suspensión para medir actividad enzimática.

Las MEB enriquecidas con dpPS fueron sembradas en la interfase agua-aire para obtener isoterms de compresión π vs Área y ΔV vs Área. La única diferencia fue que, para evitar un posible efecto inhibitorio del metanol sobre la AEB, se introdujo 1 μ l de la solución de

dpPS por cada 100 μ l de membranas. Las monocapas con dpPS también se transfirieron a un soporte sólido para medir actividad de la AEB, este experimento permitió garantizar que el lípido con carga negativa estuviera formando parte del ambiente molecular de la enzima, evitando cualquier posible inhibición por actuar sobre el sitio activo.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1 Caracterización de la muestra

Las muestras de membrana eritrocitaria bovina (MEB) fueron observadas por microscopía de transmisión para evaluar el estado físico de las membranas. En la figura 8A, podemos observar mediante un simple extendido de una gota de la suspensión de las MEB, que se observan algunas vesículas eritrocíticas aisladas junto con acúmulos de membrana, que surgen de la fusión de varias vesículas.

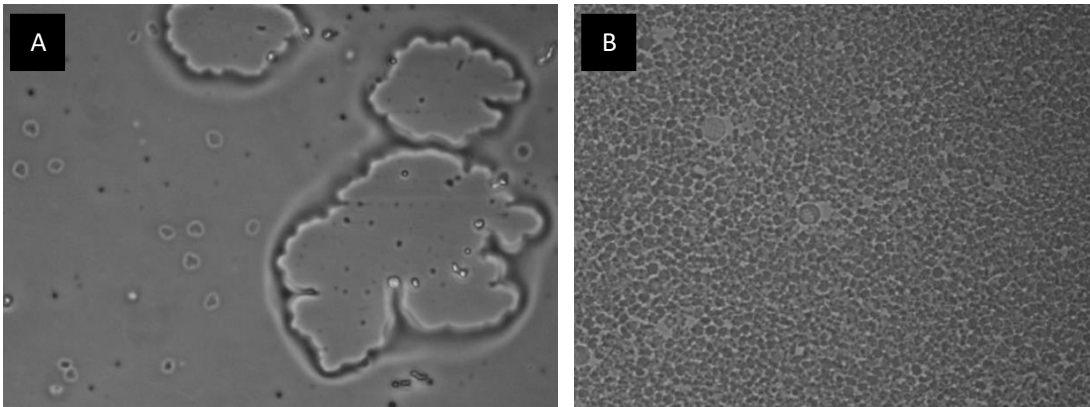


Figura 8. Fotografías obtenidas mediante microscopía de transmisión (40x). Frotis de las membranas de eritrocitos purificadas (a). Sangre antes de ser purificada, en suspensión (b).

Tabla 1. Composición de las membranas obtenidas. Concentración de membrana, fosfolípidos y proteínas en las muestras obtenidas y la relación mg de proteínas/mg de membrana.

<u>Concentración de membrana en las muestras</u> (Calculado a partir de la masa promedio de las membranas liofilizadas)	9,7 mg/ml
<u>Relación proteínas/membrana</u>	0,44 mg de proteínas por mg de membrana
<u>Cuantificación de fosfolípidos</u>	3,96 mg/ml
<u>Cuantificación de proteínas</u>	4,5 mg/ml

III.2. Actividad enzimática de la AEB de “ghosts” en suspensión

Para determinar las condiciones óptimas para medir la actividad de AEB y calcular sus parámetros cinéticos, se realizaron curvas de enzima (fig. 9) y de tiempo (fig. 10). Los valores escogidos para utilizar en los posteriores estudios fueron un tiempo de 20 minutos y una concentración de enzima de 0,011mg/ml (concentración alcanzada con una dilución 1/400 de la muestra original). La dilución de las MEB representó un paso bastante complicado ya que una aparente gran heterogeneidad de la muestra debido posiblemente a vesículas de distinto tamaño, precipitadas, o agregadas en la suspensión, obligaron a homogeneizarlas mediante sucesivos pasajes de la suspensión a través de una aguja hipodérmica (25 G). Aun así, las muestras más diluidas presentaron incertidumbre respecto a la cantidad de enzima presente en ellas. Si bien se podría haber optado por elegir mezclas menos diluidas, se prefirió seguir rigurosamente los supuestos del modelo de Michaelis-Menten que establecen que se debe trabajar a velocidades iniciales, es decir en la región lineal de las curvas y también garantizar que no se consuma más del 5% de sustrato.

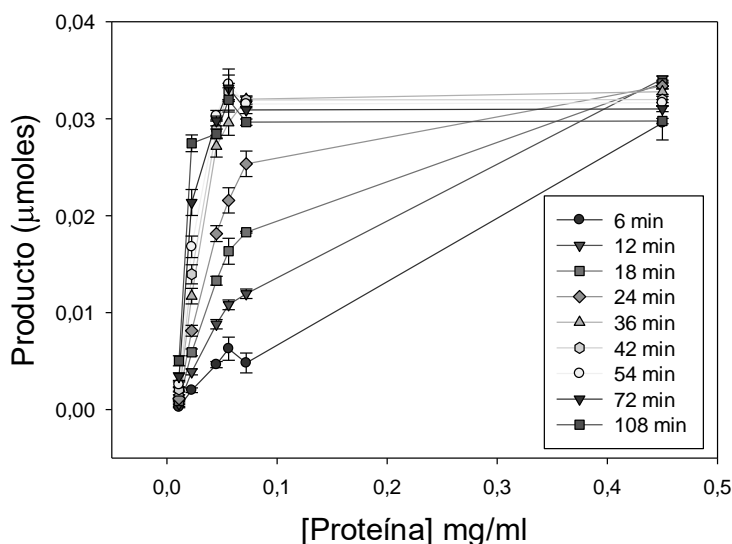


Figura 9. Curva de actividad enzimática de AEB en función de la concentración de enzima a distintos tiempos de incubación.

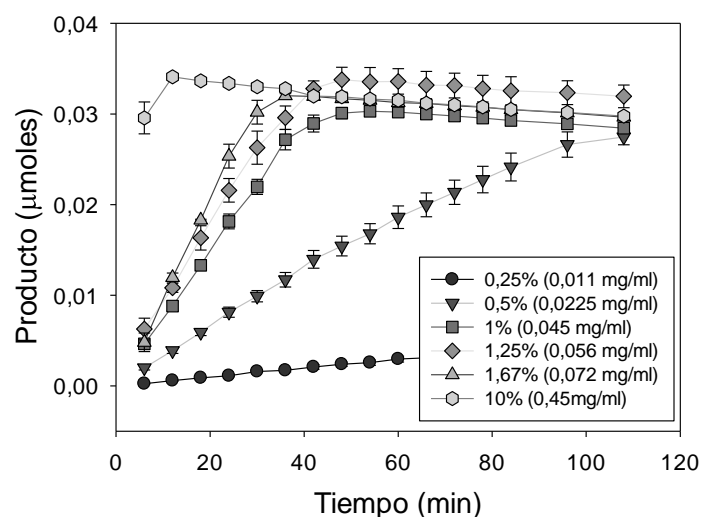


Figura 10. Curvas de producto producido por la AEB en función del tiempo de incubación, a diferentes diluciones de la muestra (se muestra la cantidad de enzima como el porcentaje de AEB con respecto a la muestra sin diluir).

III.2.1. Efectos de Cineol y Alcanfor en la actividad enzimática de AEB

Para determinar el efecto de los MT sobre la actividad de AEB se midió la misma en un medio con alcanfor (ALC) o cineol (CIN). El rango de concentración donde los MT ejercen un efecto significativo sobre la actividad de la enzima se determinó calculando los valores de IC_{50} . Los resultados se muestran en la Figura 11.

Se obtuvo un valor de IC_{50} para CIN igual a 246 μ M, mientras que la IC_{50} de ALC no pudo ser alcanzada en el rango de concentración empleado.

Se decidió no aumentar aún más la concentración de ALC para preservar la estructura de la membrana, lo que sería difícil de garantizar a elevadas concentraciones de MT.

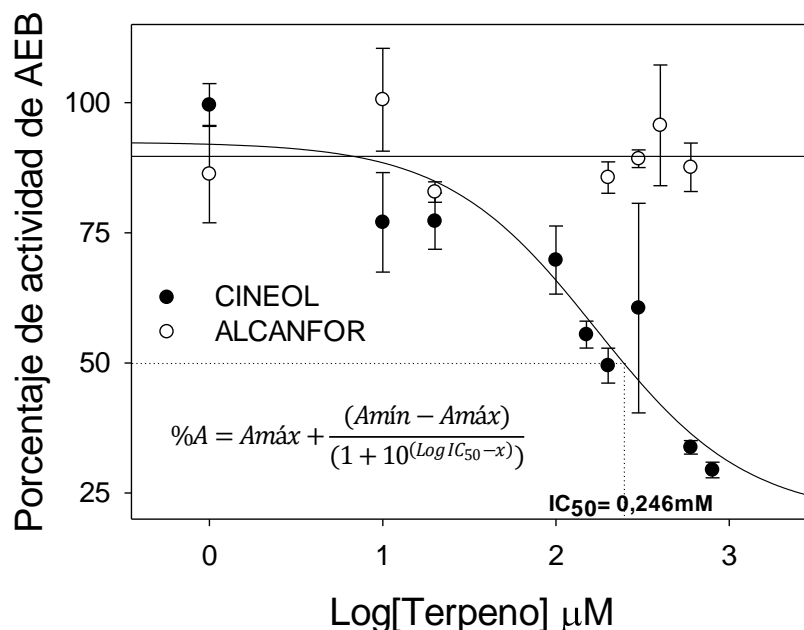


Figura 11. Determinación del efecto inhibitorio de los MTs sobre la actividad de AEB. Varias concentraciones de CIN (símbolo negro) y ALC (símbolo blanco) fueron estudiadas para determinar el porcentaje de inhibición sobre la actividad enzimática (t de incubación 20 min; 0,2 mM de sustrato; 44,6 μg/ml de proteína). Ecuación ajustada (Inserto).

Para estudiar el mecanismo inhibitorio de los MTs, se realizaron curvas de Michaelis-Menten siguiendo rigurosamente los supuestos del modelo. Ya se conocía por trabajos anteriores que la enzima se comporta de manera Michaeliana en el rango de concentraciones de sustrato empleado, aunque presenta inhibición por sustrato a grandes concentraciones del mismo (> a 1 mM) [57]. La actividad se midió en presencia de CIN (fig. 12) y de ALC (fig. 13).

La concentración de MT usada en ambos casos y para que sea comparable fue de 0,3mM que es prácticamente la IC_{50} del CIN. La curva control se realizó en ausencia de MT y contuvo el mismo volumen de etanol (vehículo de los MTs) que las curvas con MT.

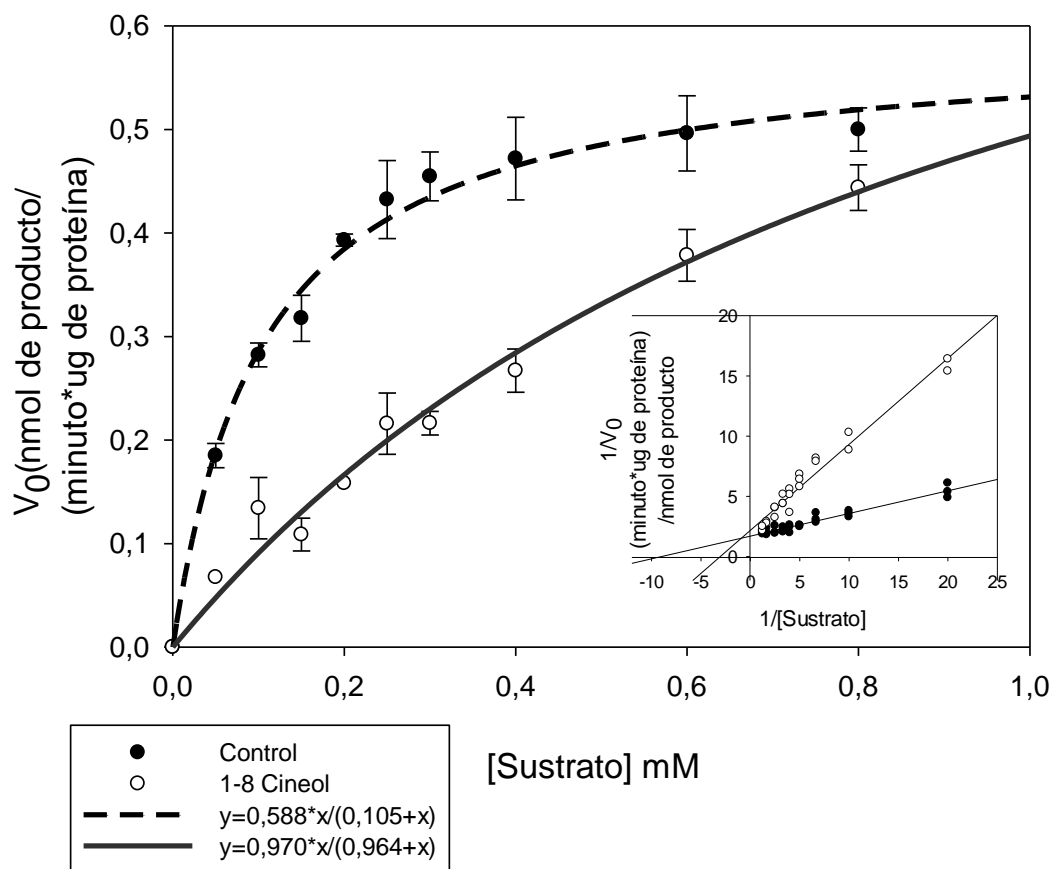


Figura 12. Actividad de AEB vs concentración de sustrato, en presencia de CIN. Se muestra el efecto del CIN sobre la actividad de AEB. En la curva control se utilizó etanol. El análisis de la regresión fue obtenido aplicando la ecuación de Michaelis-Menten. En el inserto se presenta el análisis de las dobles recíprocas, donde se muestra la inversa de la velocidad inicial en función de la inversa de la concentración de sustrato.

