



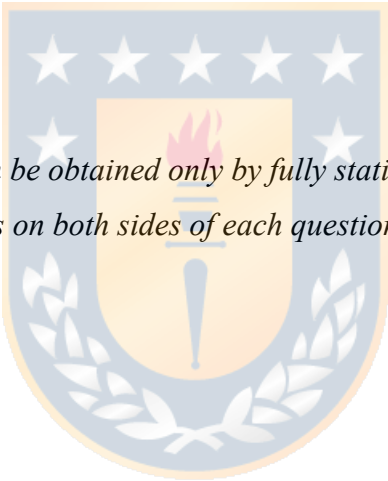
Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Químicas  
Programa de Doctorado en Ciencias con mención en Química

**DETERMINACIÓN EN MEMBRANAS CELULARES Y  
MODELOS MOLECULARES DEL EFECTO  
PROTECTOR DE DROGAS UTILIZADAS EN LA  
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en  
Química

PABLO ANDRÉS ZAMBRANO LOBOS  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2019

Profesor Guía: Dr. Mario Suwalsky Weinsymer  
Dpto. de Polímeros, Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad de Concepción



*“A fair result can be obtained only by fully stating and balancing the facts and arguments on both sides of each question; and this is here impossible.”*

Charles Darwin<sup>1</sup>

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo expresar mi más profundo agradecimiento al Dr. Mario Suwalsky por acogerme en su laboratorio durante varios años y por enseñarme a caminar por los senderos de la ciencia. Al mismo tiempo, agradezco a los siguientes profesores e investigadores por sus aportes en mi investigación: a la Dra. Malgorzata Jemiola-Rzeminska (Universidad Jagiellónica, Cracovia, Polonia) y al Dr. Kazimierz Strzalka (Universidad Jagiellónica, Cracovia, Polonia) por facilitar mi estadía en el Malopolskie Centre of Biotechnology (Cracovia, Polonia) y por recibirme siempre tan cálidamente en ese país. Al Dr. Diego Muñoz-Torrero (Universidad de Barcelona, España) por facilitarme los compuestos híbridos estudiados en esta tesis doctoral. A los miembros de la comisión revisora de esta tesis doctoral: Dr. Julio Belmar, Dr. Bruno Urbano y Dr. Luis Aguayo por sus múltiples críticas y aportes al borrador de este texto. De igual manera agradezco a la Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción y al Director de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas, Dr. Rafael García por la ayuda brindada en todos mis años de estudios doctorales. A CONICYT, por la Beca de Doctorado Nacional N° 2116037, la cual fue fundamental para el término de esta tesis.

Por último, deseo expresar mi gratitud a mis amigos (a quienes no nombraré en su totalidad por miedo a olvidar alguno), especialmente a David Sáez por su interesante compañía y por sus conversaciones que siempre he considerado como un punto fuera de la curva, y a Maximiliano Riquelme, por su compañía, calidez y carisma siempre presentes. A mis compañeros de laboratorio Karla Petit y José Rodolfo Colina por sus aportes científicos y su siempre grata compañía.

A mi pareja, Katerina Medrano, por su apoyo, comprensión, amor y compañía durante el proceso de escritura de este manuscrito y además, por mostrarme otras aristas y puntos de vista del arte, la música y la vida.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia: a mis hermanos Daniela y Patricio, y especialmente a mis padres Mariabet y Carlos, por su infinita paciencia y por su amor interminable, a ellos dedico todas estas páginas.

## ABREVIACIONES.

A $\beta$ : beta-amiloide

AChE: enzima acetilcolinesterasa

DMPC: dimiristoilfosfatidiletanolamina

DMPC: dimiristoilfosfatidilcolina

DPH: 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno

DSC: calorimetría diferencial de barrido

EA: Enfermedad de Alzheimer

IUM: membranas no selladas de eritrocitos

Laurdan: 6-Dodecanoil-2-dimetilaminonaftaleno

LUV: vesículas unilamelares grandes

MLV: vesículas multilamelares

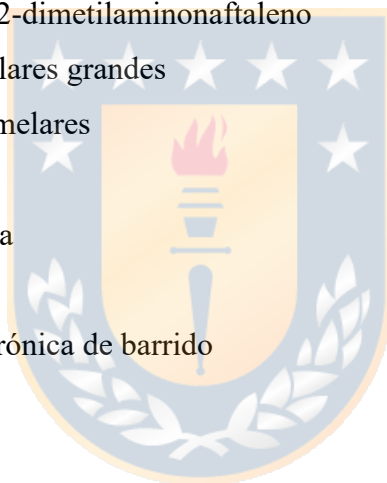
PC: fosfatidilcolina

PE: fosfatidiletanolamina

SA: ángulo bajo

SEM: microscopía electrónica de barrido

WA: ángulo ancho



## RESUMEN.

El péptido beta amiloide ( $A\beta$ ) es tóxico para las neuronas. Desde hace más de una década se han examinado los efectos de medicamentos que tienen una acción inhibitoria de la acetilcolinesterasa, con lo cual se han mejorado algunos problemas que trae la Enfermedad de Alzheimer (EA). Sin embargo, es necesario remarcar que en la actualidad la efectividad obtenida con dichos fármacos es baja y no se ha conseguido alterar el curso de la demencia. En el año 2013 se logró diseñar y sintetizar una familia de drogas derivadas de huprina con la finalidad de atacar objetivos clave en la EA. Estas moléculas poseen una potente actividad antiagregante del péptido  $A\beta$  y mejora la conducta en animales de experimentación. En la actualidad no existe información acerca del efecto de estas moléculas sobre membranas celulares humanas por lo que se consideró interesante estudiar los efectos de esta familia de moléculas sobre modelos de membranas y eritrocitos humanos *in vitro* y examinar su efecto protector el cual aún no ha sido demostrado. En la presente tesis doctoral se estudió además el efecto de drogas utilizadas en el tratamiento farmacológico de la EA en Chile (memantina, donepezilo y rivastigmina) sobre membranas celulares y glóbulos rojos humanos y el posible efecto protector de tres compuestos híbridos (reína-huprina) frente al efecto tóxico del  $A\beta$  en membranas biológicas. Esta investigación se desarrolló usando las técnicas de difracción de rayos X, espectroscopía de fluorescencia y calorimetría diferencial de barrido (DSC) sobre modelos moleculares de membrana constituidos por multibicapas lipídicas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE), que corresponden a fosfolípidos representativos de la monocapa externa e interna respectivamente de la mayoría de membranas plasmáticas y que también forman parte de la composición lipídica de las membranas neuronales. Además, se estudió el efecto de las drogas en la morfología de eritrocitos humanos mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Los resultados experimentales demostraron los efectos de memantina (antagonista del receptor NMDA) donepezilo y rivastigmina (ambos inhibidores de la enzima AChE). Además, se demostró un efecto protector de la

membrana de tres híbridos huprina frente al efecto de los péptidos amiloides  $A\beta(1-40)$  y  $A\beta(1-42)$ .



## SUMMARY.

$\beta$ -amyloid peptide ( $A\beta$ ) is toxic to neurons. For more than a decade the effects of drugs that have an inhibitory action of acetylcholinesterase have been examined, which has improved some problems in the Alzheimer's Disease (AD). However, it should be noted that at present the effectiveness obtained with these drugs is very low, as the underlying dementia has not been altered. In 2013, a family of drugs derived from huprine was designed and synthesized with the aim of attacking key objectives in the AD. These molecules have a potent antiplatelet activity of the  $A\beta$  peptide and improve behavior in experimental animals. Currently there is no information about the effect of these molecules on human cell membranes, so it was considered of interest to study the effects of this family of molecules on membrane models and human erythrocytes *in vitro* and examine their protective effect which has not yet been demonstrated. In the present doctoral thesis, the effect of drugs used in the pharmacological treatment of AD in Chile (memantine, donepezil and rivastigmine) on human cell membranes and red blood cells was studied and also the possible protective effect of three hybrid compounds (huprine hybrids) against the toxic effect of  $A\beta$  on biological membranes. This research was developed using X-ray diffraction, fluorescence spectroscopy and differential scanning calorimetry (DSC) on molecular models of membrane these consisted in lipid multibilayers built-up of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and dimyristoylphosphatidylethanolamine (DMPE), corresponding to representative phospholipids of the outer and inner monolayer respectively of most plasma membranes and neuronal membranes. In addition, the effect of drugs on the morphology of human erythrocytes was studied by scanning electron microscopy (SEM). The experimental results demonstrated the effects of memantine (NMDA receptor antagonist) donepezil and rivastigmine (both inhibitors of the AChE enzyme) on human erythrocytes. In addition, a protective effect of the membrane of three hybrid hybrids against the effect of amyloid peptides  $A\beta$  (1-40) and  $A\beta$  (1-42) was demonstrated.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	v
SUMMARY.....	vii
INDICE DE FIGURAS.....	x
INDICE DE TABLAS.....	xvi
<i>1. INTRODUCCIÓN.....</i>	<i>1</i>
1.1 Enfermedad de Alzheimer y péptido $\beta$ - amiloide ( $A\beta$ ).....	1
<i>2. MEMBRANAS CELULARES.....</i>	<i>11</i>
2.1 Lípidos de membrana.....	13
2.2 Proteínas de membrana.....	15
2.3 Fluidez de la membrana.....	16
2.4 Arquitectura asimétrica de las membranas.....	17
2.5 Modelos de membranas.....	18
<i>3. TÉCNICAS UTILIZADAS PARA EL ESTUDIO DE INTERACCIÓN DE DROGAS CON MEMBRANAS CELULARES.....</i>	<i>23</i>
3.1 Difracción de rayos X.....	23
3.2 Espectroscopía de fluorescencia.....	26
3.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	28
3.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	29
<i>4. HIPÓTESIS.....</i>	<i>33</i>
<i>5. OBJETIVOS.....</i>	<i>33</i>
5.1 Objetivos Generales.....	33
5.2 Objetivos Específicos.....	33
<i>6. METODOLOGÍA.....</i>	<i>35</i>
6.1 Estudio por difracción de rayos X.....	35
6.2 Espectroscopía de fluorescencia de vesículas unilamelares grandes (LUV) y membranas aisladas de eritrocitos humanos sin sellar (IUM).....	36
6.3 Análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de vesículas multilamelares (MLV) de DMPC y DMPE.....	37
6.4 Estudio por microscopía electrónica de barrido (SEM).....	38
<i>7. RESULTADOS.....</i>	<i>39</i>
7.1 Estudios por difracción de rayos X.....	39