El ajuste a una hipérbola de la curva de Michaelis-Menten en presencia de CIN (fig. 12) arrojó un valor de K_m de $0,9644 \pm 0,2558$ mM, prácticamente un orden de magnitud mayor a la K_m del control, de $0,1054 \pm 0,0107$ mM. En cuanto a los valores de $V_{m\acute{a}x}$, esta fue mayor en presencia de CIN ($0,9701 \pm 0,1709$ nmol*min⁻¹* μg^{-1} prot.) comparado con el control ($0,5876 \pm 0,0171$ nmol*min⁻¹* μg^{-1} prot.)

Sin embargo, dado que contamos con pocos valores en la región de la $V_{m\acute{a}x}$ resulta más apropiado utilizar el ajuste de las dobles recíprocas para determinar los parámetros cinéticos (Tabla 2). Con este ajuste se obtiene un valor de K_m de $0,33 \pm 0,05$ mM para el CIN y de $0,11 \pm 0,01$ mM para el control, mientras que los valores de velocidad máxima

fueron, $0,46 \pm 0,05 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{ prot.}$ para CIN contra $0,59 \pm 0,03 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{ prot.}$ para el control.

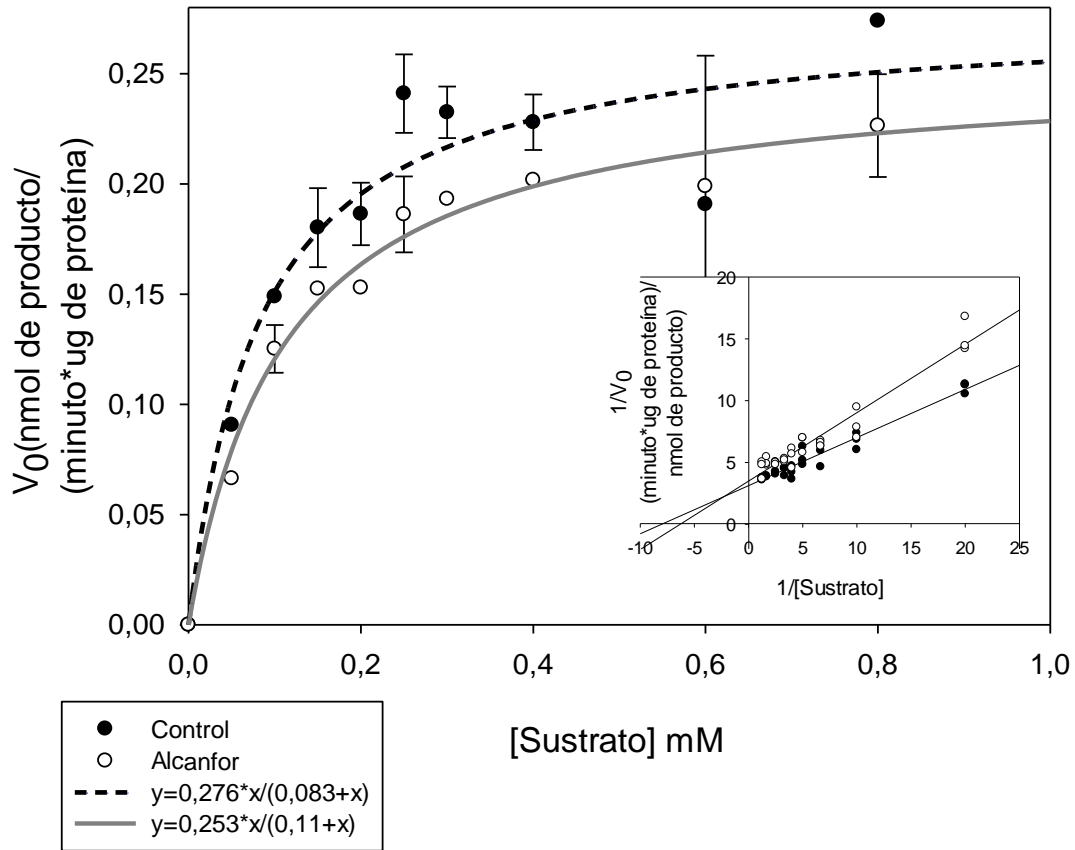


Figura 13. Actividad de AEB vs concentración de sustrato en presencia de ALC. Se muestra el efecto de ALC sobre la actividad de AEB referido a la curva control, para la cual se utilizó etanol. El análisis de la regresión fue obtenido aplicando la ecuación de Michaelis-Menten. En el inserto se presenta el análisis de las dobles recíprocas, donde se muestra la inversa de la velocidad inicial en función de la inversa de la concentración de sustrato.

La curva de Michaelis-Menten en presencia de ALC se muestra en la Figura 13. Con el ajuste hiperbólico, el valor de K_m para la AEB en presencia de ALC es $0,1102 \pm 0,0158$

mM y la $V_{m\acute{a}x}$ es $0,2537 \pm 0,0107 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1} \text{ prot.}$, mientras que para el control la K_m es $0,0830 \pm 0,0276 \text{ mM}$ y la $V_{m\acute{a}x}$ $0,2767 \pm 0,0236 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1} \text{ prot.}$

Con el ajuste de las inversas (Tabla 2), la K_m con alcanfor es $0,159 \pm 0,019 \text{ mM}$ y la $V_{m\acute{a}x}$ $0,286 \pm 0,02 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1} \text{ prot.}$, mientras que para el control K_m es $0,125 \pm 0,01 \text{ mM}$ y $V_{m\acute{a}x}$ $0,32 \pm 0,016 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1} \text{ prot.}$

Cabe aclarar que la diferencia en los valores de $V_{m\acute{a}x}$ observada entre los experimentos Control se deben a que, si bien fueron realizados con la misma muestra de enzima, se realizaron en diferentes días, por lo que pudo ocurrir degradación del material que disminuyó la cantidad de enzimas disponible pero no afectó a la afinidad de la enzima por el sustrato (valores de K_m similares).

En resumen, en ambos casos se observa una ligera disminución de los valores de velocidad máxima y la afinidad de la AEB, aunque esta disminución no es significativa en presencia de ALC ($p=0,21$).

Por lo tanto, se sugiere un mecanismo de inhibición mixto para CIN (disminuye $V_{m\acute{a}x}$ y aumenta K_m). El mecanismo de inhibición mixto propuesto podría deberse a una suma de efectos del CIN, por un lado, un efecto de inhibición competitiva actuando directamente sobre el sitio activo de AEB, y por otro lado un efecto inhibitorio inespecífico provocado por la partición del MT en la membrana afectando levemente la estructura de la enzima, evidenciado por la disminución de la $V_{m\acute{a}x}$.

Por su parte, el sutil efecto inhibitorio de ALC no es significativo a la concentración ensayada (la diferencia de $V_{m\acute{a}x}$ con el control no es significativa, $p= 0,21$ y K_m tampoco lo es, $p= 0,14$).

Tabla 2: Resumen de los parámetros cinéticos obtenidos por el ajuste de las inversas para la actividad de AEB en presencia de 0,3 mM de MTs.

Parámetro Cinético	Efecto de CIN		Efecto de ALC	
	Control	CIN	Control	ALC
$V_{m\acute{a}x} \text{ (nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1} \text{ prot)}$	$0,59 \pm 0,03$	$0,46 \pm 0,051$	$0,32 \pm 0,016$	$0,286 \pm 0,02$
$K_m \text{ (mM)}$	$0,11 \pm 0,011$	$0,33 \pm 0,05$	$0,125 \pm 0,01$	$0,159 \pm 0,019$

Los valores obtenidos en este trabajo son comparables con los de otros estudios (Tabla 3). Es interesante notar que el mecanismo de inhibición propuesto para CIN por Miyazawa [29] para la acetilcolinesterasa bovina es de tipo competitivo mientras que Nicolette [64]

propone un mecanismo no competitivo para la acetilcolinesterasa eritrocitaria humana. Sin embargo, en estos casos la acetilcolinesterasa utilizada es una enzima purificada a partir de los eritrocitos utilizando detergentes, por lo que el entorno lipídico de la enzima estaría modificado. Estudios demostraron que luego de la purificación de la AEB utilizando Tritón X-100 y cromatografías de afinidad, se obtienen al menos cinco estados de agregación distintos de la enzima [65, 66]. Además, se sabe que existen dominios resistentes a detergentes, lo que puede indicar que la enzima conserva parte de su entorno [67].

En cuanto a la acetilcolinesterasa de insectos se ven más diferencias, lo cual es esperable dada la divergencia evolutiva [68]. Principalmente es notorio el ALC, que parece tener un efecto inhibitorio, aunque con un efecto insecticida poco considerable [32].

Tabla 3. Valores de IC₅₀ obtenidos en este trabajo y por otros autores, utilizando alcanfor y cineol y diversas fuentes de enzima.

	Fuente de enzima	Mecanismo	IC ₅₀ / % de inhibición	Ref.
CINEOL	Membrana eritrocitaria purificada	Inhibición competitiva	0,246mM o 38 µg/ml	Este trabajo
	Acetilcolinesterasa de eritrocitos bovinos de Seikagaku Kogyo Co., Ltd.	-	41 µg/ml	Miyazawa[69]
	Acetilcolinesterasa de eritrocitos bovinos	Inhibición competitiva	49 µg/ml	Miyazawa[29]
	Acetilcolinesterasa de la anguila (ACHE, EC 3.1.1.7) obtenida de Sigma	-	0,2mM	Gracza [70]
	Polvo liofilizado de acetilcolinesterasa purificada de anguila (<i>[Electrophorus electricus]</i> type VI-s, 425.94 units/mg, 687 U/mg protein)	-	17,80 ± 0,63 % (50 µg/ml)	Kitphati[71]
	Acetilcolinesterasa (EC 3.1.1.7) de eritrocitos bovinos de Sigma	-	0,06 ± 0,01 mg/ml	Savelev[30]
	Acetilcolinesterasa de eritrocitos humanos de Sigma (Extraída con TRITON X-100)	Inhibición no competitiva	0,67mM	Nicolette[64]
	Acetilcolinesterasa de termita japonesa	-	~9% (1mg/ml)	Seo[34]
	Acetilcolinesterasa purificada a partir de <i>Tribolium castaneum</i>	-	65% (10mM)	Abdelgalei[31]
ALCANFOR	Membrana eritrocitaria purificada	Inhibición no competitiva	ND (>>0,8mM)/ 10% (0 a 0,8mM)	Este trabajo

Acetilcolinesterasa de eritrocitos bovinos de Sigma Co., Ltd.	No obtuvieron "Dixon Plots" reproducibles	(+) 26,4% (1mM) (-) 21,2% (1mM)	Miyazawa[28]
Acetilcolinesterasa de eritrocitos humanos de Sigma (Extraída con TRITON X-100)	-	4,7mM	Nicolette[64]
Polvo liofilizado de acetilcolinesterasa purificada de anguila (<i>[Electrophorus electricus]</i> type VI-s, 425.94 units/mg, 687 U/mg protein)	-	9,58 ± 0,32 % (50 µg/ml)	Kitphati[71]
Acetilcolinesterasa (EC 3.1.1.7) de eritrocitos bovinos de Sigma	-	39 ± 4 % (0,5 mg/ml)	Savelev[30]
Enzima obtenida a partir de un homogenato de <i>Sitophilus zeamais</i>	-	0,43mM/ 96% (5mM)	Herrera[32]

III.3. Fluorescencia

La Figura 14 muestra el efecto de ALC y CIN sobre los valores de Anisotropía de fluorescencia (A) de DPH (ADPH) y de TMA-DPH (ATMA-DPH). El incremento en el desorden de la membrana es evidente para el CIN medido tanto con DPH como con TMA-DPH.

Se observa que, en todo el rango de concentración de MT ensayado, CIN tiene mayor capacidad para desordenar las MEB (disminución en los valores de A) tanto en la región de las cadenas hidrocarbonadas de la membrana (sensada por DPH) como en la región de grupos polares (sensado por TMA-DPH).

A la concentración de 0,3 mM (Tabla 4), ambos MT afectan preferentemente la región de grupos polares mientras que solo CIN muestra un leve efecto en la región de cadenas hidrocarbonadas.

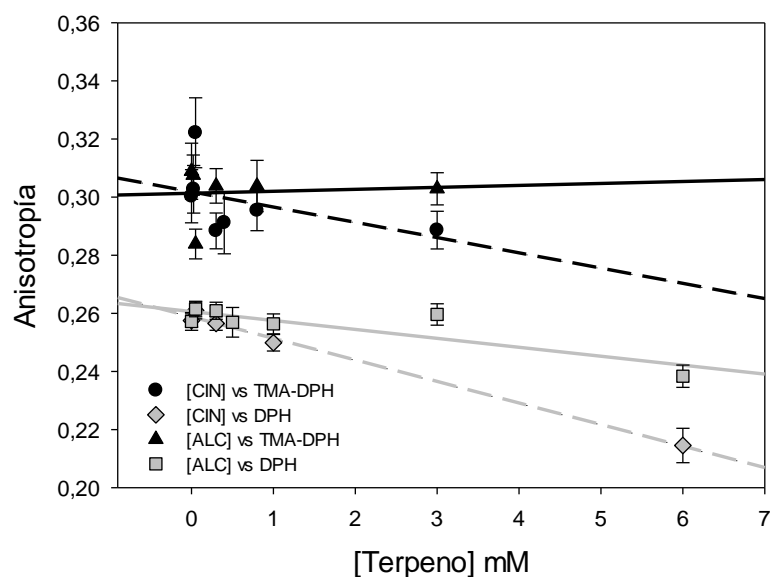


Figura 14. Anisotropía de fluorescencia de DPH y TMA-DPH incorporados en membranas eritrocitarias bovinas medida en presencia de concentraciones crecientes de CIN (rombos DPH, círculos TMA-DPH) y ALC (cuadrados DPH, triángulos TMA-DPH).