7.2	Espectroscopía de fluorescencia de vesículas unilamelares grandes (LUV) y membranas aisladas de eritrocitos humanos sin sellar (IUM).....	49
7.3	Análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de vesículas multilamelares (MLV) de DMPC y DMPE. ....	54
7.4	Estudio por microscopía electrónica de barrido (SEM). ....	70
8.	<i>DISCUSIÓN</i> .....	91
8.1	Acerca de la interacción de moléculas terapéuticas anti-Alzheimer con membranas celulares de eritrocitos humanos y modelos moleculares. ....	91
8.2	Péptido A $\beta$ e híbridos de huprina. ....	100
9.	<i>CONCLUSIONES GENERALES</i> . ....	103
10.	<i>REFERENCIAS</i> . ....	105
11.	<i>ANEXOS</i> .....	122
11.1	TABLAS DE ÁREAS BAJO LA CURVA OBTENIDAS DESDE LOS PATRONES DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X.....	122
11.2	TABLAS EXPERIMENTALES DE ESPECTROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA. ....	127
11.3	TABLAS DE PARÁMETROS TERMODINÁMICOS OBTENIDOS MEDIANTE CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC).....	131
12.	<i>PUBLICACIONES GENERADAS EN ESTA TESIS DOCTORAL</i> . ....	139
12.1	Publicaciones generadas a partir de esta tesis. ....	139
12.2	Otras publicaciones generadas por el autor durante los estudios doctorales.....	139
12.3	Publicaciones de divulgación en revistas internacionales.....	139
12.4	Participación en congresos nacionales e internacionales durante los estudios doctorales.....	140
12.5	Primer artículo.....	141
12.6	Segundo artículo.....	148
12.7.	Tercer artículo.....	153

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estructural de memantina, donepezilo y rivastigmina. ....	6
Figura 2: Síntesis del esqueleto molecular base de las huprinas. ....	7
Figura 3: Fórmula estructural de reína.....	7
Figura 4: Estructura general de híbridos reína-huprina. ....	8
Figura 5: <i>Híbrido 1 (H1)</i> . (–)-(7S,11S)-3-Cloro-12-[(3-{4-[(5,6-dimetoxi-indan-2-il)metil]piperidin-1-il}propil)amino]-6,7,10,11-tetrahidro-9-metil-7,11-metanocicloocta[b]quinolina (dihydrochloride). ....	8
Figura 6: <i>Híbrido 2 (H2)</i> . (–)-(7S,11S)-3-Cloro-6,7,10,11-tetrahidro-9-metil-12-({7-[(1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-il)amino]heptil}amino)-7,11-methanocicloocta[b]quinolina (dihydrochloride) ....	9
Figura 7: <i>Híbrido 3 (H3)</i> . (+)-N-{9-[(3-Cloro-6,7,10,11-tetrahidro-9-metil-7,11-metanocicloocta[b]quinolin-12-il)amino]nonil}-9,10-dihidro-4,5-dihidroxi-9,10-dioxoantraceno-2-carboxamida (hydrochloride). ....	9
Figura 8: Modelo de mosaico fluido de Singer & Nicholson (1974) actualmente aceptado de la membrana celular. ....	12
Figura 9: Movimientos posibles para las moléculas de fosfolípidos en una bicapa lipídica. ....	14
Figura 10: Estructura de los fosfolípidos más abundantes en las membranas biológicas. De izquierda a derecha: fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilcolina y esfingomielinas <sup>99</sup> . ....	14
Figura 11: Esquema de proteínas de membrana características en una membrana celular. ....	15
Figura 12: Transición de estado en una bicapa lipídica entre la fase gel y la de cristal-líquido en función de la temperatura. ....	17
Figura 13: Composición lipídica asimétrica entre las monocapas de la membrana. (A) membrana de eritrocito humano, (B) Membrana plasmática de hígado de rata, (C) Membrana plasmática de plaquetas de cerdo. (D) Envoltura de VSV crecido en células BHQ-21. ....	18
Figura 14: Empaquetamientos de las moléculas de fosfolípidos en medio acuoso. Las formas cónicas forman micelas, mientras que las cilíndricas forman bicapas. ....	20
Figura 15: Estructura química de la dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE). ....	21
Figura 16: Esquema bidimensional del empaquetamiento molecular de (a) dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y (b) dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE). ....	22
Figura 17: Esquema de rayos X difractados. El cristal difracta el haz de rayos X y produce una distribución regular de puntos sobre una placa fotográfica. ....	24
Figura 18: Esquema de rayos X difractados por una muestra en polvo. ....	25

Figura 19: Estructuras químicas de Laurdan y DPH y su ubicación aproximada frente a una molécula de DMPC. ....	27
Figura 20: Perfil de capacidad de calor (Cp) esquemático que muestra las temperaturas de pretransición y transición principal de fase. ....	28
Figura 21: Representación esquemática de la obtención de una imagen en un microscopio electrónico de barrido. ....	30
Figura 22: Representación esquemática de la hipótesis del par bicapa. ....	31
Figura 23: Imagen de formas alteradas de eritrocitos: discocitos normales (D); estomatocitos (S) y equinocitos (E) obtenida mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). ....	32
Figura 24: Microdensitogramas de difracción de rayos X de multibicapas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) con agua (H <sub>2</sub> O) y soluciones acuosas de (A) memantina, (B) donepezilo y (C) rivastigmina. SA y WA corresponden a reflexiones de ángulo bajo y ancho respectivamente. ....	39
Figura 25: Microdensitogramas de difracción de rayos X de multibicapas de dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE) con agua (H <sub>2</sub> O) y disoluciones acuosas de (A) memantina, (B) donepezilo y (C) rivastigmina. SA y WA corresponden a reflexiones de ángulo bajo y ancho respectivamente. ....	40
Figura 26: Microdensitogramas de difracción de rayos X de multibicapas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) con agua (H <sub>2</sub> O) y soluciones acuosas de (A) Híbrido 1, (B) Híbrido 2 y (C) Híbrido 3. SA y WA corresponden a reflexiones de ángulo bajo y ancho respectivamente. ....	41
Figura 27: Microdensitogramas de difracción de rayos X de multibicapas de dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE) con agua (H <sub>2</sub> O) y soluciones acuosas de (A) Híbrido 1, (B) Híbrido 2 y (C) Híbrido 3. SA y WA corresponden a reflexiones de ángulo bajo y ancho respectivamente. ....	42
Figura 28: Microdensitogramas de difracción de rayos X de multibicapas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) con agua (H <sub>2</sub> O) y soluciones de (A) péptido Aβ (1-40) y péptido Aβ (1-42). SA y WA corresponden a reflexiones de ángulo bajo y ancho respectivamente. ....	43
Figura 29: Microdensitogramas de difracción de rayos X de multibicapas de dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE) con agua (H <sub>2</sub> O) y soluciones de (A) péptido Aβ (1-40) y péptido Aβ (1-42). SA y WA corresponden a reflexiones de ángulo bajo y ancho respectivamente. ....	44
Figura 30: Microdensitogramas de difracción de rayos X de multibicapas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) incubadas con agua (H <sub>2</sub> O), péptido Aβ (1-40) 30 μM y diferentes concentraciones de híbrido (A) H1; (B) H2 y (C) H3. SA y WA corresponden a reflexiones de ángulo bajo y ancho, respectivamente. ....	46
Figura 31: Microdensitogramas de difracción de rayos X de multibicapas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) incubadas con agua (H <sub>2</sub> O), péptido Aβ (1-42) 20 μM y diferentes concentraciones de híbrido (A) H1; (B) H2 y (C) H3. SA y WA corresponden a reflexiones de ángulo bajo y ancho respectivamente. ....	48
Figura 32: Efectos de memantina, rivastigmina y donepezilo sobre polarización generalizada (GP) de lauridan incubado en vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC a (A) 18 °C y (B) 37 °C. ....	49

Figura 33: Efectos de memantina, rivastigmina y donepezilo sobre anisotropía (r) de DPH incubado en vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC a (A) 18 °C y (B) 37 °C. ....	50
Figura 34: Efectos de memantina, rivastigmina y donepezilo sobre (A) polarización generalizada (GP) de laurdan y (B) anisotropía (r) de DPH incubados en membranas aisladas de eritrocitos humanos no sellados (IUM) a 37 °C. ....	50
Figura 35: Efectos de los péptidos Aβ(1-40) y Aβ(1-42) sobre polarización generalizada (GP) de laurdan incubado en vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC a (A) 18 °C y (B) 37 °C. ....	51
Figura 36: Efectos de los péptidos Aβ (1-40) y Aβ (1-42) sobre anisotropía (r) de DPH incubado en vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC a (A) 18 °C y (B) 37 °C. ....	52
Figura 37: Efectos de los péptidos Aβ (1-40) y Aβ (1-42) sobre (A) polarización generalizada (GP) de laurdan y (B) anisotropía (r) de DPH incubados en membranas aisladas de eritrocitos humanos no sellados (IUM) a 37 °C. ....	52
Figura 38: (A) Termogramas representativos de DSC obtenidos para liposomas multilamelares de DMPC que contienen diferentes concentraciones de memantina. Los barridos se realizaron a una velocidad de calentamiento de 1 °C min <sup>-1</sup> ; (B) Gráfico de las temperaturas de transición de fase de liposomas multilamelares de DMPC determinadas para los barridos de enfriamiento y calentamiento en función de la concentración de memantina. ....	54
Figura 39: (A) Termogramas representativos de DSC obtenidos para liposomas multilamelares de DMPE que contienen diferentes concentraciones de memantina. Los barridos se realizaron a una velocidad de calentamiento de 1 °C min <sup>-1</sup> ; (B) Gráfico de las temperaturas de transición de fase de los liposomas multilamelares de DMPE determinadas para barridos de enfriamiento y calentamiento en función de la concentración de memantina. ....	54
Figura 40: (A) Termogramas representativos de DSC obtenidos para liposomas multilamelares de DMPC que contienen diferentes concentraciones de donepezilo. Los barridos se realizaron a una velocidad de calentamiento de 1 °C min <sup>-1</sup> ; (B) Gráfico de las temperaturas de transición de fase de liposomas multilamelares de DMPC determinadas para los barridos de enfriamiento y calentamiento en función de la concentración de donepezilo. ....	56
Figura 41: (A) Termogramas representativos de DSC obtenidos para liposomas multilamelares de DMPE que contienen diferentes concentraciones de donepezilo. Los barridos se realizaron a una velocidad de calentamiento de 1 °C min <sup>-1</sup> ; (B) Gráfico de las temperaturas de transición de fase de los liposomas multilamelares de DMPE determinadas para barridos de enfriamiento y calentamiento en función de la concentración de donepezilo. ....	56
Figura 42: (A) Termogramas representativos de DSC obtenidos para liposomas multilamelares de DMPC que contienen diferentes concentraciones de rivastigmina. Los barridos se realizaron a una velocidad de calentamiento de 1 °C min <sup>-1</sup> ; (B) Gráfico de las temperaturas de transición de fase de liposomas multilamelares de DMPC determinadas para los barridos de enfriamiento y calentamiento en función de la concentración de rivastigmina. ....	58

Figura 43: (A) Termogramas representativos de DSC obtenidos para liposomas multilamelares de DMPE que contienen diferentes concentraciones de rivastigmina. Los barridos se realizaron a una velocidad de calentamiento de $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ; (B) Gráfico de las temperaturas de transición de fase de los liposomas multilamelares de DMPE determinadas para barridos de enfriamiento y calentamiento en función de la concentración de rivastigmina. ....	58
Figura 44: (A) Termogramas representativos de DSC obtenidos para liposomas multilamelares de DMPC que contienen diferentes concentraciones de Híbrido 1 (H1). Los barridos se realizaron a una velocidad de calentamiento de $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ; (B) Gráfico de las temperaturas de transición de fase de liposomas multilamelares de DMPC determinadas para los barridos de enfriamiento y calentamiento en función de la concentración de Híbrido 1 (H1). ....	60
Figura 45: (A) Termogramas representativos de DSC obtenidos para liposomas multilamelares de DMPE que contienen diferentes concentraciones de Híbrido 1 (H1). Los barridos se realizaron a una velocidad de calentamiento de $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ; (B) Gráfico de las temperaturas de transición de fase de los liposomas multilamelares de DMPE determinadas para barridos de enfriamiento y calentamiento en función de la concentración de Híbrido 1 (H1). ....	60
Figura 46: (A) Termogramas representativos de DSC obtenidos para liposomas multilamelares de DMPC que contienen diferentes concentraciones de Híbrido 2 (H2). Los barridos se realizaron a una velocidad de calentamiento de $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ; (B) Gráfico de las temperaturas de transición de fase de liposomas multilamelares de DMPC determinadas para los barridos de enfriamiento y calentamiento en función de la concentración de Híbrido 2 (H2). ....	62
Figura 47: (A) Termogramas representativos de DSC obtenidos para liposomas multilamelares de DMPE que contienen diferentes concentraciones de Híbrido 2 (H2). Los barridos se realizaron a una velocidad de calentamiento de $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ; (B) Gráfico de las temperaturas de transición de fase de los liposomas multilamelares de DMPE determinadas para barridos de enfriamiento y calentamiento en función de la concentración de Híbrido 2 (H2). ....	62
Figura 48: (A) Termogramas representativos de DSC obtenidos para liposomas multilamelares de DMPC que contienen diferentes concentraciones de Híbrido 3 (H3). Los barridos se realizaron a una velocidad de calentamiento de $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ; (B) Gráfico de las temperaturas de transición de fase de liposomas multilamelares de DMPC determinadas para los barridos de enfriamiento y calentamiento en función de la concentración de Híbrido 3 (H3). ....	64
Figura 49: (A) Termogramas representativos de DSC obtenidos para liposomas multilamelares de DMPE que contienen diferentes concentraciones de Híbrido 3 (H3). Los barridos se realizaron a una velocidad de calentamiento de $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ; (B) Gráfico de las temperaturas de transición de fase de los liposomas multilamelares de DMPE determinadas para barridos de enfriamiento y calentamiento en función de la concentración de Híbrido 3 (H3). ....	64
Figura 50: (A) Termogramas representativos de DSC obtenidos para liposomas multilamelares de DMPC que contienen diferentes concentraciones de A $\beta$ (1-40). Los barridos se realizaron a una velocidad de calentamiento de $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ; (B) Gráfico de las temperaturas de transición de fase de liposomas multilamelares de DMPC	

determinadas para los barridos de enfriamiento y calentamiento en función de la concentración de A $\beta$ (1-40). .....	66
Figura 51: (A) Termogramas representativos de DSC obtenidos para liposomas multilamelares de DMPE que contienen diferentes concentraciones de A $\beta$ (1-40). Los barridos se realizaron a una velocidad de calentamiento de 1 °C min <sup>-1</sup> ; (B) Gráfico de las temperaturas de transición de fase de los liposomas multilamelares de DMPE determinadas para barridos de enfriamiento y calentamiento en función de la concentración de A $\beta$ (1-40). .....	66
Figura 52: (A) Termogramas representativos de DSC obtenidos para liposomas multilamelares de DMPC que contienen diferentes concentraciones de A $\beta$ (1-42). Los barridos se realizaron a una velocidad de calentamiento de 1 °C min <sup>-1</sup> ; (B) Gráfico de las temperaturas de transición de fase de liposomas multilamelares de DMPC determinadas para los barridos de enfriamiento y calentamiento en función de la concentración de A $\beta$ (1-42). .....	68
Figura 53: (A) Termogramas representativos de DSC obtenidos para liposomas multilamelares de DMPE que contienen diferentes concentraciones de A $\beta$ (1-42). Los barridos se realizaron a una velocidad de calentamiento de 1 °C min <sup>-1</sup> ; (B) Gráfico de las temperaturas de transición de fase de los liposomas multilamelares de DMPE determinadas para barridos de enfriamiento y calentamiento en función de la concentración de A $\beta$ (1-42). .....	68
Figura 54: Efecto de memantina en la morfología de eritrocitos humanos. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de (A) Control; (B) 20 $\mu$ M; (C) 40 $\mu$ M; (D) 60 $\mu$ M; (E) 80 $\mu$ M; (F) 100 $\mu$ M memantina. ....	70
Figura 55: Efecto de donepezilo en la morfología de eritrocitos humanos. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de (A) Control; (B) 20 $\mu$ M; (C) 40 $\mu$ M; (D) 60 $\mu$ M; (E) 80 $\mu$ M; (F) 100 $\mu$ M donepezilo. ....	71
Figura 56: Efecto de rivastigmina en la morfología de eritrocitos humanos. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de (A) Control; (B) 20 $\mu$ M; (C) 40 $\mu$ M; (D) 60 $\mu$ M; (E) 80 $\mu$ M; (F) 100 $\mu$ M rivastigmina. ....	72
Figura 57: Efecto de Híbrido 1 (H1) en la morfología de eritrocitos humanos. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de (A) Control; (B) 10 $\mu$ M; (C) 20 $\mu$ M; (D) 30 $\mu$ M; (E) 40 $\mu$ M; (F) 50 $\mu$ M H1. ....	73
Figura 58: Efecto de Híbrido 2 (H2) en la morfología de eritrocitos humanos. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de (A) Control; (B) 10 $\mu$ M; (C) 20 $\mu$ M; (D) 30 $\mu$ M; (E) 40 $\mu$ M; (F) 50 $\mu$ M H2. ....	74
Figura 59: Efecto de Híbrido 3 (H3) en la morfología de eritrocitos humanos. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de (A) Control; (B) 10 $\mu$ M; (C) 20 $\mu$ M; (D) 30 $\mu$ M; (E) 40 $\mu$ M; (F) 50 $\mu$ M H3. ....	75
Figura 60: Efecto del péptido A $\beta$ (1-40) en la morfología de eritrocitos humanos. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de (A) Control; (B) 5 $\mu$ M; (C) 10 $\mu$ M; (D) 15 $\mu$ M; (E) 20 $\mu$ M; (F) 30 $\mu$ M A $\beta$ (1-40). ....	76
Figura 61: Efecto del péptido A $\beta$ (1-42) en la morfología de eritrocitos humanos. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de (A) Control; (B) 1 $\mu$ M; (C) 5 $\mu$ M; (D) 10 $\mu$ M; (E) 15 $\mu$ M; (F) 20 $\mu$ M A $\beta$ (1-42). ....	77

Figura 62: Efecto protector de H1 frente al péptido A $\beta$ (1-40) en eritrocitos humanos. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de (A) Control; (B) A $\beta$ (1-40) 30 $\mu$ M; Eritrocitos humanos incubados con A $\beta$ (1-40) 30 $\mu$ M más: (C) H1 5 $\mu$ M; (D) H1 10 $\mu$ M; (E) H1 15 $\mu$ M; (F) H1 20 $\mu$ M. ....	78
Figura 63: Efecto protector de H2 frente al péptido A $\beta$ (1-40) en eritrocitos humanos. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de (A) Control; (B) A $\beta$ (1-40) 30 $\mu$ M; Eritrocitos humanos incubados con A $\beta$ (1-40) 30 $\mu$ M más: (C) H2 5 $\mu$ M; (D) H2 10 $\mu$ M; (E) H2 15 $\mu$ M; (F) H2 20 $\mu$ M. ....	79
Figura 64: Efecto protector de H3 frente al péptido A $\beta$ (1-40) en eritrocitos humanos. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de (A) Control; (B) A $\beta$ (1-40) 30 $\mu$ M; Eritrocitos humanos incubados con A $\beta$ (1-40) 30 $\mu$ M más: (C) H3 5 $\mu$ M; (D) H3 10 $\mu$ M; (E) H3 15 $\mu$ M; (F) H3 20 $\mu$ M. ....	80
Figura 65: Efecto protector de H1 frente al péptido A $\beta$ (1-42) en eritrocitos humanos. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de (A) Control; (B) A $\beta$ (1-42) 20 $\mu$ M; Eritrocitos humanos incubados con A $\beta$ (1-42) 20 $\mu$ M más: (C) H1 5 $\mu$ M; (D) H1 10 $\mu$ M; (E) H1 15 $\mu$ M; (F) H1 20 $\mu$ M. ....	81
Figura 66: Efecto protector de H2 frente al péptido A $\beta$ (1-42) en eritrocitos humanos. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de (A) Control; (B) A $\beta$ (1-42) 20 $\mu$ M; Eritrocitos humanos incubados con A $\beta$ (1-42) 20 $\mu$ M más: (C) H2 5 $\mu$ M; (D) H2 10 $\mu$ M; (E) H2 15 $\mu$ M; (F) H2 20 $\mu$ M. ....	82
Figura 67: Efecto protector de H3 frente al péptido A $\beta$ (1-42) en eritrocitos humanos. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de (A) Control; (B) A $\beta$ (1-42) 20 $\mu$ M; Eritrocitos humanos incubados con A $\beta$ (1-42) 20 $\mu$ M más: (C) H3 5 $\mu$ M; (D) H3 10 $\mu$ M; (E) H3 15 $\mu$ M; (F) H3 20 $\mu$ M. ....	83
Figura 68: Inhibidores de la AChE utilizados clínicamente para el tratamiento sintomático de la EA. (A) Representación esquemática del sitio activo de AChE que muestra los sitios "aniónicos" y "esterasicos" de la enzima. (Tomado de Bohn, P. et al. <sup>171</sup> ) .....	98