Tabla 4. Porcentaje del cambio en la anisotropía de cada sonda inserta en la membrana, bajo el efecto de 0,3mM de terpeno.

CINEOL (0,3mM)		ALCANFOR (0,3mM)	
DPH	TMA-DPH	DPH	TMA-DPH
-0,70%	-4%	0	-1,60%

Previamente se ha reportado el efecto de estos MTs sobre la organización de otro tipo de membrana natural, membranas sinaptosomales bovinas [72], en donde una concentración de 0.3 mM en el sistema de incubación indujo una disminución del parámetro de orden medido con sondas paramagnéticas, más evidente en la región de las cadenas hidrocarbonadas. También se ha reportado que 0.3mM del MT carvona (cuyo grupo funcional es una cetona), induce una disminución de la ADPH y un ligero incremento en la dispersión de la luz [20].

Para evaluar el efecto de CIN sobre la integridad de las MEB, se midió la variación de la luz dispersada por la muestra en función de la concentración de CIN (fig. 15). La

intensidad de la luz dispersada fue muy similar en todo el rango de concentración, con excepción concentración de la 3mM, a la cual el CIN podría tener un efecto disruptivo

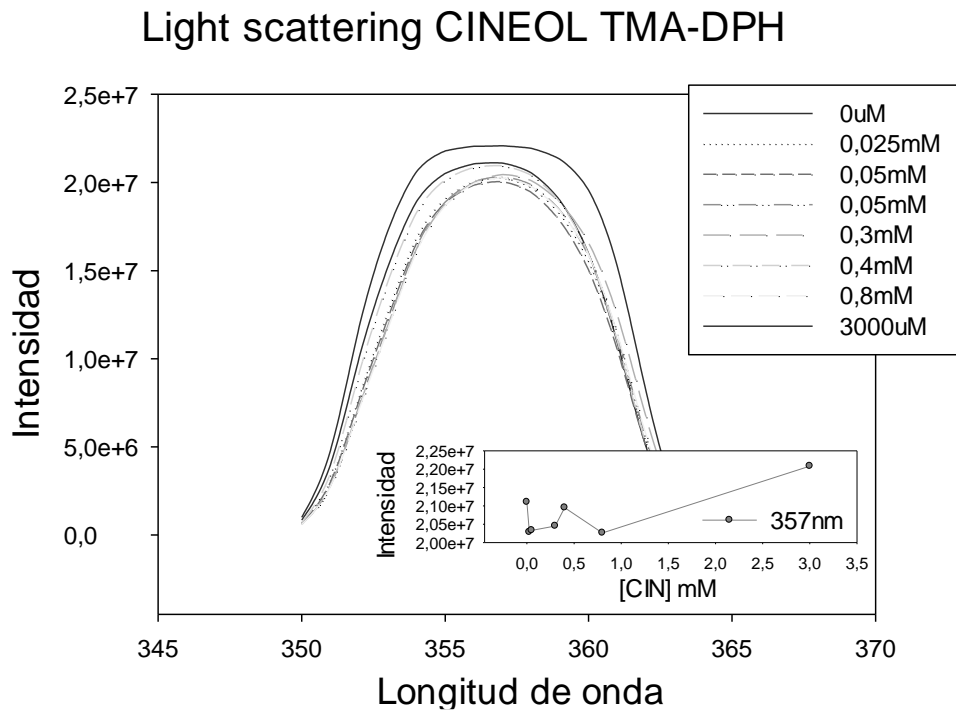


Figura 15. Mediciones de “Light scattering” realizadas en SUVs obtenidas a partir de membranas eritrocitarias marcadas con TMA-DPH en presencia de CIN.

Se observa que a medida que aumenta la concentración de CIN hay fluctuaciones en la luz dispersada hasta que a altas concentraciones la dispersión aumenta. Esto sugiere que CIN inestabiliza las membranas causando la fusión de las SUVs a altas concentraciones. Sin embargo, estos resultados son muy preliminares.

III.4.1 Films de Langmuir

Debido a que se propuso que la actividad de la enzima es capaz de sensor modificaciones en su entorno molecular, tales como cambios en la topología, reología y potencial de superficie (ΔV) de la membrana, se utilizó la técnica de filmes de Langmuir en la interfase agua aire como modelo de membrana, que permite observar la topología por medio de microscopía de epifluorescencia y medir cambios en el ΔV y la reología del filme causados por la partición de moléculas desde la subfase.

Para evaluar el efecto de los MT en las isothermas de compresión π -Área (A) de las monocapas de MEB, se procedió a dispersar las mismas sobre una subfase con una concentración constante de MT (291 μ M para CIN y 259 μ M para ALC). Esta concentración de MT en la subfase permite mantener la misma concentración de MT en la membrana que en los experimentos de actividad enzimática en suspensión (sección III.2.1).

En presencia de CIN, se observa que la transición principal de la isoterma π -A comienza a áreas mayores, y ocurre de manera menos cooperativa (transcurre en un área mayor, inserto fig. 16). Esto indicaría que el CIN presente en la monocapa dificulta las interacciones intermoleculares de los componentes de las MEB, inestabilizando ligeramente el filme.

A presiones bajas, las pendientes de ambas isothermas (π -A y ΔV -A) cambian en presencia de CIN.

Se observa que la partición del terpeno en la monocapa ocurre de manera tal que contribuye al aumento del dipolo general de la interfase generando una mayor densidad de cargas negativas sobre las cabezas polares puesto de manifiesto como un aumento en el potencial de superficie ($\Delta\Delta V \sim 10$ mV con respecto al control sin CIN, a 35mN/m).

A altas π , las isothermas control y con CIN convergen, sugiriendo la expulsión parcial de las moléculas del MT (fig. 16).

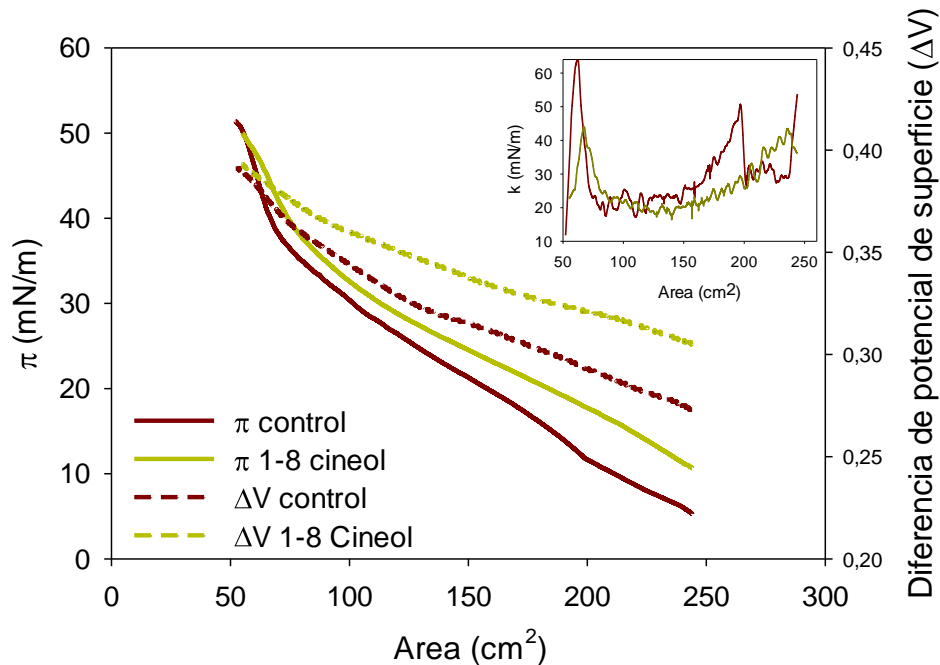


Figura 16. Efecto de la presencia de CIN sobre las isothermas de compresión de membranas eritrocitarias bovina, π vs Área (líneas sólidas) y diferencia de potencial de superficie (ΔV) vs Área (líneas interrumpidas). El inserto representa el análisis del módulo de compresibilidad (K) para cada isoterma (Amarillo para el CIN y rojo para el control).

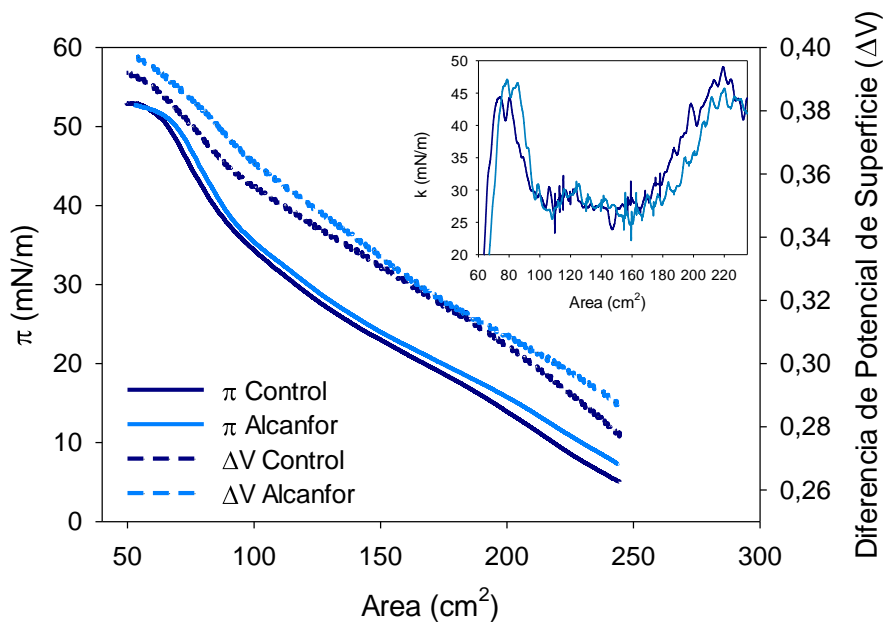


Figura 17. Efecto de la presencia de ALC sobre isothermas de compresión de membranas eritrocitarias bovinas, π vs Área (líneas sólidas) y diferencia de potencial de superficie (ΔV) vs Área (líneas interrumpidas). El inserto representa el análisis del módulo de compresibilidad (K) para cada isoterma (Celeste para ALC y azul para control).

El ALC (fig. 17), por su parte, no parece afectar la forma de la isoterma aunque la expande ligeramente alcanzando el colapso a menor π . Además, incrementa levemente los valores de ΔV ($\Delta\Delta V \sim 6$ mV respecto del control, a 35 mN/m)

	Mitad de la transición	Colapso de la monocapa	35 mN/m
Control Cineol (3 μ l etanol)			
Área (cm ²)	168	60	80
Módulo de Compresibilidad (mN/m)	30	61	20
Presión lateral (mN/m)	18,3	46	35
Diferencia de Potencial de Superficie (ΔV)	0,31	0,38	0,36
Cineol			
Área (cm ²)	208	66	90
Módulo de Compresibilidad (mN/m)	30	42	22
Presión lateral (mN/m)	16,5	44,6	35
Diferencia de Potencial de Superficie (ΔV)	0,32	0,38	0,366
Control Alcanfor (10 μ l etanol)			
Área (cm ²)	187	72	97,9
Módulo de Compresibilidad (mN/m)	35,8	43,8	29,3
Presión lateral (mN/m)	16,5	46,6	35
Diferencia de Potencial de Superficie (ΔV)	0,31	0,378	0,357
Alcanfor			
Área (cm ²)	187	79	101,5
Módulo de Compresibilidad (mN/m)	29,8	46,2	27,9
Presión lateral (mN/m)	17,9	42,7	35
Diferencia de Potencial de Superficie (ΔV)	0,314	0,38	0,363

Tabla 5. Parámetros derivados de las isotermas de compresión π -A, SP-A y K-A.

Si se analiza con detalle que le sucede a la monocapa cuando es comprimida hasta una presión de 35mN/m, que es aproximadamente la presión de equilibrio de las bicapas y por lo tanto la presión lateral elegida para la transferencia a LS (última columna de la tabla 5), no vemos grandes cambios en la diferencia de potencial con respecto al control, inducidos por los terpenos. Se observa que dicha presión se alcanza a un área de monocapa más grande en el caso del CIN, lo cual indica que hay presencia de CIN en

membrana y que no se ha expulsado por completo, con lo cual, los cambios en la fluidez que se observan en los experimentos de fluorescencia son esperables.

III.4.2. Capacidad de penetración de los terpenos

Se estudió la capacidad del CIN y del ALC para abordar monocapas previamente formadas en la interfase agua aire. Para esto se determinó la máxima presión de la monocapa a la cual los terpenos pueden penetrar cuando son inyectados en la subfase ($\pi_{\text{cut-off}}$). En la Figura 18 se observa como la introducción de los MT en una interfase estable induce una perturbación visualizada como un pico en la presión lateral, que se estabiliza a una presión mayor si los terpenos pudieran ingresar, a la misma presión si no pueden ingresar, o a una presión menor si la incorporación del MT inestabilizó la monocapa por alguna razón poco clara, tal como se observa para el ALC a presiones muy altas. Esta inestabilización puede deberse a que las moléculas de MEB en la monocapa, interaccionan con las moléculas de ALC de la subfase y encuentran un ambiente más favorable a una distancia mayor de la interfase (vesículas, micelas, solubilización). Esta posible explicación no es tan controvertida si pensamos que en la interfase hay insertas grandes proteínas que no están en su ambiente más óptimo y que podrían adquirir disposiciones más favorables energéticamente.