## INDICE DE TABLAS

Tabla 7. 1: Porcentaje de desorden estructural en las regiones SA y WA de DMPC por efecto de memantina.....	122
Tabla 7. 2: Porcentaje de desorden estructural en las regiones SA y WA de DMPC por efecto de donepezilo.....	122
Tabla 7. 3: Porcentaje de desorden estructural en las regiones SA y WA de DMPC por efecto de rivastigmina.....	122
Tabla 7. 4: Porcentaje de desorden estructural en las regiones SA y WA de DMPC por efecto del híbrido 1 (H1). ....	123
Tabla 7. 5: Porcentaje de desorden estructural en las regiones SA y WA de DMPC por efecto del híbrido 2 (H2). ....	123
Tabla 7. 6: Porcentaje de desorden estructural en las regiones SA y WA de DMPC por efecto del híbrido 3 (H3). ....	123
Tabla 7. 7: Porcentaje de desorden estructural en las regiones SA y WA de DMPC por efecto del péptido A $\beta$ (1-40). ....	124
Tabla 7. 8: Porcentaje de desorden estructural en las regiones SA y WA de DMPC por efecto del péptido A $\beta$ (1-42). ....	124
Tabla 7. 9: Porcentaje de desorden estructural en las regiones SA y WA de DMPC por efecto del péptido A $\beta$ (1-40) y en solución con diferentes concentraciones de híbrido 1 (H1). ....	124
Tabla 7. 10: Porcentaje de desorden estructural en las regiones SA y WA de DMPC por efecto del péptido A $\beta$ (1-40) y en solución con diferentes concentraciones de híbrido 2 (H2). ....	125
Tabla 7. 11: Porcentaje de desorden estructural en las regiones SA y WA de DMPC por efecto del péptido A $\beta$ (1-40) y en solución con diferentes concentraciones de híbrido 3 (H3). ....	125
Tabla 7. 12: Porcentaje de desorden estructural en las regiones SA y WA de DMPC por efecto del péptido A $\beta$ (1-42) y en solución con diferentes concentraciones de híbrido 1 (H1). ....	125
Tabla 7. 13: Porcentaje de desorden estructural en las regiones SA y WA de DMPC por efecto del péptido A $\beta$ (1-42) y en solución con diferentes concentraciones de híbrido 2 (H2). ....	126
Tabla 7. 14: Porcentaje de desorden estructural en las regiones SA y WA de DMPC por efecto del péptido A $\beta$ (1-42) y en solución con diferentes concentraciones de híbrido 3 (H3). ....	126
Tabla 7. 15: Valores de polarización generalizada (GP) de laurdan incubado en vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC en presencia de memantina, rivastigmina y donepezilo a 18 °C. ....	127



Tabla 7. 16: Valores de polarización generalizada (GP) de laurdan incubado en vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC en presencia de memantina, rivastigmina y donepezilo a 37 °C. ....	127
Tabla 7. 17: Valores de anisotropía (r) de DPH incubado en vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC en presencia de memantina, rivastigmina y donepezilo a 18 °C. ....	127
Tabla 7. 18: Valores de anisotropía (r) de DPH incubado en vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC en presencia de memantina, rivastigmina y donepezilo a 37 °C. ....	128
Tabla 7. 19: Valores de polarización generalizada (GP) de laurdan incubado en membranas aisladas no selladas de eritrocitos humanos (IUM) en presencia de memantina, rivastigmina y donepezilo a 37 °C. ....	128
Tabla 7. 20: Valores de anisotropía (r) de DPH incubado en membranas aisladas no selladas de eritrocitos humanos (IUM) en presencia de memantina, rivastigmina y donepezilo a 37 °C. ....	128
Tabla 7. 21: Valores de polarización generalizada (GP) de laurdan incubado en vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC en presencia de los péptidos amiloides A $\beta$ (1-40) y A $\beta$ (1-42) a 18 °C. ....	129
Tabla 7. 22: Valores de polarización generalizada (GP) de laurdan incubado en vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC en presencia de los péptidos amiloides A $\beta$ (1-40) y A $\beta$ (1-42) a 37 °C. ....	129
Tabla 7. 23: Valores de anisotropía (r) de DPH incubado en vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC en presencia de los péptidos amiloides A $\beta$ (1-40) y A $\beta$ (1-42) a 18 °C. ....	129
Tabla 7. 24: Valores de anisotropía (r) de DPH incubado en vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC en presencia de los péptidos amiloides A $\beta$ (1-40) y A $\beta$ (1-42) a 37 °C. ....	130
Tabla 7. 25: Valores de polarización generalizada (GP) de laurdan incubado en membranas aisladas no selladas de eritrocitos humanos (IUM) en presencia de los péptidos amiloides A $\beta$ (1-40) y A $\beta$ (1-42) a 37 °C. ....	130
Tabla 7. 26: Valores de anisotropía (r) de DPH incubado en membranas aisladas no selladas de eritrocitos humanos (IUM) en presencia de los péptidos A $\beta$ (1-40) y A $\beta$ (1-42) a 37 °C. ....	130
Tabla 7. 27: Parámetros termodinámicos de pretransición y transición de fase principal de liposomas multilamelares de DMPC puros, completamente hidratados y mezclas de DMPC/memantina obtenidos a partir de barridos de calentamiento y enfriamiento recolectadas a una velocidad de 1 °C min <sup>-1</sup> para ambos procesos. La precisión de la temperatura de transición de fase principal y la entalpía fue de $\pm 0.01$ °C y $\pm 0.8$ kJ/mol, respectivamente. ....	131
Tabla 7. 28: Parámetros termodinámicos de transición de la fase principal de liposomas multilamelares de DMPE puros, completamente hidratados y mezclas de DMPE/memantina obtenidas a partir de exploraciones de calentamiento y enfriamiento recolectadas a una velocidad de calentamiento (enfriamiento) de 1 °C min <sup>-1</sup> . La precisión de la temperatura de transición de fase principal y la entalpía fue de $\pm 0.01$ °C y $\pm 0.8$ kJ / mol, respectivamente. ....	131
Tabla 7. 29: Parámetros termodinámicos de pretransición y transición de fase principal de liposomas multilamelares de DMPC puros, completamente hidratados y	

mezclas de DMPC/donepezilo obtenidos a partir de barridos de calentamiento y enfriamiento recolectadas a una velocidad de 1 °C min <sup>-1</sup> para ambos procesos. La precisión de la temperatura de transición de fase principal y la entalpía fue de ± 0.01 °C y ± 0.8 kJ/mol, respectivamente. ....	132
Tabla 7. 30: Parámetros termodinámicos de transición de la fase principal de liposomas multilamelares de DMPE puros, completamente hidratados y mezclas de DMPE/donepezilo obtenidas a partir de exploraciones de calentamiento y enfriamiento recolectadas a una velocidad de calentamiento (enfriamiento) de 1 °C min <sup>-1</sup> . La precisión de la temperatura de transición de fase principal y la entalpía fue de ± 0.01 °C y ± 0.8 kJ / mol, respectivamente. ....	132
Tabla 7. 31: Parámetros termodinámicos de pretransición y transición de fase principal de liposomas multilamelares de DMPC puros, completamente hidratados y mezclas de DMPC/rivastigmina obtenidos a partir de barridos de calentamiento y enfriamiento recolectadas a una velocidad de 1 °C min <sup>-1</sup> para ambos procesos. La precisión de la temperatura de transición de fase principal y la entalpía fue de ± 0.01 °C y ± 0.8 kJ/mol, respectivamente. ....	133
Tabla 7. 32: Parámetros termodinámicos de transición de la fase principal de liposomas multilamelares de DMPE puros, completamente hidratados y mezclas de DMPE/rivastigmina obtenidas a partir de exploraciones de calentamiento y enfriamiento recolectadas a una velocidad de calentamiento (enfriamiento) de 1 °C min <sup>-1</sup> . La precisión de la temperatura de transición de fase principal y la entalpía fue de ± 0.01 °C y ± 0.8 kJ / mol, respectivamente. ....	133
Tabla 7. 33: Parámetros termodinámicos de pretransición y transición de fase principal de liposomas multilamelares de DMPC puros, completamente hidratados y mezclas de DMPC/H1 obtenidos a partir de barridos de calentamiento y enfriamiento recolectadas a una velocidad de 1 °C min <sup>-1</sup> para ambos procesos. La precisión de la temperatura de transición de fase principal y la entalpía fue de ± 0.01 °C y ± 0.8 kJ/mol, respectivamente.....	134
Tabla 7. 34: Parámetros termodinámicos de transición de la fase principal de liposomas multilamelares de DMPE puros, completamente hidratados y mezclas de DMPE/H1 obtenidas a partir de exploraciones de calentamiento y enfriamiento recolectadas a una velocidad de calentamiento (enfriamiento) de 1 °C min <sup>-1</sup> . La precisión de la temperatura de transición de fase principal y la entalpía fue de ± 0.01 °C y ± 0.8 kJ / mol, respectivamente. ....	134
Tabla 7. 35: Parámetros termodinámicos de pretransición y transición de fase principal de liposomas multilamelares de DMPC puros, completamente hidratados y mezclas de DMPC/H2 obtenidos a partir de barridos de calentamiento y enfriamiento recolectadas a una velocidad de 1 °C min <sup>-1</sup> para ambos procesos. La precisión de la temperatura de transición de fase principal y la entalpía fue de ± 0.01 °C y ± 0.8 kJ/mol, respectivamente.....	135
Tabla 7. 36: Parámetros termodinámicos de transición de la fase principal de liposomas multilamelares de DMPE puros, completamente hidratados y mezclas de DMPE/H2 obtenidas a partir de exploraciones de calentamiento y enfriamiento recolectadas a una velocidad de calentamiento (enfriamiento) de 1 °C min <sup>-1</sup> . La precisión de la temperatura de transición de fase principal y la entalpía fue de ± 0.01 °C y ± 0.8 kJ / mol, respectivamente. ....	135

Tabla 7. 37: Parámetros termodinámicos de pretransición y transición de fase principal de liposomas multilamelares de DMPC puros, completamente hidratados y mezclas de DMPC/H3 obtenidos a partir de barridos de calentamiento y enfriamiento recolectadas a una velocidad de 1 °C min <sup>-1</sup> para ambos procesos. La precisión de la temperatura de transición de fase principal y la entalpía fue de ± 0.01 °C y ± 0.8 kJ/mol, respectivamente.....	136
Tabla 7. 38: Parámetros termodinámicos de transición de la fase principal de liposomas multilamelares de DMPE puros, completamente hidratados y mezclas de DMPE/H3 obtenidas a partir de exploraciones de calentamiento y enfriamiento recolectadas a una velocidad de calentamiento (enfriamiento) de 1 °C min <sup>-1</sup> . La precisión de la temperatura de transición de fase principal y la entalpía fue de ± 0.01 °C y ± 0.8 kJ / mol, respectivamente. ....	136
Tabla 7. 39: Parámetros termodinámicos de pretransición y transición de fase principal de liposomas multilamelares de DMPC puros, completamente hidratados y mezclas de DMPC/Aβ (1-40) obtenidos a partir de barridos de calentamiento y enfriamiento recolectadas a una velocidad de 1 °C min <sup>-1</sup> para ambos procesos. La precisión de la temperatura de transición de fase principal y la entalpía fue de ± 0.01 °C y ± 0.8 kJ/mol, respectivamente. ....	137
Tabla 7. 40: Parámetros termodinámicos de transición de la fase principal de liposomas multilamelares de DMPE puros, completamente hidratados y mezclas de DMPE/Aβ (1-40) obtenidas a partir de exploraciones de calentamiento y enfriamiento recolectadas a una velocidad de calentamiento (enfriamiento) de 1 °C min <sup>-1</sup> . La precisión de la temperatura de transición de fase principal y la entalpía fue de ± 0.01 °C y ± 0.8 kJ / mol, respectivamente. ....	137
Tabla 7. 41: Parámetros termodinámicos de pretransición y transición de fase principal de liposomas multilamelares de DMPC puros, completamente hidratados y mezclas de DMPC/Aβ (1-42) obtenidos a partir de barridos de calentamiento y enfriamiento recolectadas a una velocidad de 1 °C min <sup>-1</sup> para ambos procesos. La precisión de la temperatura de transición de fase principal y la entalpía fue de ± 0.01 °C y ± 0.8 kJ/mol, respectivamente. ....	138
Tabla 7. 42: Parámetros termodinámicos de transición de la fase principal de liposomas multilamelares de DMPE puros, completamente hidratados y mezclas de DMPE/Aβ (1-42) obtenidas a partir de exploraciones de calentamiento y enfriamiento recolectadas a una velocidad de calentamiento (enfriamiento) de 1 °C min <sup>-1</sup> . La precisión de la temperatura de transición de fase principal y la entalpía fue de ± 0.01 °C y ± 0.8 kJ / mol, respectivamente. ....	138



## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1 Enfermedad de Alzheimer y péptido $\beta$ - amiloide ( $A\beta$ ).

La enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza neuropatológicamente por la presencia de depósitos extracelulares de amiloide a la forma de placas, ovillos neurofibrilares intracelulares y una pérdida neuronal a nivel de la corteza cerebral. El número de placas se relaciona directamente con la severidad de la demencia<sup>2</sup>. Estos marcadores patológicos son los únicos que hacen posible el diagnóstico positivo de la enfermedad puesto que los síntomas clínicos de la EA también se observan en otros desórdenes neurológicos.

El componente principal de los depósitos de amiloide son los péptidos  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) que corresponden a una familia de péptidos de entre 39 y 43 residuos de aminoácidos. Los  $A\beta$  insolubles en los cerebros enfermos existen ya sea como depósitos amorfos llamados amiloide difuso o cuerpos densos llamados placas seniles. Ambas estructuras son reconocidas por sus diferentes patrones de tinción con Rojo Congo<sup>3</sup> o ensayo inmunológico específico para  $A\beta$ <sup>4</sup>. Mientras que el amiloide difuso está presente tanto en los cerebros con envejecimiento normal como en los afectados por EA, las placas seniles sólo se encuentran en los últimos, donde están asociados a las neuronas atrofiadas<sup>5</sup>. Es por esta razón que se ha propuesto que las placas seniles juegan un rol neurotóxico en la EA<sup>6</sup> y siendo los péptidos  $A\beta$  su principal componente proteico, se ha centrado la investigación bioquímica en dilucidar el mecanismo de producción y depósito. Las formas familiares o genéticas de la enfermedad (donde se han identificado tres genes responsables) parecen actuar a través de un mecanismo común: sobreproducción de  $A\beta(1-42)$  y  $A\beta(1-43)$ , mientras que en las formas aisladas (no genéticas, las que alcanzan a más del 90% del total) no existe una alteración similar en la producción de amiloide<sup>7-9</sup>. Esto señala que la manifestación de la enfermedad debe originarse en otros factores.

Los  $A\beta$  son productos normales de ruptura enzimática (mediante  $\beta$ - y  $\gamma$ - secretasas) de la proteína precursora de amiloide (APP) transmembránica de amplia expresión

celular<sup>10-13</sup>. Los A $\beta$  contienen 28 residuos de aminoácidos de la porción extracelular de la APP y 11-15 residuos de su dominio transmembranal<sup>14-17</sup>. Los productos más abundantes son los péptidos de 40 residuos: A $\beta$ (1-40)<sup>18,19</sup>. Sin embargo, los A $\beta$ (1-42), que constituyen aproximadamente el 10% del total, son los más abundantes en las placas seniles<sup>20,21</sup>. El metabolismo de la APP y la producción de los A $\beta$  ocurre en ambientes ligeramente ácidos correspondientes a los endosomas (pH 5.0-6.5) y los lisosomas (pH 4-5)<sup>22,23</sup>. Sin embargo, cuando son liberados al espacio extracelular, éstos encuentran un ambiente de pH neutro. Bajo condiciones fisiológicas normales, los A $\beta$  son metabolitos normales solubles que son producidos por una variedad de células y se encuentran en el fluido cerebroespinal y el plasma. Los niveles de A $\beta$  encontrados en individuos con EA aislada y en los sanos son comparables, mientras que en los casos de EA familiar ellos son los más altos<sup>24,25</sup>. La concentración de los A $\beta$  en el plasma y en fluido cerebro-espinal es del orden nanomolar<sup>26,27</sup> y su función fisiológica es desconocida, sin embargo resultan ser inherentemente tóxicos para las neuronas y células en cultivo<sup>28,29</sup>. Los A $\beta$  son anfifílicos y tienden a formar espontáneamente agregados en soluciones acuosas con pH menor o igual al fisiológico.

Un número creciente de evidencias provenientes de estudios genéticos, histopatológicos y de cultivo celular señalan a los péptidos A $\beta$ (1-40) y A $\beta$ (1-42) como unos de los principales agentes neurotóxicos en la EA<sup>30-33</sup>. Sin embargo, muchos estudios *in vitro* demuestran que los A $\beta$  son neurotóxicos sólo cuando forman agregados a la forma de fibrillas del tipo hoja  $\beta$ -cruzada<sup>34</sup>. La inhibición de la formación de fibrillas podría constituir una forma de prevenir o aminorar la enfermedad. Sin embargo, para esto debe conocerse en detalle el mecanismo de formación de las fibrillas de amiloide a un nivel molecular y los factores que intervienen en él.

Debido a la naturaleza insoluble y no cristalina de las fibrillas, hace 10 años los estudios experimentales para conocer la estructura de las fibrillas de A $\beta$  se limitan principalmente a difracción de rayos X de ángulo pequeño y RMN de estado sólido. Actualmente, mediante el rápido desarrollo de los análisis de crio-electro microscopía (cryo-EM) se ha permitido conocer las estructuras (estructura hoja- $\beta$  plegada o

también llamada  $\beta$ -cruzada) de gran parte de moléculas relacionadas con la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas<sup>35-37</sup>.

La conformación de los péptidos  $A\beta$  depende del ambiente químico. En soluciones acuosas los  $A\beta$  existen principalmente como ovillo al azar. Sin embargo, en solventes que promueven las hélices tal como el ácido trifluoroacético (TFA) o en un ambiente lipídico, estos péptidos adoptan una conformación de  $\alpha$ -hélice. La estructura de los  $A\beta$  puede estar constituida por dos regiones helicoidales conectadas por los residuos 24-28<sup>38</sup>.

Para que ocurra la polimerización de  $A\beta$  que da lugar a las fibrillas de amiloide es indispensable el cambio conformacional del péptido desde ovillo al azar hasta hebra- $\beta$ <sup>38,39</sup>. La polimerización que lleva a la formación de las fibrillas puede corresponder a un proceso de dos pasos (nucleación y elongación) de los cuales la nucleación sería el paso limitante de la velocidad. Se cree que los  $A\beta$  pueden formar dímeros, tetrámeros y especies de mayor complejidad a través de un colapso hidrofóbico que involucra los cambios conformacionales mencionados<sup>40</sup>. El  $A\beta(1-40)$  sintético es relativamente soluble y su agregación y ordenamiento fibrilar depende de varios factores. En general, concentraciones elevadas del péptido ( $>0.75$  mg/ml), tiempos de incubación elevados (48 hrs), pH bajo (pH 3.5-6.5) y agitación mecánica promoverán la agregación de los  $A\beta$ . La longitud de la porción de C-terminal también es importante: bajo condiciones fisiológicas, y debido a que los residuos C-terminal de los  $A\beta$  son hidrofóbicos, los  $A\beta$  más grandes, tales como  $A\beta(1-42)$  y  $A\beta(1-43)$ , se agregan más rápidamente que las formas más pequeñas. *In vivo*, los péptidos más grandes pueden estimular la formación de fibrillas de los péptidos más pequeños<sup>41,42</sup>.

En la actualidad, una hipótesis con bastante aceptación es la que postula que las interacciones entre los agregados de  $A\beta$  y las membranas neuronales juegan un rol importante en la toxicidad<sup>43-49</sup>. Se han sugerido varios mecanismos posibles por los cuales las interacciones de  $A\beta$ -membrana son tóxicas: alteraciones en la fluidez de la membrana<sup>50-52</sup>, producción de radicales libres<sup>53</sup> y peroxidación lipídica, formación de canales iónicos<sup>54-57</sup>, cambios en el metabolismo lipídico y un aumento en la actividad de la fosfolipasa<sup>58,59</sup>.

Algunos investigadores han estudiado la importancia del estado de agregación de los A $\beta$  en la interacción con las membranas. Se ha observado una correlación positiva entre la agregación de los A $\beta$  y la capacidad de ellos para disminuir la fluidez en el centro de la bicapa fosfolipídica medida mediante anisotropía de fluorescencia de 1,6 difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH)<sup>60</sup>. Usando la misma técnica, se observó que los cambios en la fluidez de la membrana cuando los A $\beta$  agregados interactúan con lípidos catiónicos, aniónicos o zwitteriónicos son equivalentes<sup>61</sup>. Esto indica que no se requieren interacciones específicas carga-carga entre estos agregados y las cabezas de los fosfolípidos para que se observe la disminución en la fluidez. En general, la disminución en la fluidez de la membrana podría alterar la función de la superficie de la célula y de las proteínas de los canales iónicos y de esta manera asociarse con una toxicidad celular.

Se ha postulado también que la acción de radicales libres (RL) y estrés oxidativo podría jugar un rol importante en la patogénesis de la EA. Los depósitos amiloides están asociados con daño oxidativo y se argumenta que los A $\beta$  agregados lo inducen espontáneamente mediante una generación de radicales libres y especies reactivas del oxígeno<sup>62</sup>, aunque esta hipótesis ha sido cuestionada<sup>63</sup>.

Una potente fuente de RL es la reacción de Fenton donde el Fe (II) es oxidado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a Fe (III), produciéndose también el radical hidroxilo (OH•)<sup>64-66</sup>. Dentro de las células, el Fe(II) se puede regenerar a partir del Fe(III) por acción de especies reductoras, convirtiéndolo en un potencial productor de RL. En la EA existe una alteración en el metabolismo del hierro que lleva también a su acumulación en placas seniles y ovillos neurofibrilares<sup>67-69</sup>. Se ha encontrado que este hierro es activo en la producción de RL y por lo tanto, contribuye al daño oxidativo de la EA<sup>70-72</sup>.

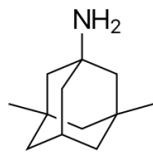
Como se ha expuesto, existen mutuas interacciones entre A $\beta$ , iones metálicos y los componentes de la membrana celular. A $\beta$  soluble, A $\beta$  agregado y los iones metálicos interactúan con las membranas celulares produciendo cambios estructurales y funcionales en ellas. A su vez, los iones metálicos inducen el paso del estado soluble a agregado de los A $\beta$ . Por otro lado, los componentes fosfolipídicos de las membranas pueden inducir el cambio de estado de A $\beta$ .