Por otro lado, esto concuerda con lo que propusimos para la compresión de las isothermas, donde dijimos que con la compresión algunas moléculas (tal vez no solo los terpenos) podrían estar escapando de la interfase, mostrando que la composición de la monocapa puede no ser constante a lo largo de la isoterma.

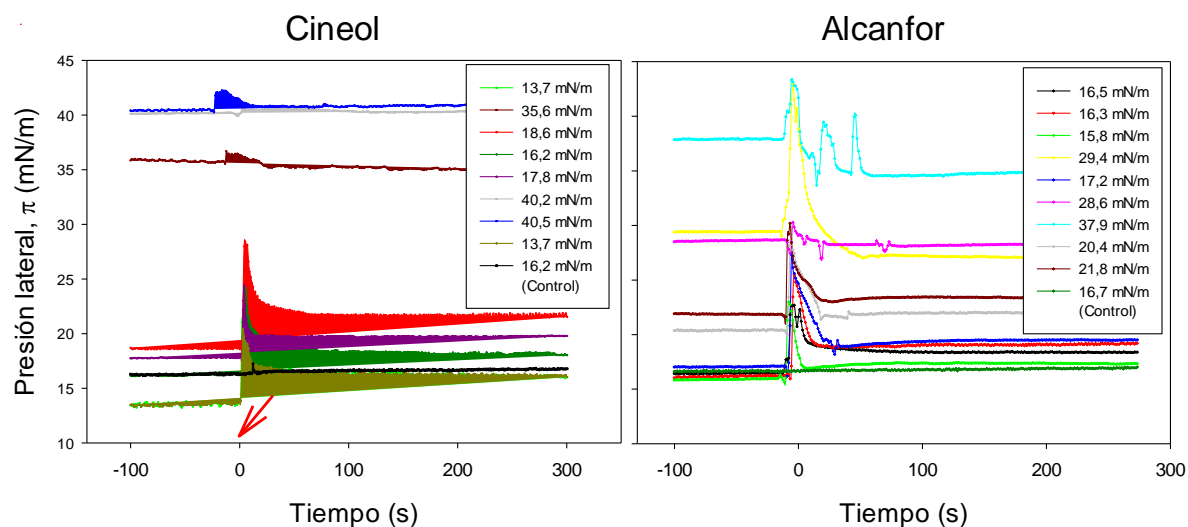


Figura 18. Efecto en la presión lateral (π) producido por la incorporación de MT desde la subfase a la monocapa de MEB previamente formada en la interfase agua-aire. Registro en función del tiempo. La capacidad de los MT para penetrar una monocapa previamente formada produce una perturbación y posterior expansión del film visualizada como un aumento en la presión lateral. El momento de la inyección con el terpeno está indicado con la flecha roja.

Es interesante notar que cuando ALC es inyectado en la subfase de una interfase limpia, libre de membranas, la presión en la interfase aumenta considerablemente (fig. 19) y más que con CIN sugiriendo que estos MT son capaces de formar filmes estables en la interfase agua aire.

La Figura 19 muestra la variación de $\Delta\pi$ en función de la π inicial de la monocapa. Se observa que ALC aparentemente no lograría penetrar en monocapas estabilizadas a presiones superiores a 26,5 mN/m (cut-off alcanfor). Con estos resultados, a ALC no le sería tan favorable energéticamente penetrar en bicapas naturales, lo que se refleja también en los experimentos de fluorescencia.

Por su parte, CIN presento un $\pi_{\text{cut-off}}$ más alto, de 39,31mN/m, comparable con el obtenido para la monocapa de dpPC, esto puede deberse a una naturaleza más apolar del CIN, recordamos que posee un momento dipolar mucho más bajo que el alcanfor (1,4 Debye).

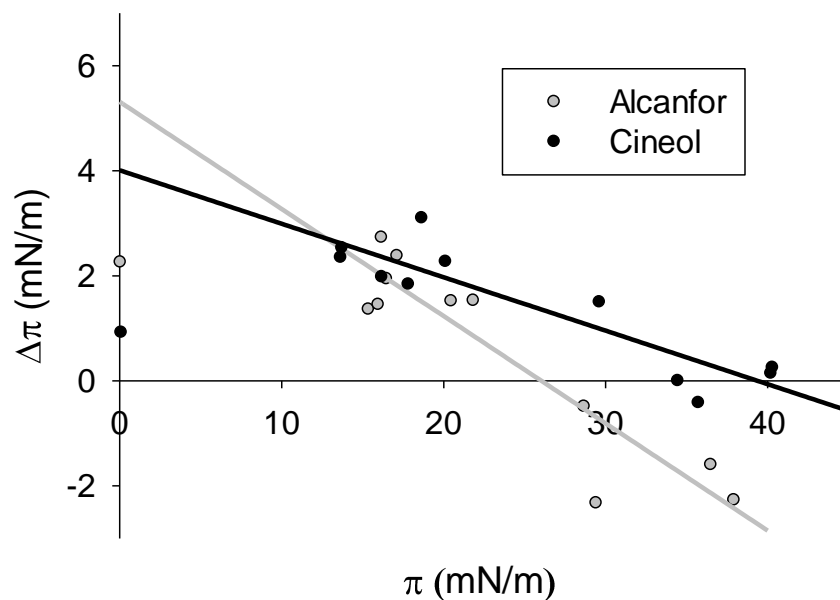


Figura 19. Variación de $\Delta\pi$ en función de la π_{inicial} de la monocapa. La capacidad de los MT para penetrar una monocapa previamente formada se calcula como un $\Delta\pi$ ($\pi_{\text{final}} - \pi_{\text{inicial}}$ (sin terpeno)). La máxima presión lateral a la cual no se permite la incorporación del terpeno se denomina π cut-off.

III.4.3 Topología del filme

Para observar la topología de las MEB se construyeron filmes de Langmuir en la interfase agua-aire con MEB marcada con la sonda fluorescente DiIC18. A partir de una monocapa estabilizada a 35 mN/m se procedió a transferirla a un soporte sólido hidrófobo mediante una deposición horizontal por la técnica de Langmuir-Schaefer.

La sonda DiIC18 permite distinguir entre regiones más condensadas (zonas más oscuras) y áreas más desordenadas (zonas con un rojo más intenso).

Se observó que bajo el efecto de CIN se observa un aumento de la heterogeneidad del filme, mientras que con el ALC se obtiene una monocapa bastante homogénea, similar a la monocapa control (fig. 20).

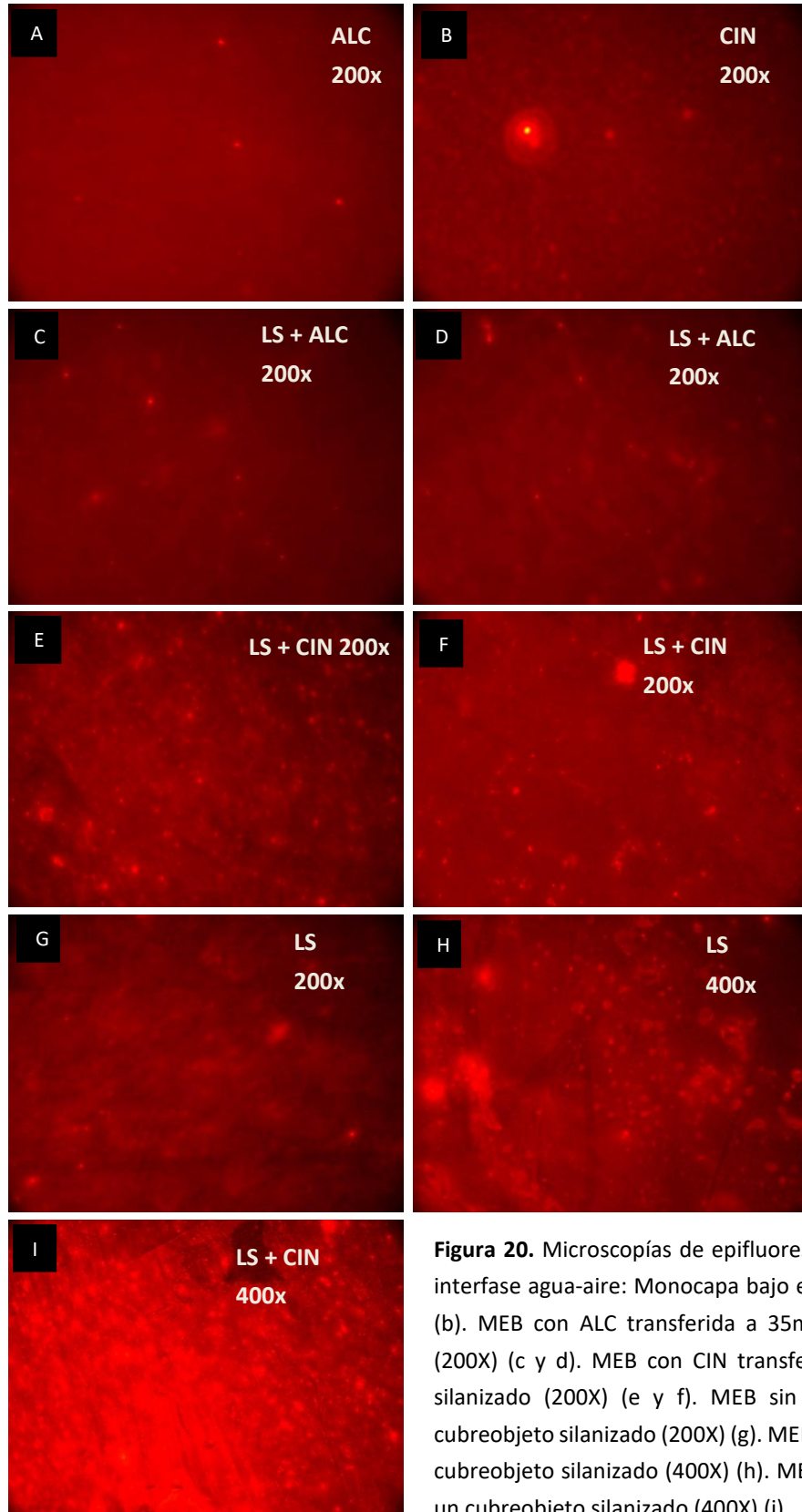


Figura 20. Microscopías de epifluorescencia de MEB ($\pi=35\text{mN/m}$) en la interfase agua-aire: Monocapa bajo el efecto de ALC (a) y de CIN (200X) (b). MEB con ALC transferida a 35mN/m a un cubreobjeto silanizado (200X) (c y d). MEB con CIN transferida a 35mN/m a un cubreobjeto silanizado (200X) (e y f). MEB sin MT transferida a 35mN/m a un cubreobjeto silanizado (200X) (g). MEB sin MT transferida a 35mN/m a un cubreobjeto silanizado (400X) (h). MEB con CIN transferida a 35mN/m a un cubreobjeto silanizado (400X) (i).

III.5. Actividad enzimática de la AEB en monocapas transferidas por LS

Se estudió la actividad de la enzima transferida a vidrios silanizados mediante el método de Langmuir-Schaefer.

Con el objetivo de determinar las condiciones óptimas para medir la actividad de AEB transferida y obtener sus parámetros cinéticos, se realizó una curva de tiempo (fig. 21).

Se escogió el tiempo de 100 min para realizar los siguientes ensayos, incubando a 37°C en estufa. No se realizó curva variando la concentración de enzima ya que la misma está fija, de acuerdo a lo obtenido en la transferencia.

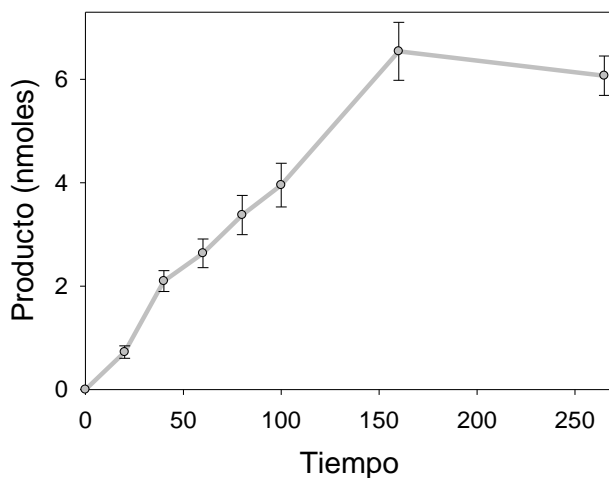


Figura 21. Curva de actividad enzimática en función del tiempo (minutos), utilizando la enzima transferida a 35mN/m, mediante el método de Langmuir-Schaefer.

La figura 22 muestra el efecto de los MT sobre la actividad de AEB inmovilizada en los LS. Los parámetros cinéticos obtenidos se resumen en la Tabla 6.