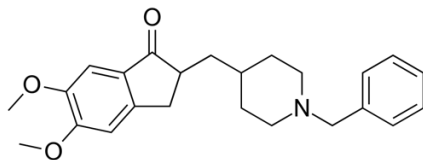
Los estudios que relacionan A $\beta$ , iones metálicos y fosfolípidos son variados. En la actualidad se sabe que los A $\beta$  agregados se incorporan en las membranas aunque su mecanismo exacto no está clarificado. Los estudios de efectos estructurales de A $\beta$  y metales sobre membranas celulares son bastante dispersos debido a la alta complejidad que encierra la estructura molecular de las membranas naturales<sup>73</sup>.

En uno de sus trabajos clásicos, Inestrosa et al.<sup>74</sup> determinó que existen claras evidencias que la enzima acetilcolinesterasa (AChE: enzima que descompone la acetilcolina) puede acelerar la formación de A $\beta$  y jugar un papel muy importante en su deposición en los cerebros de pacientes con EA; este hecho está posiblemente relacionado con la activación del sitio periférico de la enzima<sup>75,76</sup>. En este sentido, la utilización de ligandos capaces de interactuar simultáneamente con el sitio activo y el sitio periférico supondría importantes ventajas sobre el uso de cualquier inhibidor de la AChE conocido, ya que estos ligandos de sitio de unión dual presentarían una mayor potencia inhibitoria de la enzima debido a su mayor afinidad y, consecuentemente, una mayor eficacia para el tratamiento de la EA y, además, tendrían actividad neurotrófica y capacidad para retrasar el proceso de neurodegeneración.

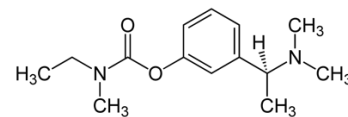
La gran mayoría de las estrategias terapéuticas para combatir la EA se relaciona con la denominada “hipótesis colinérgica” de la enfermedad<sup>77,78</sup>. De esta manera, se han realizado múltiples pruebas con moléculas y fármacos anticolinesterásicos que poseen una acción inhibitoria de la AChE. Los principales resultados corresponden a una leve mejoría del comportamiento del enfermo en cuanto a la apatía, iniciativa, memoria y capacidad funcional, mejorando su calidad de vida. Sin embargo, es preciso remarcar que actualmente la mejoría obtenida con estos fármacos es muy baja, es decir, no se ha logrado detener curso de la demencia que subyace a la enfermedad<sup>79-81</sup>. El primer fármaco anticolinesterásico comercializado fue la tacrina, hoy no empleada por su hepatotoxicidad<sup>82-84</sup>. En Chile existen tres fármacos anticolinesterásicos disponibles: donepezilo, rivastigmina y galantamina, cuyas fórmulas estructurales se representan en la Fig. 1.



Memantina



Donepezilo



Rivastigmina

**Figura 1: Fórmula estructural de memantina, donepezilo y rivastigmina. (Fuente: Elaboración propia)**

En el año 2013 un grupo de investigadores de la Universidad de Barcelona liderado por el Dr. Muñoz-Torrero, con quien se ha iniciado una colaboración para la presente tesis, logró diseñar y sintetizar una familia de híbridos de huprina con la finalidad de atacar objetivos clave en la EA: inhibición de la enzima acetilcolinesterasa y antiagregación del  $A\beta^{85-87}$ . Esto se logró potenciando las actividades de dos familias de moléculas: los derivados de huprina (que tienen un efecto inhibidor de AChE) y derivados de reina (con actividad antiagregante  $A\beta$ ). Mediante síntesis orgánica fue posible diseñar compuestos reina-huprina generando moléculas con mayor efectividad inhibitoria de AChE y antiagregante  $A\beta^{87}$ .

Respecto a las moléculas derivadas de huprina, éstas son el resultado de la síntesis de la huperzina A (subestructura carboxílica) y la tacrina (subestructura 4-aminoquinolina), suprimiendo el grupo etilideno de la huperzina A (Fig. 2). Esta síntesis genera la estructura general de las huprinas, que muestran un elevado poder de inhibición de la AChE. Por otro lado, la reina (ácido 4,5-dihidroxi-9,10-dioxoantraceno-2-carboxílico) (Fig.3) corresponde a un derivado hidroxiantraquinónico natural que se encuentra en la medicina natural china y que posee propiedades antiagregantes de la proteína tau y  $A\beta^{86}$ .

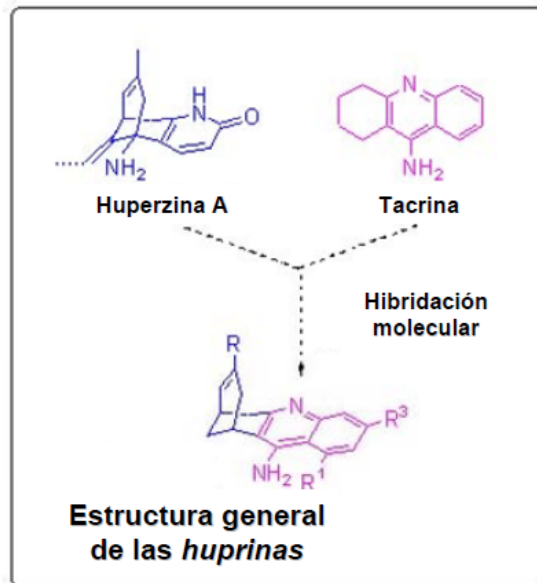


Figura 2: Síntesis del esqueleto molecular base de las huperinas<sup>88</sup>.

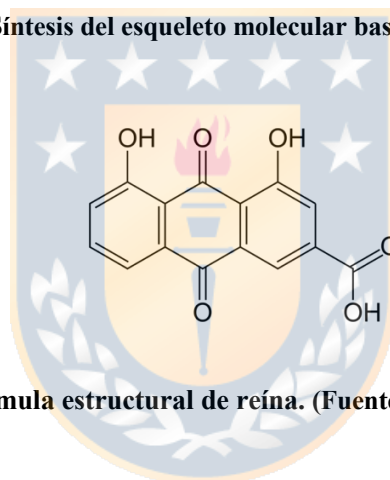


Figura 3: Fórmula estructural de reína. (Fuente: Elaboración propia)

Recientemente se han realizado experimentos *in vivo* e *in vitro* que demuestran la efectividad de esta familia de compuestos para inhibir a la AChE y para impedir la agregación de A $\beta$ <sup>89</sup>. Los experimentos biológicos realizados *in vitro* y en células de *Escherichia coli* han demostrado que estos compuestos híbridos exhiben actividades inhibitoras potentes contra la acetilcolinesterasa humana, butirilcolinesterasa, y actividad de anti agregación de A $\beta$ (1-42), uno de los péptidos neurotóxicos involucrados en la EA. Por otro lado, los estudios *in vivo* en ratones transgénicos tratados durante 4 semanas con los isómeros (+) - y (-) - 7e (Fig. 4) han demostrado un efecto bastante marcado en la recuperación y mejoramiento de la conducta<sup>85-87,89</sup>. Debido a la complejidad estructural de las membranas naturales se ha recurrido a modelos de membrana para estudiar sus características estructurales y propiedades

fisicoquímicas<sup>90,91</sup>. Entre estos modelos está el de las multibicapas de fosfolípidos y los liposomas o vesículas de fosfolípidos cuyas alteraciones estructurales por efecto de diferentes compuestos es estudiada combinando técnicas de RMN, espectroscopia de fluorescencia, difracción de rayos X y calorimetría diferencial de barrido (DSC).

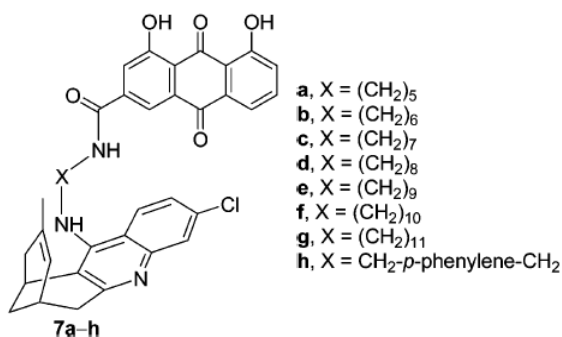


Figura 4: Estructura general de híbridos reina-huprina<sup>87</sup>.

Mediante una colaboración con el Dr. Diego Muñoz-Torrero, de la Universidad de Barcelona (creador de esta familia de compuestos), quien accedió a facilitar algunos de los híbridos sintetizados, se propuso estudiar los efectos protectores de los siguientes compuestos derivados de huprina, cuyas fórmulas estructurales se presentan a continuación:

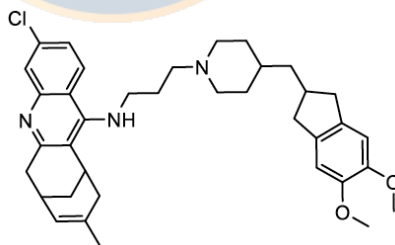
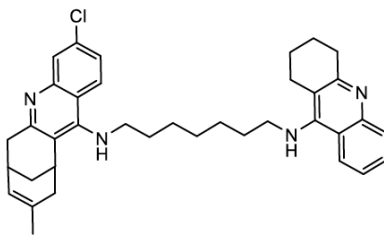
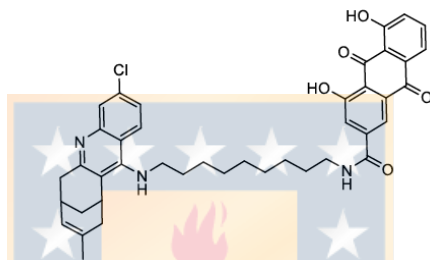


Figura 5: *Híbrido 1 (H1)*. (-)-(7S,11S)-3-Cloro-12-[(3-{4-[(5,6-dimetoxi-indan-2-il)metil]piperidin-1-il}propil)amino]-6,7,10,11-tetrahidro-9-metil-7,11-metanocicloocta[b]quinolina (dihydrochloride). (Fuente: Elaboración propia)



**Figura 6: Híbrido 2 (H2).** (-)-(7S,11S)-3-Cloro-6,7,10,11-tetrahidro-9-metil-12-({7-[(1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-il)amino]heptil}amino)-7,11- metanocicloocta[b]quinolina (dihydrochloride). (Fuente: Elaboración propia)



**Figura 7: Híbrido 3 (H3).** (+)-N-{9-[(3-Cloro-6,7,10,11-tetrahidro-9-metil-7,11 metanocicloocta[b]quinolin-12-il)amino]nonil}-9,10-dihidro-4,5-dihidroxi-9,10-dioxoantraceno-2-carboxamida (hydrochloride). (Fuente: Elaboración propia)

Donepezilo y rivastigmina corresponden a inhibidores de la AChE y tienen efectos beneficiosos sobre los síntomas cognitivos, funcionales de comportamiento de la EA. Además de la inhibición de la AChE, rivastigmina inhibe a la enzima butirilcolinesterasa, que constituye aproximadamente el 10% de la colinesterasa total en el cerebro humano. Por otro lado, memantina corresponde a un antagonista no competitivo del receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) que al ser activado por glutamato (neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central) genera un ingreso prolongado de  $\text{Ca}^{+2}$  a las neuronas. La acumulación intracelular excesiva de calcio inicia una cascada de eventos que culmina con la muerte neuronal. El tratamiento farmacológico con memantina se asocia con una menor deterioro cognitivo en pacientes con EA moderada.

En la presente tesis doctoral los efectos de estos compuestos se estudiaron mediante la técnica de difracción de rayos X, espectroscopía de fluorescencia y calorimetría

diferencial de barrido (DSC), específicamente sobre diferentes modelos moleculares de membrana constituidos por multibicapas lipídicas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE), clases de lípidos que se ubican en la monocapa externa e interna de los glóbulos rojos humanos respectivamente y que también forman parte del componente lipídico de la membrana de las neuronas del cerebro humano. Además, se estudió el efecto de estas moléculas en la morfología de eritrocitos humanos mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). De esta manera, el objetivo de la presente tesis fue establecer el efecto de las drogas mencionadas y realizar un estudio comparativo entre el efecto tóxico de los péptidos  $A\beta(1-40)$  y  $A\beta(1-42)$  sobre membranas celulares y el efecto protector que ejercen los híbridos de huprina frente a la toxicidad del  $A\beta$ .



## 2. MEMBRANAS CELULARES.

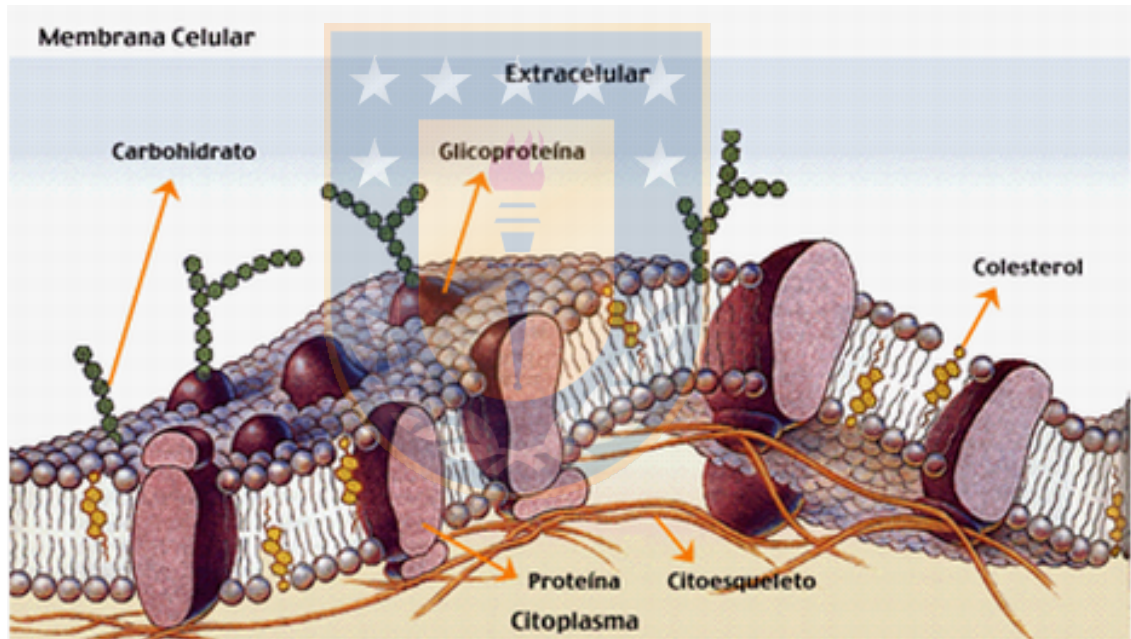
Las células están rodeadas por una membrana que las separa del medio extracelular, la que contiene enzimas, canales, receptores y antígenos que desempeñan papeles vitales en la interacción de la célula con otras células, con hormonas y otros agentes reguladores del líquido extracelular. La estructura básica de todas las membranas biológicas es la bicapa lipídica, la que funciona como una barrera de permeabilidad selectiva. Por lo tanto, la composición iónica del fluido extracelular difiere de la del citoplasma<sup>92,93</sup>.

La membrana celular más estudiada es la de los eritrocitos humanos la que contiene alrededor de 200 tipos diferentes de proteínas y 100 tipos de fosfolípidos. Estos difieren en el largo de sus cadenas, grado de insaturación y estructura del tipo polar. La gran fluidez de la membrana celular se debe a que aproximadamente un 50% de su peso es agua. La fluidez y heterogeneidad química dificultan la determinación de las estructuras tridimensionales de las membranas; por esta razón, la visión de la estructura de la membrana ha evolucionado mucho desde el primer modelo de biomembrana presentado por Gorter y Grendel en 1925<sup>94</sup>, ellos demostraron que una biomembrana es una estructura biomolecular muy delgada, compuesta por una doble capa de moléculas de lípidos, la que llamaron bicapa lipídica.

Posteriormente, en 1935, Danielli y Davson<sup>95</sup> desarrollaron el primer modelo que contempla la presencia de proteínas en la membrana. De este modo, a lo largo del tiempo se han ensayado alrededor de 50 modelos diferentes para explicar el comportamiento estructural y funcional de las membranas celulares. Sin embargo, no fue sino hasta 1972 que Singer y Nicholson<sup>96</sup> elaboraron el modelo del “mosaico fluido”, que es la base de la visión moderna de las membranas celulares. Según este modelo, las membranas están constituidas por lípidos y proteínas las cuales separan el medio interno (citoplasma) del externo (plasma) y están involucrados en un alto número de importantes funciones vitales. Algunas proteínas se hallan parcialmente insertas en la membrana; son las denominadas proteínas periféricas ya que penetran parcialmente en la fase lipídica desde cada lado, mientras que otras la atraviesan completamente y se denominan proteínas integrales. Un ulterior perfeccionamiento

fue formulado por Sackmann<sup>97</sup>, que hizo hincapié en el papel desempeñado por el citoesqueleto y el glucocálix. Ambos modelos muestran la membrana como un sistema complejo, heterogéneo y altamente cooperativo.

Un modelo esquemático de la membrana se muestra en la Fig. 8. La organización no-aleatoria de las membranas es de vital importancia para algunos procesos biológicos y puede ser afectada por procesos fisicoquímicos y los factores que, a su vez, pueden afectar al funcionamiento de la célula entera. Durante las últimas décadas ha habido progresos importantes en revelar la relación entre estructura, la organización y el funcionamiento de membrana biológica, que es el último objetivo de la ciencia de biomembranas.



**Figura 8: Modelo de mosaico fluido de Singer & Nicholson (1974) actualmente aceptado de la membrana celular<sup>98</sup>.**

Las diferentes proteínas localizadas en la membrana tienen funciones distintas. Algunas poseen espacios acuosos que permiten el libre movimiento de ciertos iones y moléculas, éstas se denominan canales. Otras, denominadas proteínas portadoras, se unen a las sustancias que hay que transportar y, mediante cambios de conformación

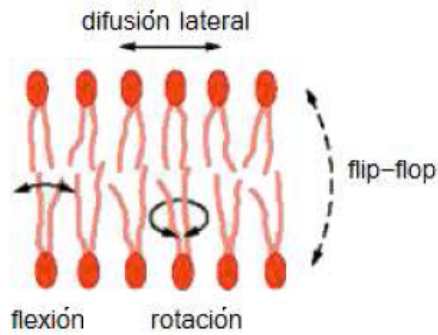


en sus propias moléculas, hacen que las sustancias se muevan a través de los intersticios de las moléculas hasta el otro lado de la membrana<sup>99-101</sup>.

## **2.1 Lípidos de membrana.**

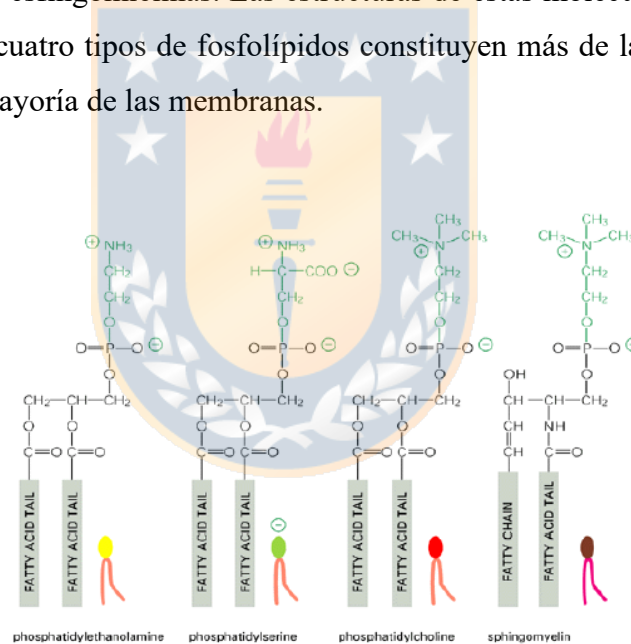
Los lípidos constituyen cerca del 50% de la masa seca de la mayoría de las membranas celulares, siendo el resto principalmente proteínas. Todos los lípidos en la membrana son anfipáticos, es decir, tienen una región hidrofílica o polar y otra hidrofóbica o apolar. Los más abundantes son el colesterol y los fosfolípidos. Estos están formados por un grupo polar y cadenas hidrocarbonadas hidrofóbicas. Estas cadenas corresponden por lo general a ácidos grasos que pueden diferenciarse en su longitud (normalmente entre 14 y 24 átomos de carbono); generalmente una cadena tiene mayor grado de saturación que la otra, diferencias que influyen en el empaquetamiento de las moléculas de fosfolípidos. Estas moléculas se agrupan formando una bicapa con sus residuos polares orientados hacia el exterior de la membrana en la interfase agua – bicapa y las colas hidrocarbonadas hacia el centro de esta bicapa que proporciona la estructura fluida básica de la membrana y actúa como una barrera al paso de la mayoría de las moléculas solubles en agua.

Estudios con varias técnicas muestran que las moléculas de fosfolípidos en bicapas sintéticas raramente migran de una monocapa a otra, proceso conocido como movimiento de flip-flop; sin embargo, intercambian lugar frecuentemente con las moléculas vecinas en la monocapa dando lugar a un rápido movimiento de difusión lateral; además, realizan rápidos movimientos de rotación alrededor de su propio eje y movimientos de flexión producidos por las colas hidrófobas (Fig. 9). Otros estudios realizados con membranas aisladas y células vivas han proporcionado similares resultados, en que las moléculas de lípidos son libres de moverse lateralmente pero tendientes a permanecer en su propia monocapa.