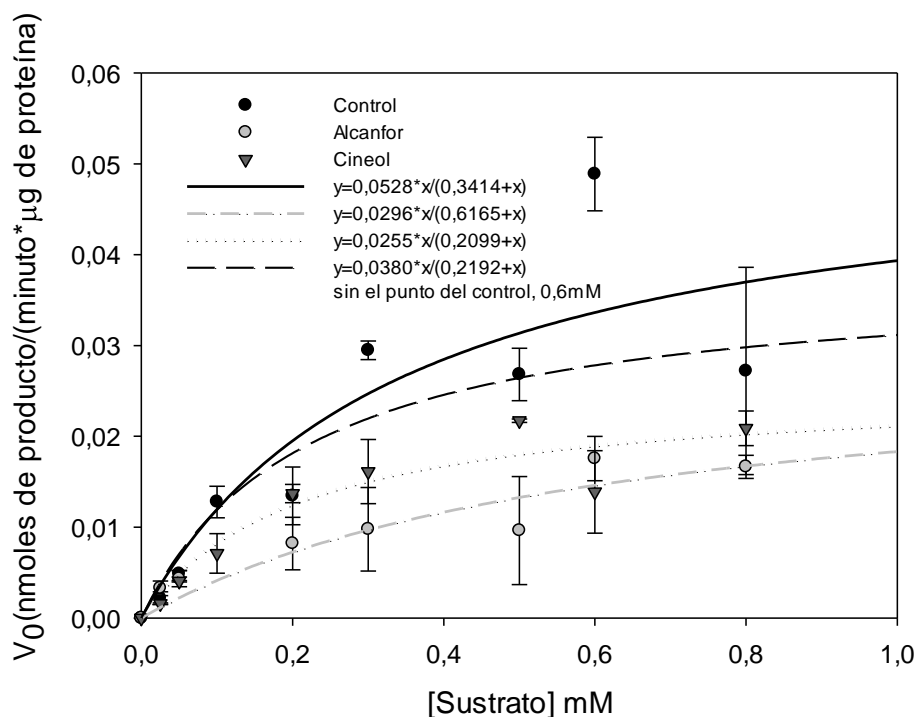


Figura 22. Actividad de AEB en monocapa, transferida a un soporte hidrofóbico a 35mN/m vs concentración de sustrato en presencia de MTs. Se muestra el efecto del CIN y el ALC sobre la actividad de AEB referido a la curva control, para la cual se utilizó etanol. El análisis de la regresión fue obtenido aplicando la ecuación de Michaelis-Menten.

		Suspensión (Ghosts)	LS (35 mN/m)	LS (10 mN/m)
Control	$V_{m\acute{a}x}$ (nmol*min ⁻¹ *µg ⁻¹)	0,59 ± 0,03 (CIN) 0,32 ± 0,02 (ALC)	0,0380 ± 0,007	0,0156 ± 0,0052
	K_m (mM)	0,11 ± 0,01(CIN) 0,125 ± 0,01(ALC)	0,219 ± 0,107	0,3775 ± 0,2628
Cineol	$V_{m\acute{a}x}$ (nmol*min ⁻¹ *µg ⁻¹)	0,46 ± 0,05	0,025 ± 0,004	--
	K_m	0,33 ± 0,05	0,21 ± 0,10	--
	Mecanismo de inhibición	Mixto/Competitivo	No competitivo	--
Alcanfor	$V_{m\acute{a}x}$ (nmol*min ⁻¹ *µg ⁻¹)	0,29 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,0126 ± 0,0055
	K_m	0,16 ± 0,02	0,6165 ± 0,4358	0,1095 ± 0,1523
	Mecanismo de inhibición	No inhibe	Competitivo	No inhibe

Tabla 6. Parámetros cinéticos obtenidos para la AEB presente en vesículas en suspensión o en monocapa transferida a 35 mN/m.

Se observa que la enzima inmovilizada presenta un valor de $V_{m\acute{a}x}$ menor que en suspensión mientras que la K_m aumentó ligeramente (Tabla 6). Esta disminución en la actividad podría deberse a un error en la cuantificación de las proteínas transferidas, a una modificación en la relación AEB/proteínas en la monocapa, al efecto de la inmovilización en el vidrio que produce impedimentos estéricos o a la existencia de áreas donde la enzima se encuentra aislada del medio dificultando el encuentro con el sustrato (Figura 23). Esta última opción surge de la compleja composición de la membrana eritrocitaria la cual se encuentra íntimamente relacionada con el citoesqueleto, pudiendo darle cierta estructura a algunas áreas de la misma que permanecerían como bicapa [73].

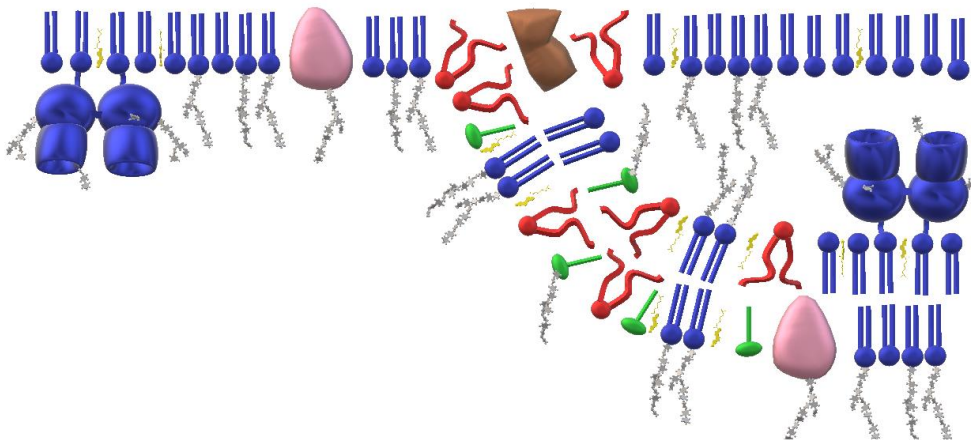


Figura 23. Esquema representando una posible bicapa debajo de la monocapa estabilizada en la interfase agua-aire, creando un microambiente para la enzima, aislada del medio con el sustrato. Se representan lípidos con un parámetro crítico de empaquetamiento similar a 1 en azul, menor a 1 en verde y mayor a 1 en rojo, glicoproteínas en rosa, glúcidos en gris, colesterol en amarillo, AEB en azul y en marrón de esquematiza una proteína que estabilizaría la unión de la bicapa a la monocapa.

Además, en los filmes LS, CIN induce la disminución de $V_{m\acute{a}x}$ sin afectar la K_m (Inhibición no competitiva). Por su parte, al contrario de lo observado en suspensión, ALC afectó a la actividad de la enzima, disminuyendo apenas el valor de $V_{m\acute{a}x}$ y aumentando el valor de K_m .

Para descartar la posibilidad de que los MT logren desprender la enzima del LS, se midió la actividad de la AEB inmovilizada, y con posterioridad se separó el LS del medio de incubación permitiéndose continuar la incubación (Fig. 24).

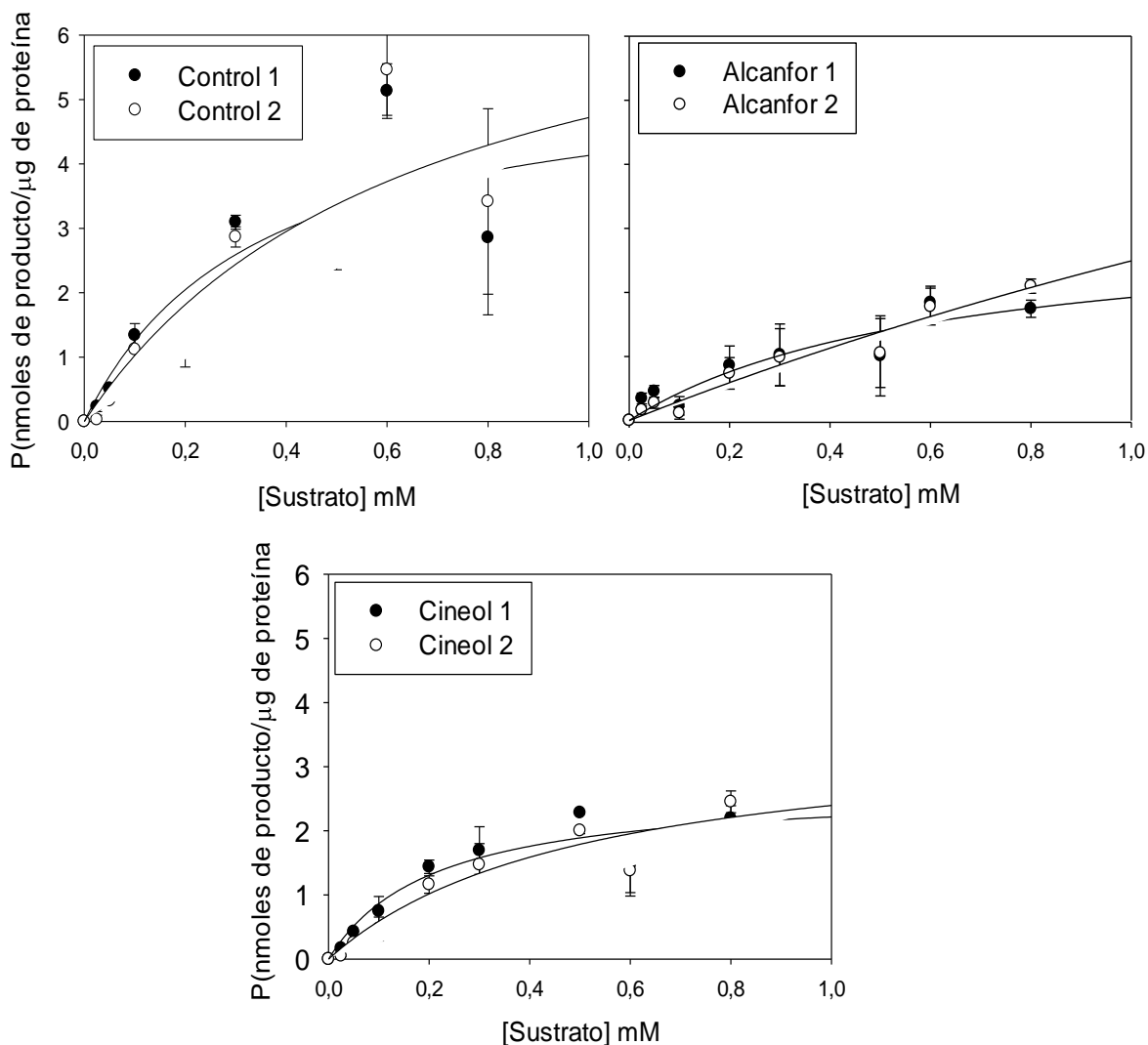


Figura 24. Actividad de AEB vs concentración de sustrato en presencia de MTs. Se muestra la cantidad de producto en el medio de incubación (control 2, cineol 2 y alcanfor2), 1hs después que se separó del LS, a 37°C. Cada curva se encuentra referida a la cantidad de producto obtenido luego de incubar durante 100min la enzima trasferida a 35mN/m sobre el vidrio hidrofóbico en presencia de terpenos o etanol, sustrato y DTNB. Se observa que no aumenta el producto por lo que la enzima no se ha despegado del vidrio.

Se observa que en los medios de incubación la concentración de producto no varía luego de 1hs de reacción en ausencia del soporte LS, por lo que es posible decir que la enzima no es liberada desde el LS hacia el medio de incubación.

Finalmente, dado que el valor de $\pi_{\text{cut-off}}$ para ALC era menor a la π de transferencia (35 mN/m), se decidió realizar la transferencia a un valor de π menor (10 mN/m) y ensayar la actividad de AEB en presencia de ALC.

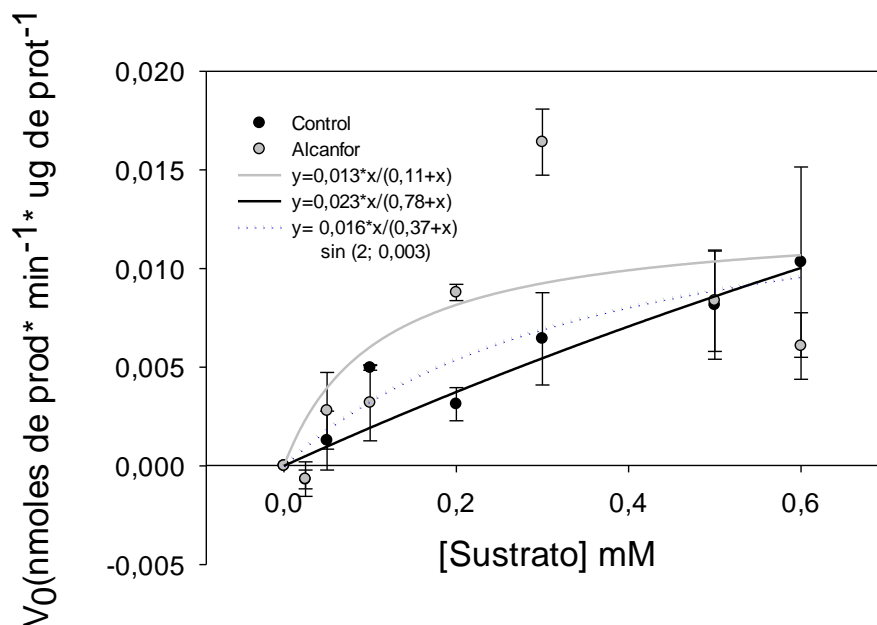


Figura 25. Actividad de AEB en monocapa, transferida a un soporte hidrofóbico a 10mN/m vs concentración de sustrato en presencia de ALC. Se muestra el efecto del ALC sobre la actividad de AEB referido a la curva control, para la cual se utilizó etanol. El análisis de la regresión fue obtenido aplicando la ecuación de Michaelis-Menten.

Se observa que cuando el filme es transferido a 10 mN/m, ALC es capaz de inducir un efecto potenciador de la actividad de la enzima (fig. 25).

Como propusimos anteriormente (ver sección III.2.1) la inhibición mixta del CIN cuando la enzima está anclada a vesículas en suspensión (Figura 12, Tabla 2) podría relacionarse con una suma de efectos inhibitorios. El CIN podría no estar actuando directamente en el sitio catalítico (inhibición competitiva pura) sino interaccionando con los residuos aromáticos que se encuentran en el canal hidrofóbico (ver Fig. 1a) de la enzima, dificultando la llegada del sustrato al sitio activo. Esta dificultad del sustrato de interaccionar correctamente con el canal hidrofóbico debido a la presencia de CIN podría ser revertida parcialmente con el incremento de la concentración de sustrato justificando la leve disminución en la $V_{m\acute{a}x}$ según el gráfico de las inversas (fig. 12, inserto).

Sin embargo, cuando AEB no se encuentra en las vesículas en suspensión sino formando parte de una membrana de topología plana constante y a una presión de empaquetamiento controlado el mecanismo de inhibición aparentemente cambia a no

competitivo (ver Figura 22 y tabla 6). Evidentemente los efectos del CIN sobre el entorno deben ser tomados en cuenta para analizar el mecanismo de inhibición.

Aparentemente los efectos inespecíficos, también presentes cuando la enzima está en vesículas en suspensión, se intensifican cuando la AEB se encuentra transferida. Esto puede deberse a que el cambio de potencial de superficie inducido por CIN que se observó en monocapas, no se encuentra presente en el caso de las vesículas ya que el efecto en ambas hemicapas es igual, pero de signo opuesto, neutralizando el dipolo general de la membrana.

De todas formas, la determinación del mecanismo inhibitorio cuando la enzima se encuentra transferida es complejo debido a la gran heterogeneidad en la disposición de la misma, la cual podría encontrarse en mayor cantidad en algunos parches del vidrio. Además, debido a la inhibición por sustrato podría no estar alcanzando la velocidad máxima. Esto nos confirma la gran influencia que tienen los fenómenos inespecíficos sobre la actividad de esta enzima de membrana.

Algo mucho más llamativo ocurre para el caso del alcanfor. En vesículas en suspensión no se observa una inhibición significativa (Figura 13, Tabla 2). ALC, no incrementa tanto como CIN la fluidez de la membrana (fig. 14) y esto podría deberse a la escasa capacidad de penetración ($\pi_{\text{cut-off}}$ menor a 35 mN/m, Figura 19). Con la enzima transferida a 35mN/m (fig. 22), aumenta el porcentaje de inhibición. A esta presión de la enzima inmovilizada en LS, es posible que el alcanfor no esté penetrando en la monocapa, por lo que se encontraría más libre para interactuar con el sitio activo. Cabe aclarar que la π de equilibrio de una bicapa fluctúa alrededor de 35 mN/m, no es estática como en el caso de los filmes LS, lo cual permitiría una mayor partición del ALC en vesículas. A 10 mN/m el sistema vuelve a cambiar (Figura 25), el ALC parece aumentar la afinidad de la enzima por el sustrato, disminuyendo levemente la $V_{\text{máx}}$. En la Figura 17 se observa claramente que a una π de 10 mN/m es cuando mayor efecto produce el ALC en la variación del ΔV ($\Delta\Delta V \sim 7\text{mV}$, cosa que no sucede a 35 mN/m), sumado a que 10 mN/m está muy por debajo de $\pi_{\text{cut-off}}$ lo cual nos garantiza la partición de ALC en la membrana. Dada la naturaleza electrostática de la interacción AEB-Sustrato es posible que la cinética en este

punto nos esté mostrando que el cambio que produce ALC en el ΔV favorece la afinidad del sustrato por la enzima.

Varios estudios proponen un efecto sinérgico de los terpenos sobre la acetilcolinesterasa debido a la mayor inhibición observada por el aceite esencial de plantas como *Mentha aquatica*[69] y *Salvia lavandulaefolia*[30, 64, 74-76] (cuyos principales componentes son el cineol y el alcanfor) en comparación al efecto esperado dada la suma de sus componentes. Si bien esto se puede deber también a un componente no identificado, a partir del presente estudio se puede evidenciar que el CIN y el ALC actúan de manera diferente sobre la enzima y sobre el entorno, sugiriendo que la presencia de ambos terpenos produciría una potenciación de efectos actuando tanto directamente sobre la enzima como sobre el entorno.

III.6. Efecto de DPPS sobre la actividad de AEB

Las membranas eritrocitarias fueron incubadas con una solución de dpPS (fosfolípido con carga negativa) en metanol con el objetivo de determinar si la incorporación de cargas negativas directamente en la interfase produciría algún cambio en la actividad de la AEB a través del cambio del potencial de membrana.

Los resultados obtenidos tras medir la actividad enzimática de la AEB en suspensión, presente tanto en “ghosts” como vesículas unilamelares pequeñas (SUVs) mostraron una importante inhibición, significativa (50%) para el caso de las SUVs (fig. 26).

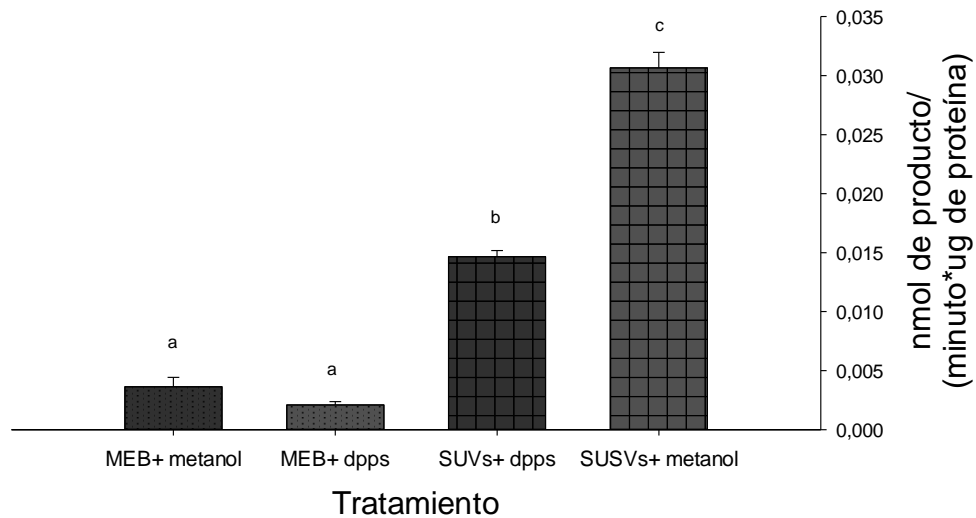


Figura 26. Influencia sobre la actividad de la AEB por la adición de dpPS a las membranas eritrocitarias. La adición se realizó en los eritrocitos vacíos “ghosts” y también sobre las membranas eritrocitarias sonicadas (SUVs). Medias con letras diferentes presentan diferencias significativas, $P < 0,0001$.

En el caso de los “ghosts” se ve una tendencia a la inhibición, la cual no es significativa, quizás debido a los valores tan pequeños. Por otro lado, es interesante destacar que las vesículas unilamelares pequeñas poseen, aproximadamente, seis veces más actividad que los eritrocitos vacíos (Tabla 7). Esto podría deberse a que el tratamiento de ultrasonificación no solo achica y homogeniza el tamaño de las vesículas, sino que las hace realmente unilamelares. Si bien se consideraba que los “ghosts” ya eran unilamelares, la evidencia lleva a pensar que luego de la purificación de las MEB algunas vesículas sean multilamelares o se encuentren agregadas disminuyendo la exposición de la enzima (fig. 8, a).

Es notable la disminución de la actividad de la AEB de los controles con metanol ($0,0036 \pm 0,0008 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$), en comparación con los controles de AEB en suspensión ($0,587 \pm 0,017 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ en fig. 12 y $0,277 \pm 0,023 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ en fig. 13). Estas enormes diferencias, de uno ($0,0307 \pm 0,0008 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ en el caso de SUVs) y dos órdenes de magnitud deben atribuirse al gran efecto tóxico del metanol (Tabla 7). Dada la poca solubilidad de la dpPS en cloroformo, la única solución fue disminuir la relación metanol/membrana en los siguientes experimentos, de $1\mu\text{l}/10\mu\text{l}$ a $1\mu\text{l}/100\mu\text{l}$ (encontrándose la membrana diluida $\frac{1}{2}$ con buffer).

Para confirmar la disminución de la diferencia de potencial de superficie inducido por el agregado de dpPS se realizaron isothermas de compresión π -A y ΔV -A (fig. 27). Se obtuvo una disminución de $\Delta\Delta V \sim 80\text{mV}$ lo cual coincide con la literatura [77] ya que se acerca al ΔV que poseen las isothermas de dpPS puras. Esta disminución del ΔV implica una disminución de la densidad de cargas negativas presentes en la interfase agua-cabezas polares. Esto se debe a la presencia de electrolitos en la subfase que forman una doble capa iónica de cargas positivas debido a la presencia de las cargas negativas de la dpPS. La isoterma π -A se mantuvo muy parecida al control. Se observó un área de colapso ligeramente mayor en la isoterma sin dpPC, quizás porque esta introduce más orden y permite un empaquetamiento mayor, de todas formas, esta diferencia tan mínima podría ser debido al error asociado a la reproducibilidad del control.

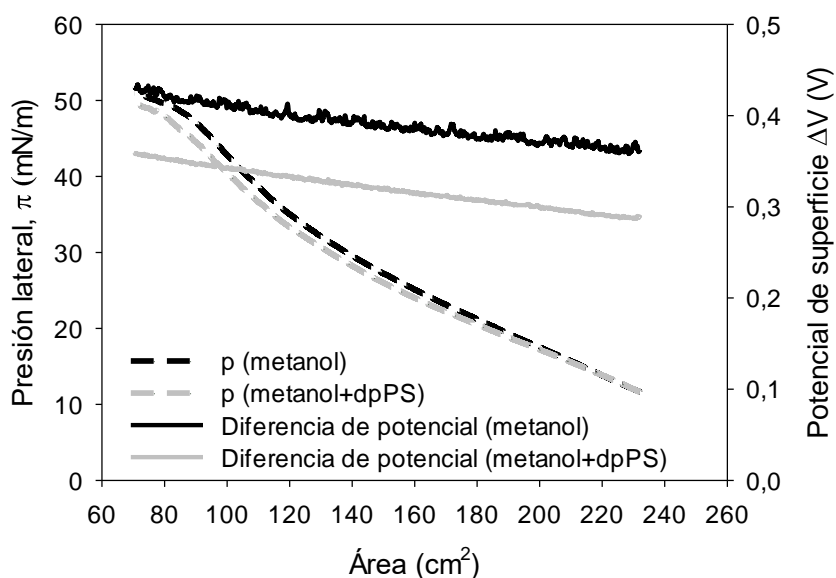


Figura 27. Isothermas de compresión π -A y ΔV -A obtenidas a partir de MEB incubada con un 7% de dpPS.

Finalmente, estas monocapas con y sin dpPS fueron transferidas al soporte sólido hidrofóbico mediante el método de Langmuir-Schaefer, de esta forma se garantiza que el efecto inhibitorio de la dpPS es debido a la introducción y modificación del ambiente en el cual está inserta la AEB y no por un mero efecto directo sobre el sitio activo. En la Figura 28 se observa tanto para el control con metanol como para la membrana con dpPS una inhibición a partir de 0,5 mM. Sin embargo, analizando el ajuste se podría pensar que

la enzima posee una cinética acorde al modelo de Michaelis y Menten a bajas concentraciones de sustrato. Si bien los ajustes de la ecuación de Michaelis-Menten no son muy buenos, la tendencia es clara e indican una gran inhibición de la enzima cuando el lípido negativo está inserto. La AEB presente en la monocapa con dpPS presentó una K_m de $0,3970 \pm 2,8967$ mM vs $0,0087 \pm 0,0304$ mM en el control y una $V_{m\acute{a}x}$ de $0,0014 \pm 0,0046$ nmol*min⁻¹*μg⁻¹ vs $0,0027 \pm 0,0009$ nmol*min⁻¹*μg⁻¹ para el control, sugiriendo un mecanismo de inhibición complejo. El mecanismo inhibitorio podría ser inespecífico y la disminución de la afinidad de AEB por el sustrato podría estar relacionada con que a pH fisiológico la carga negativa de la monocapa secuestre el sustrato catiónico (acetiltiocolina) no quedando disponible para unirse al sitio activo. Aún más, es posible que la unión al sitio activo se vea dificultada por un efecto dipolar (del potencial de superficie de toda la monocapa), ya que según vimos previamente la dpPS altera el potencial dipolar haciendo más positiva la región de las cabezas polares (al contrario de lo esperado). Sería interesante intentar repetir este experimento introduciendo dpPS sin solvente y también cambiando el pH del medio.

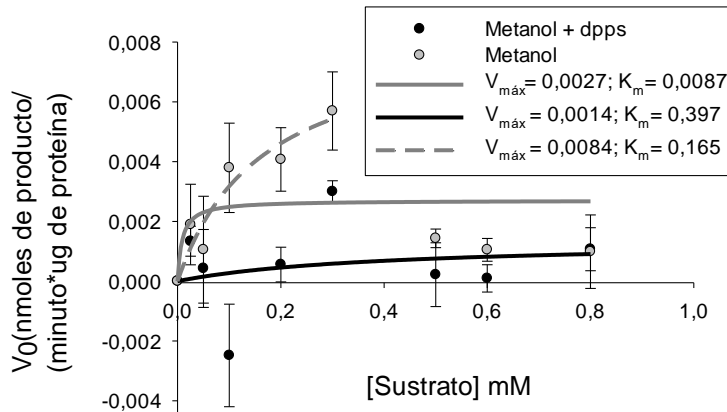


Figura 28. Actividad de AEB en una monocapa transferida a un soporte plano vs concentración de sustrato en presencia de dpPS. El análisis de la regresión fue obtenido aplicando la ecuación de Michaelis-Menten.

Tabla 7. Actividad de la AEB en diferentes sistemas, se observan cambios de curvatura y efecto del metanol.

V_0 (nmoles de producto / (minuto*μg de proteínas) con 0,3 mM de sustrato					
	Ghosts SIN metanol	SUVs (10% de metanol)	Ghosts (10% de metanol)	LS SIN metanol	LS (1% de metanol)
<i>NORMAL</i>	0,3	0,0307	0,0036	0,03	0,00569

IV. CONCLUSIONES

El ambiente en el cual se encuentra anclada la Acetilcolinesterasa Eritrocitaria Bovina es muy complejo. La introducción de terpenos logró modificar varios parámetros de la membrana tales como su fluidez, momento dipolar, organización de los dominios, etc. Dado que el cineol produjo un porcentaje de inhibición significativamente mayor sobre la AEB que el alcanfor y que este efecto se correlaciona con el mayor efecto del cineol sobre la organización de la membrana, es pertinente pensar que la sensibilidad de la AEB a los cambios en su entorno es considerable. Además, el cineol resultó ser mejor inhibidor que el alcanfor, contrariamente a lo esperado debido a los resultados revisados en bibliografía de modelado molecular [26], los cuales se ajustan al acomodamiento de las moléculas de MT al sitio activo. Por lo que la acción inhibitoria del alcanfor podría ser más sitio-específica que la de cineol, como vimos en los experimentos en LSMEB a 35 mN/m, donde ALC presentó un mecanismo de inhibición competitivo (fig. 22). Sin embargo, no podemos descartar que sea la estructura de la proteína la que cambia frente a las distintas condiciones de la membrana (cambios inducidos por los MT) explicando la sensibilidad de la actividad de AEB a los terpenos. Por esta razón sería interesante poder estudiar la enzima desanclada y analizar el efecto directo del cineol y el alcanfor, a su vez realizar ensayos de estructura/actividad contando con la enzima purificada.

En cuanto a los efectos en la membrana se vio una tendencia mucho mayor del cineol a reducir la anisotropía de la misma tanto al nivel más hidrofóbico como el más polar de la membrana. Se observó una diferencia de potencial de superficie mayor en la monocapa con cineol, al mismo tiempo que se vio una transición de fase menos cooperativa, y una capacidad de penetrar en la interfase a presiones bastante más altas que el alcanfor. También se observó la inducción de dominios más definidos, grandes y fluidos, por el cineol.

Por otro lado, los ensayos de actividad realizados en presencia de dpPS resultaron más clarificadores a la hora de relacionar biunívocamente el efecto en el entorno molecular de la enzima con su actividad, permitiendo llegar a la conclusión de que la actividad de la AEB

es sensible a los cambios en su ambiente molecular, pudiendo ser modulada inespecíficamente.

En cuanto a la contribución a la realización de un biosensor capaz de detectar la presencia de *Anaplasma marginale* y las modificaciones en el entorno de la enzima que este parásito genere, podemos concluir que: la AEB inmovilizada a 35mN/m (presión a la que se observó menos error en las mediciones y un mejor ajuste de la ecuación de Michaelis-Menten), fue capaz de conservar actividad, manteniendo la afinidad con el sustrato, aunque se observó una marcada disminución de la $V_{m\acute{a}x}$ y un cambio en el efecto ejercido por los inhibidores. La inmovilización en un vidrio plano produce un ambiente más anisotrópico con impedimentos estéricos pudiendo haber defectos en la transferencia que produzcan microambientes [78] donde la enzima, aislada del medio no puede ser alcanzada por el sustrato (Figura. 23). Mediante las micrografías de epifluorescencia podemos afirmar que la topología no se modifica de manera notable respecto a la monocapa en la interfase agua-aire original. Dada la gran sensibilidad que presentó la AEB a los cambios del entorno y la practicidad del sistema de incubación desarrollado, el próximo paso será enfrentar este sistema a un medio que contenga eritrocitos infectados con la bacteria *Anaplasma centrale* y analizar los cambios producidos en la actividad de AEB inmovilizada. Además, como la bacteria podría permanecer unida al mismo, podría ser visualizada luego de una tinción.

Otra razón para la disminución de la $V_{m\acute{a}x}$ podría ser que el porcentaje enzima/proteínas cambie y el valor obtenido sea consecuencia de esa menor cantidad de AEB en relación a la compleja composición proteica. Sería interesante comparar esta relación en vesículas y monocapas a través de electroforesis.

Para evaluar si estos cambios se deben a modificaciones conformacionales de las proteínas presentes en los distintos sistemas estudiados, se podría realizar experimentos mediante la técnica PM-IRRAS. También se podría evaluar cómo se modifica el espectro de fluorescencia de los residuos aromáticos.

Estos resultados abren una ventana de posibilidades a la hora de elegir productos naturales a la hora de enfrentar enfermedades o plagas. El cineol, más allá del mecanismo por el cual está actuando sobre la AEB, podría ser esta alternativa ya que posee una inhibición considerable sobre la misma.

En futuros experimentos sería muy interesante medir la actividad de la enzima (solubilizada) desanclada utilizando fosfolipasa C, ya que no hay registros de esto, además a partir de estos ensayos se podría dilucidar mucho mejor el mecanismo de los terpenos. Ya que se ha visto que la AEB purificada con detergentes conserva la hidrofobicidad [66] y presenta diferentes estados de agregación [65], esto podría explicar por qué nuestros resultados coinciden con los de otros trabajos (que utilizan la enzima purificada) y por ende no debemos descartar que el efecto de los terpenos sobre la enzima está influenciado por su entorno (la enzima puede estar formando parte de una micela).

Otra razón que nos hace pensar que los terpenos influyen la actividad de la AEB es la poca inhibición de los terpenos sobre la butirilacetilcolinesterasa, con la cual comparten un 60% de homología, y que es una enzima soluble [79].

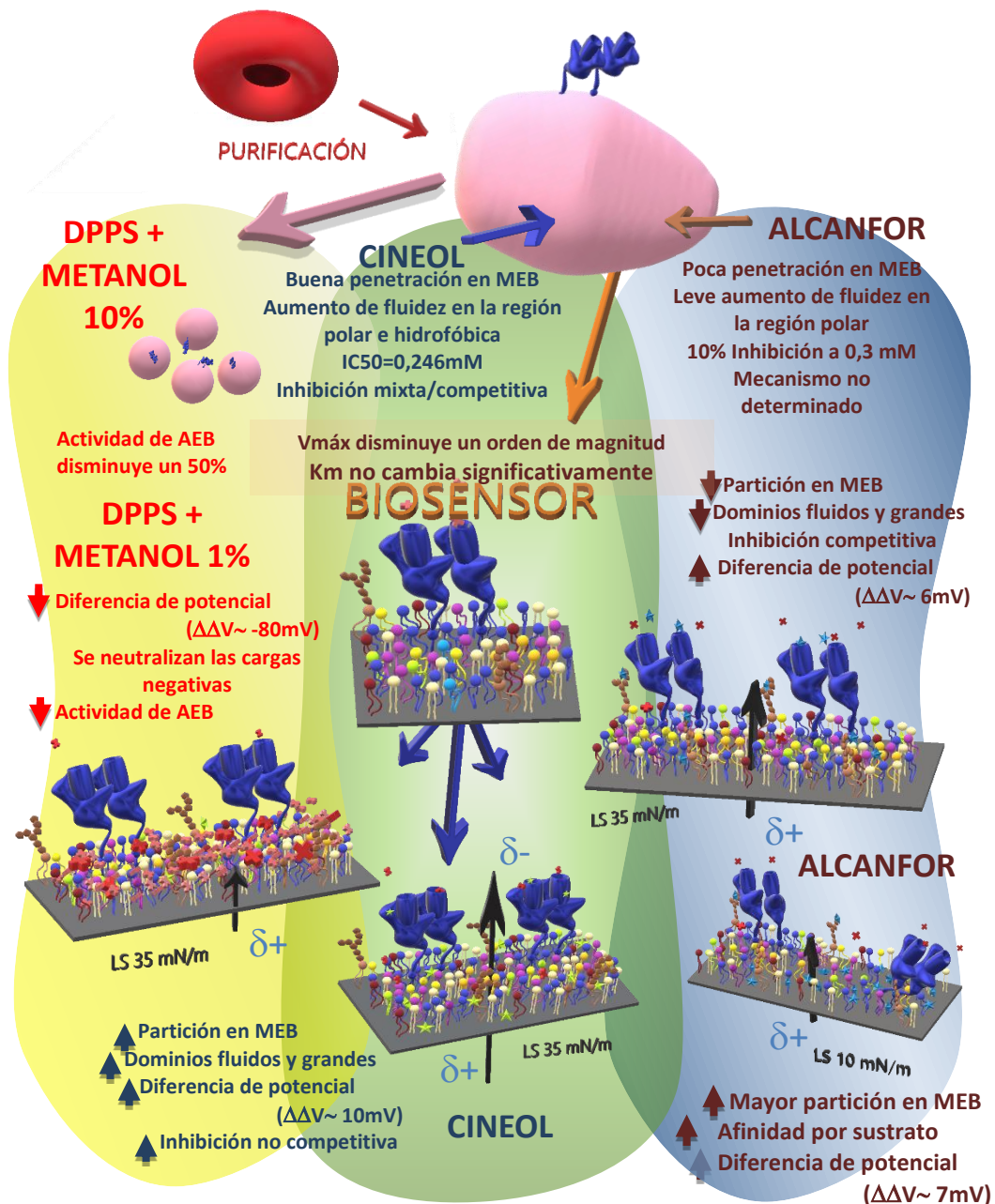
Además, sería interesante realizar estudios sobre la butirilacetilcolinesterasa. Una de las razones es su relevancia en el tratamiento paliativo del Mal de Alzheimer, ya que durante estadios avanzados de la enfermedad la acetilcolinesterasa presente en el cerebro desciende de 10% a 15% de su valor normal, al tiempo que la actividad de la butirilacetilcolinesterasa aumenta 40-90% [79].

Si bien estos estudios aportan al uso de terpenos como insecticidas o fármacos, los efectos in vivo suelen no estar correlacionados, primero porque in vivo la farmacocinética cumple un rol clave, más allá de la farmacodinamia estudiada in vitro. Por otro lado, están los mecanismos regulatorios del organismo, que seguramente intentara compensar las grandes cantidades de ACh sobre-expresando la enzima. Respecto a esto es esperable que la naturaleza liposoluble de los terpenos, faciliten su llegada al cerebro y penetración de la BHE. Estudios con *Salvia lavandulaefolia* in vivo demostraron su efectividad en el tratamiento de enfermedad cognitivas [74-76], lo que hace interesante continuar tratando

de clarificar el mecanismo inhibitorio del cineol y el alcanfor para entender el posible efecto sinérgico que poseen[69].

Por último, sería interesante estudiar la acetilcolinesterasa presente en las neuronas o al menos estudiar la AEB, por su fácil acceso, pero introduciéndole modificaciones. Se ha visto una mayor glicosidación de la AEB [80].

Figura 29. Esquema que resume los resultados obtenidos en el trabajo.



V. BIBLIOGRAFÍA

1. Heider, H., et al., *Comparative Studies on the Primary Structure of Acetylcholinesterases from Bovine Caudate Nucleus and Bovine Erythrocytes*. Cellular and Molecular Neurobiology, 1991. **11(1)**: p. 105-118.
2. Roberts, W.L., et al., *Lipid Analysis of the Glycoinositol Phospholipid Membrane Anchor Human Erythrocyte Acetylcholinesterase of Human Erythrocyte Acetylcholinesterase*. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1998. **263 (35)**: p. 18766-18775.
3. Soreq, H. and S. Seidman, *Acetylcholinesterase — new roles for an old actor*. Nature Reviews Neuroscience, 2001. **2**: p. 294-302.
4. Froede, H.C. and I.B. Wilson, *Direct Determination of Acetyl-enzyme Intermediate in the Acetylcholinesterase-catalyzed Hydrolysis of Acetylcholine and Acetylthiocholine*. The Journal of Biological Biochemistry, 1984. **259 (17)**: p. 11010-11013.
5. Ripoll, D.R., et al., *An electrostatic mechanism for substrate guidance down the aromatic gorge of acetylcholinesterase*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1993. **90(11)**: p. 5128-5132.
6. Tara, S., et al., *Rapid binding of a cationic active site inhibitor to wild type and mutant mouse acetylcholinesterase: Brownian dynamics simulation including diffusion in the active site gorge*. Biopolymers 1998. **46**: p. 465-474.
7. Shafferman, A., et al., *Electrostatic attraction by surface charge does not contribute to the catalytic efficiency of acetylcholinesterase*. The EMBO Journal, 1994. **13(15)**: p. 3448-3455.
8. Radić, Z., et al., *Electrostatic Influence on the Kinetics of Ligand Binding to Acetylcholinesterase*. The Journal of Biological Chemistry, 1997. **272 (37)**: p. 23265-23277.
9. Shafferman, A., et al., *Substrate inhibition of acetylcholinesterase: residues affecting signal transduction from the surface to the catalytic center*. The EMBO Journal, 1992. **11 (10)**: p. 3561-3568.
10. Di Bari, M., et al., *Dysregulated Homeostasis of Acetylcholine Levels in Immune Cells of RR-Multiple Sclerosis Patients*. International Journal of Molecular Sciences, 2016. **17(12)**.
11. Clop, E.M. and M.A. Perillo, *Langmuir films from human placental membranes: preparation, rheology, transfer to alkylated glasses, and sigmoidal kinetics of alkaline phosphatase in the resultant Langmuir-Blodgett film*. Cell Biochem Biophys, 2010. **56(2-3)**: p. 91-107.
12. Felsztyna, I., *Modulación de la actividad enzimática de la Acetilcolinesterasa Eritrocitaria Bovina en membranas naturales transferidas a filmes de Langmuir-Blodgett*. Tesina de grado de la carrera Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Córdoba, 2015.
13. Marín, R., A. Arce, and I. Martijena, *Recruitment of peripheral-type benzodiazepine receptors after acute stress in chick forebrain membranes: action of Triton X-100*. Neurochemistry International, 1996. **28**: p. 425-429.
14. Sanchez, M.E., et al., *Surface activity of thymol: implications for an eventual pharmacological activity*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2004. **34(2)**: p. 77-86.
15. Alberts, B., et al., *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 2002. **4th Ed.**: p. 1781.
16. Akthar, M.S., B. Degaga, and T. Azam, *Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review*. Issues in Biological Sciences and

- Pharmaceutical Research, 2014. **2 (1)**: p. 1-7.
17. Hamidpour, R., et al., *Camphor (Cinnamomum camphora), a traditional remedy with the history of treating several diseases*. International Journal of Case Reports and Images, 2013. **4(2)**: p. 86–89.
 18. Juergens, U.R., et al., *Anti-inflammatory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial*. RESPIRATORY MEDICINE, 2003. **97**: p. 250-256.
 19. Turina, A.V., et al., *Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning*. Biophys Chem, 2006. **122(2)**: p. 101-13.
 20. Zunino, M.P., et al., *Stereoselective effects of monoterpenes on the microviscosity and curvature of model membranes assessed by DPH steady-state fluorescence anisotropy and light scattering analysis*. Chirality, 2011. **23(10)**: p. 867-877.
 21. Turina, A.V., *Modulación de la actividad del receptor gaba-a inducida por cambios en la organización de su entorno molecular en membranas naturales y artificiales*. Universidad Nacional de Córdoba, 2007: p. 200.
 22. Turina, A.d.V. and M.A. Perillo, *Monoterpenes affect chlorodiazepoxide-micelle interaction through micellar dipole potential modifications*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2003. **1616(2)**: p. 112-120.
 23. Kohlert, C., et al., *Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animals and humans*. Planta Med, 2000. **66(6)**: p. 495-505.
 24. Inestrosa, N.C., et al., *Acetylcholinesterase Accelerates Assembly of Amyloid-beta-Peptides into Alzheimer's Fibrils: Possible Role of the Peripheral Site of the Enzyme*. Neuron, 1996. **16**: p. 881-891.
 25. Howes, M.J., N.S. Perry, and P.J. Houghton, *Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders*. Phytother Res, 2003. **17(1)**: p. 1-18.
 26. Awasthi, M., et al., *Terpenoids as promising therapeutic molecules against Alzheimer's disease: amyloid beta- and acetylcholinesterase-directed pharmacokinetic and molecular docking analyses*. Molecular Simulation, 2017. **44(1)**: p. 1-11.
 27. Kovar, K.A., et al., *Blood Levels of 1,8-Cineole and Locomotor Activity of Mice After Inhalation and Oral Administration of Rosemary Oil*. Planta Medica, 1987 **53(4)**: p. 315-318.
 28. Miyazawa, M. and C. Yamafuji, *Inhibition of Acetylcholinesterase Activity by Bicyclic Monoterpenoids*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2005. **53**: p. 1765–1768.
 29. Miyazawa, M. and C. Yamafuji, *Inhibition of acetylcholinesterase activity by tea tree oil and constituent terpenoids*. Flavour and Fragrance Journal, 2006. **21(2)**: p. 198-201.
 30. Savelev, S., et al., *Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in Salvia lavandulaefolia essential oil*. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2003. **75(3)**: p. 661-668.
 31. Abdelgaleil, S.A., et al., *Fumigant and contact toxicities of monoterpenes to Sitophilus oryzae (L.) and Tribolium castaneum (Herbst) and their inhibitory effects on acetylcholinesterase activity*. J Chem Ecol, 2009. **35(5)**: p. 518-25.
 32. Herrera, J.M., et al., *Terpene ketones as natural insecticides against Sitophilus zeamais*. Industrial Crops and Products, 2015. **70**: p. 435-442.
 33. Lee, S.-E., et al., *Fumigant toxicity of volatile natural products from Korean spices and medicinal plants towards the rice weevil, Sitophilus oryzae (L.)*. Pest Management Science, 2001. **57**: p. 548-553.

34. Seo, S.M., et al., *Fumigant toxicity and acetylcholinesterase inhibitory activity of 4 Asteraceae plant essential oils and their constituents against Japanese termite (Reticulitermes speratus Kolbe)*. Pestic Biochem Physiol, 2014. **113**: p. 55-61.
35. Ristic, M. and J.R. Kreir, *Anaplasma*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1984. **1**: p. 719-722.
36. Kocan, K.M., et al., *The natural history of Anaplasma marginale*. Veterinary Parasitology, 2010. **167**(2): p. 95-107.
37. Nikolelis, D.P., M.G. Tzanelis, and U.J. Krull, *Electrochemical transduction of the acetylcholine-acetylcholinesterase reaction by bilayer lipid membranes*. Analytica Chimica Acta, 1993. **281**(3): p. 569-576.
38. Corona, B., M. Rodríguez, and S. Martínez, *Anaplasmosis bovina*. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, 2005. **VI (4)**: p. 1-27
39. Chen, P.S., T.Y. Toribara, and H. Warner, *Microdetermination of Phosphorus*. Analytic Chemistry, 1956. **28**(11): p. 1756-1758.
40. Gaines, G.L., *Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces*. New York: Interscience Publishers, 1966.
41. Zasadzinski, J.A., et al., *Langmuir-Blodgett films*. Science, 1994. **263**: p. 1726-1733.
42. W, H.C. and D.R. C, *Submicron structure in L-alpha-dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers and bilayers probed with confocal, atomic force, and near-field microscopy*. Biophys J, 1998. **75**(1): p. 342-353.
43. Rosetti, C.M., B. Maggio, and R.G. Oliveira, *The self-organization of lipids and proteins of myelin at the membrane interface. Molecular factors underlying the microheterogeneity of domain segregation*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2008. **1778**(7-8): p. 1665-75.
44. El-Nahhal, I.M. and N.M. El-Ashgar, *A review on polysiloxane-immobilized ligand systems: Synthesis, characterization and applications*. Journal of Organometallic Chemistry 2007. **692**: p. 2861-2886.
45. Ariga, K., T. Nakanishi, and T. Michinobu, *Immobilization of biomaterials to nano-assemblies films (self-assembled monolayers, Langmuir-Blodgett films, and layer-by-layer assemblies) and their related functions*. J. Nanosci. Nanotechnol., 2006. **6**(8): p. 2278-2301.
46. Khomutov, G.B., *Interfacially formed organized planar inorganic, polymeric and composite nanostructures* Advances in Colloid and Interface Science, 2004. **111**(1-2): p. 79-116.
47. Dettin, M., et al., *Chemoselective Surface Immobilization of Proteins through a Cleavable Peptide*. Bioconjugate Chem., 2011.
48. Turina, A.V., et al., *A surface active benzodiazepine receptor ligand for potential probing membrane order of GABAA-receptor surroundings*. Bioconjug Chem, 2008. **19**(9): p. 1888-95.
49. Turina, A.V., et al., *Surface active benzodiazepine-bromo-alkyl conjugate for potential GABAA-receptor purification*. Org Biomol Chem, 2011. **9**(16): p. 5737-47.
50. Pierotti, S., et al., *Development of nanostructured surfaces functionalized with a GABAA receptor ligand*. . XLI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica. Tucuman-Argentina., 2012.
51. Clop, E.M., et al., *Molecular packing tunes the activity of Kluyveromyces lactis beta-galactosidase incorporated in Langmuir-Blodgett films*. Langmuir, 2008. **24**(19): p. 10950-60.
52. Clop, P.D., *"Confinamiento de β -Galactosidasa en ambientes de dimensionalidad restringida. Implicancias en la Bioquímica Celular y el*

- diseño de biosensores” 2013, Universidad Nacional de Córdoba.
53. Ronzon, F., et al., *Behavior of a GPI-anchored protein in phospholipid monolayers at the air-water interface*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1560**(1-2): p. 1-13.
 54. Dodge, J.T., C. Mitchell, and D.J. Hanahan, *The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1963. **100**: p. 119-130.
 55. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the folin phenol reagent*. The Journal of Biological Biochemistry, 1951. **193**: p. 265-275.
 56. Fiske, C.H. and S. Y., *The colorimetric determination of phosphorus*. The journal of biological chemistry, 1925. **LXVI (2)**: p. 375-400.
 57. Ellman, G.L., et al., *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*. Biochemical Pharmacology, 1961. **7**: p. 88-95.
 58. Szabo, A.G., *Spectrophotometry and Spectrofluorimetry*. 2000: Oxford University press.
 59. Lakowicz, J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy. Third Edition*. New York: Springer, 2006.
 60. Verger, R. and F. Pattus, *Spreading of membranes at the air/water interface*. Chemistry and Physics of Lipids, 1976. **16**(4): p. 285-291.
 61. Perillo, M.A., et al., *Molecular parameters of semisynthetic derivatives of gangliosides and sphingosine in monolayers at the air-water interface*. Chemistry and Physics of Lipids, 1993. **65**: p. 225-238.
 62. von Tscharner, V. and H. McConnell, *Physical properties of lipid monolayers on alkylated planar glass surfaces*. Biophys J., 1981. **36 (2)**: p. 421-7.
 63. Baumgart, T., et al., *Fluorescence probe partitioning between Lo/Ld phases in lipid membranes*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1768**(9): p. 2182-94.
 64. Nicolette S. L., P., et al., *In-vitro Inhibition of Human Erythrocyte Acetylcholinesterase by Salvia lavandulaefolia Essential Oil and Constituent Terpenes*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2000. **52**(7): p. 895-902.
 65. Ott, P., B. Jenny, and U. Brodbeck, *Multiple Molecular Forms of Purified Human Erythrocyte Acetylcholinesterase*. Eur. J. Biochem., 1975. **37**: p. 469-480.
 66. Taguchi, R. and H. Ikezawa, *Properties of Bovine Erythrocyte Acetylcholinesterase Solubilized by Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C1*. J. Biochem., 1987. **102**: p. 803-811.
 67. Xie, H.Q., et al., *Targeting acetylcholinesterase to membrane rafts: a function mediated by the proline-rich membrane anchor (PRiMA) in neurons*. J Biol Chem, 2010. **285**(15): p. 11537-46.
 68. Toutant, J.-P., *Insect acetylcholinesterase: Catalytic properties, tissue distribution and molecular forms*. Progress in Neurobiology, 1989. **32**(5): p. 423-446.
 69. Miyazawa, M., et al., *Inhibition of Acetylcholinesterase Activity by Essential Oils of Mentha Species*. J. Agric. Food Chem., 1998 **46**: p. 3431-3434.
 70. Gracza, L., *Molecular Pharmacological Investigation of Medicinal Plant Substances. II. Inhibition of Acetylcholinesterase by Monoterpene Derivatives in vitro*. Zeitschrift für Naturforschung C, 2014. **40.3-4**: p. 151-153.
 71. Kitphati, W., et al., *Anticholinesterase of essential oils and their constituents from Thai medicinal plants on purified and cellular enzymes*. JAASP, 2012. **1 (1)**: p. 58-67.
 72. Turina, A.V., *Modulación de la actividad del receptor GABAA inducida por cambios en la organización de su entorno*

molecular en membranas naturales y artificiales. TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba. Directora: Dra. María Angélica Perillo., 2007.

Neurochemistry 1992. **58 (4)**: p. 1230-1238.

73. Li, H. and G. Lykotrafitis, *Erythrocyte membrane model with explicit description of the lipid bilayer and the spectrin network*. Biophys J, 2014. **107(3)**: p. 642-653.
74. Tildesley, N.T.J., et al., *Salvia lavandulaefolia (Spanish Sage) enhances memory in healthy young volunteers*. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2003. **75(3)**: p. 669-674.
75. Perry, N.S., et al., *Salvia lavandulaefolia essential oil inhibits cholinesterase in vivo*. Phytomedicine, 2002. **9(1)**: p. 48-51.
76. Kennedy, D.O., et al., *Monoterpenoid extract of sage (Salvia lavandulaefolia) with cholinesterase inhibiting properties improves cognitive performance and mood in healthy adults*. J Psychopharmacol, 2011. **25(8)**: p. 1088-100.
77. Brockman, H., *Dipole potential of lipid membranes*. Chemistry and Physics of Lipids, 1994. **73(1)**: p. 57-79.
78. Pattus, F., et al., *Further studies on the spreading of biomembranes at the air/water interface Structure, composition, enzymatic activities of human erythrocyte and sarcoplasmic reticulum membrane films*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1981. **647(1)**: p. 29-39.
79. Savelev, S.U., E.J. Okello, and E.K. Perry, *Butyryl- and acetyl-cholinesterase inhibitory activities in essential oils of Salvia species and their constituents*. Phytother Res, 2004. **18(4)**: p. 315-24.
80. Liao, J., et al., *Different Glycosylation in Acetylcholinesterases from Mammalian Brain and Erythrocytes*. Journal of