**Figura 9: Movimientos posibles para las moléculas de fosfolípidos en una bicapa lipídica<sup>102</sup>.**

Las membranas plasmáticas de la mayoría de las células de los mamíferos poseen cuatro grupos de fosfolípidos predominantes: fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilserinas y esfingomielin. Las estructuras de estas moléculas se muestran en la Fig. 10. Estos cuatro tipos de fosfolípidos constituyen más de la mitad de la masa de lípidos en la mayoría de las membranas.



**Figura 10: Estructura de los fosfolípidos más abundantes en las membranas biológicas. De izquierda a derecha: fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilcolina y esfingomielin<sup>103</sup>.**

Además de los fosfolípidos, en la bicapa de la membrana también se encuentran glicolípidos, los que constituyen alrededor del 5% del total de la masa lipídica de la membrana y están formados, como su nombre lo indica, por una molécula de lípido unido a un azúcar y se ubican exclusivamente en la monocapa externa de la membrana con sus grupos sacáridos hacia el exterior de la célula. Las moléculas de

colesterol se orientan en la bicapa con sus grupos hidroxilos cerca de las cabezas polares de los fosfolípidos dejando interactuar sus anillos esteroidales con las regiones de la cadena acílica más cercana a la zona polar aumentando la rigidez de la bicapa y disminuyendo su permeabilidad a pequeñas moléculas solubles en agua<sup>103</sup>.

## 2.2 Proteínas de membrana.

Las proteínas son las principales estructuras de comunicación entre el interior y el exterior de la célula. Son estructuralmente muy diversas y pueden ser clasificadas según su ubicación en la membrana en dos categorías: proteínas integrales (intrínsecas) y proteínas periféricas (extrínsecas). (Fig. 11)

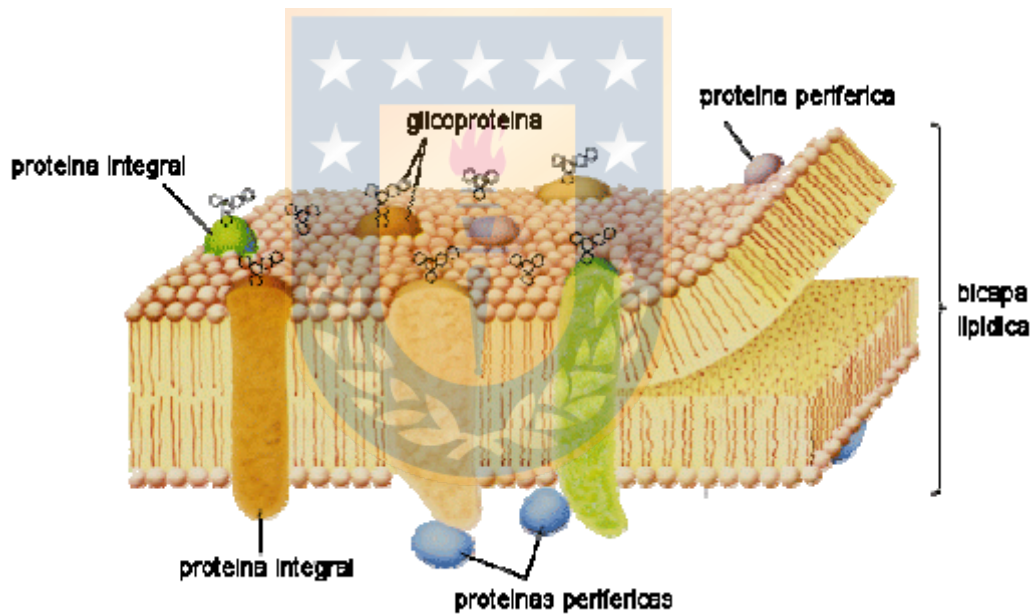


Figura 11: Esquema de proteínas de membrana características en una membrana celular<sup>104</sup>.

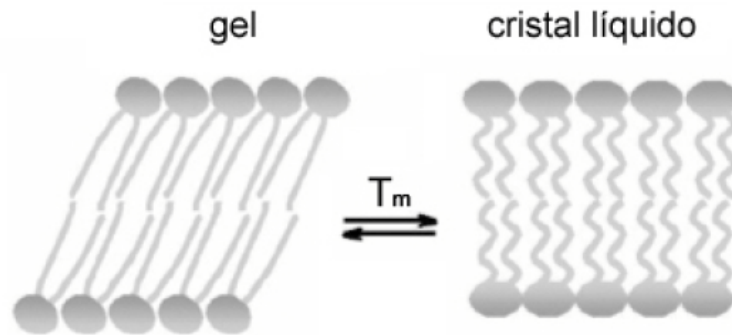
Las proteínas integrales tienen uno o más segmentos insertos en la bicapa. La mayoría de ellas contienen residuos con cadenas hidrofóbicas laterales que interactúan con las cadenas acílicas de los fosfolípidos de membrana. Gran parte de estas proteínas cruzan la bicapa en su totalidad y reciben el nombre de proteínas integrales totales o proteínas transmembrana, algunas de éstas atraviesan varias veces la bicapa. Por otro lado, algunas proteínas integrales están ancladas hasta un cierto

nivel en la bicapa sin atravesarla completamente, éstas son llamadas proteínas integrales parciales.

Las proteínas periféricas no interactúan con el interior hidrofóbico de la bicapa, en su lugar pueden estar unidas a la membrana indirectamente por interacciones con una proteína integral o directamente por interacciones con las regiones polares de los fosfolípidos ya sea de la monocapa externa o interna de la bicapa.

### **2.3 Fluidéz de la membrana.**

La fluidez de la membrana depende de su composición, del nivel de hidratación y de la temperatura como se ha mostrado en estudios realizados con membranas naturales y con bicapas sintéticas. En el caso de una bicapa compuesta por solo un tipo de fosfolípidos, ésta cambia de un estado gel a líquido cristalino a un punto de temperatura característico (Fig. 12). Este cambio de estado es llamado fase de transición y la temperatura a la que esto ocurre se denomina temperatura de transición ( $T_m$ ); ésta es menor cuando las cadenas acíclicas son más cortas o poseen dobles enlaces ya que una cadena más corta reduce la tendencia de las colas hidrocarbonadas de interactuar entre ellas, mientras los dobles enlaces producen flexiones en la cadena que las hacen más difícil de empaquetar por lo que la bicapa permanece fluida a temperaturas más bajas. Por el contrario, la presencia de cadenas acíclicas saturadas favorece el estado rígido ya que sus cadenas pueden interactuar fácilmente entre ellas. La variada mezcla de fosfolípidos, la heterogeneidad de las cadenas acíclicas y la presencia de colesterol en las bicapas lipídicas le permiten mantenerse en un estado fluido en un rango mucho más amplio de temperatura a diferencia de lo que sucede con las bicapas de fosfolípidos puros. El colesterol se ubica en la región cercana a las cabezas polares de los fosfolípidos disminuyendo la movilidad de los primeros grupos  $\text{CH}_2$  de la cadena hidrocarbonada haciendo a la bicapa menos deformable en esta región. Aunque el colesterol tiende a hacer la bicapa menos fluida también previene que las cadenas acíclicas se compacten y cristalicen; de esta forma inhibe posibles fases de transición<sup>105</sup>.



**Figura 12: Transición de estado en una bicapa lipídica entre la fase gel y la de cristal-líquido en función de la temperatura<sup>106</sup>.**

#### **2.4 Arquitectura asimétrica de las membranas.**

Aunque existe un permanente movimiento de difusión en el plano de la bicapa la migración espontánea de fosfolípidos desde una monocapa a la otra es poco frecuente lo que les permite tener una composición estructural asimétrica. Esta diferencia es un aspecto esencial para la estructura y función de la membrana celular dado que la composición de los espacios dentro y fuera del medio celular son también diferentes. Las proteínas se distribuyen irregularmente en la membrana según la función específica de cada proteína en particular. Los glicolípidos por otra parte se ubican siempre en la monocapa externa de la membrana. Los fosfolípidos y colesterol están presentes en ambas monocapas aunque por lo general según su tipo son más abundantes en una que otra. Generalmente la mayor parte de las esfingomielinas y fosfatidilcolinas, ambas con grupos polares con carga positiva, se encuentran ubicadas en la monocapa externa, mientras que los lípidos con grupos polares neutros o cargados negativamente (fosfatidiletanolaminas, fosfatidilserinas y fosfatidilinositol) se ubican preferentemente en la monocapa interna que está en contacto con el citosol. En la Figura 13 puede observarse la distribución asimétrica de los fosfolípidos en diferentes membranas celulares.

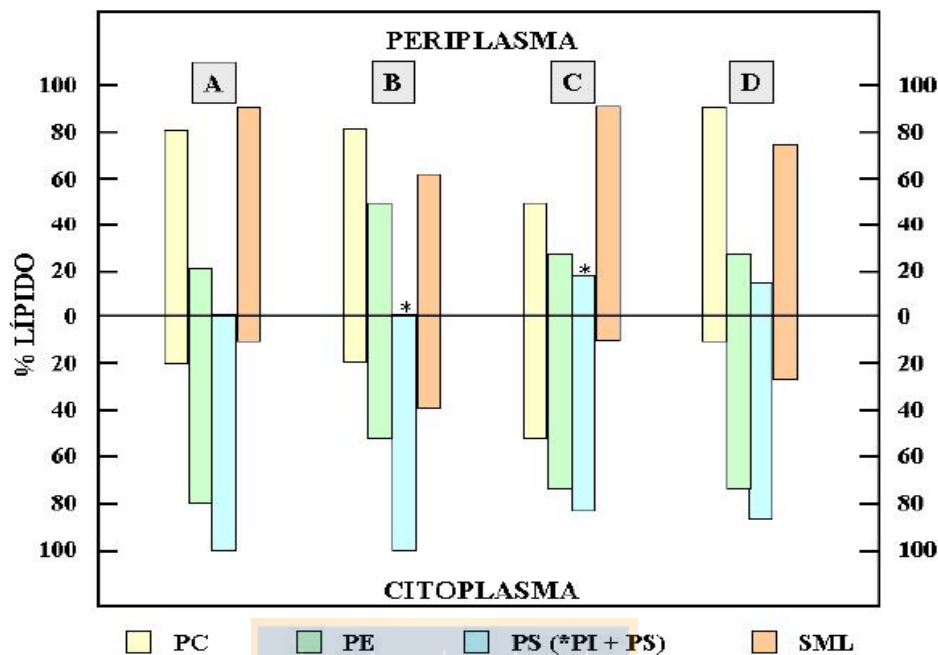


Figura 13: Composición lipídica asimétrica entre las monocapas de la membrana. (A) membrana de eritrocito humano, (B) Membrana plasmática de hígado de rata, (C) Membrana plasmática de plaquetas de cerdo. (D) Envoltura de VSV crecido en células BHQ-21<sup>106</sup>.

## 2.5 Modelos de membranas.

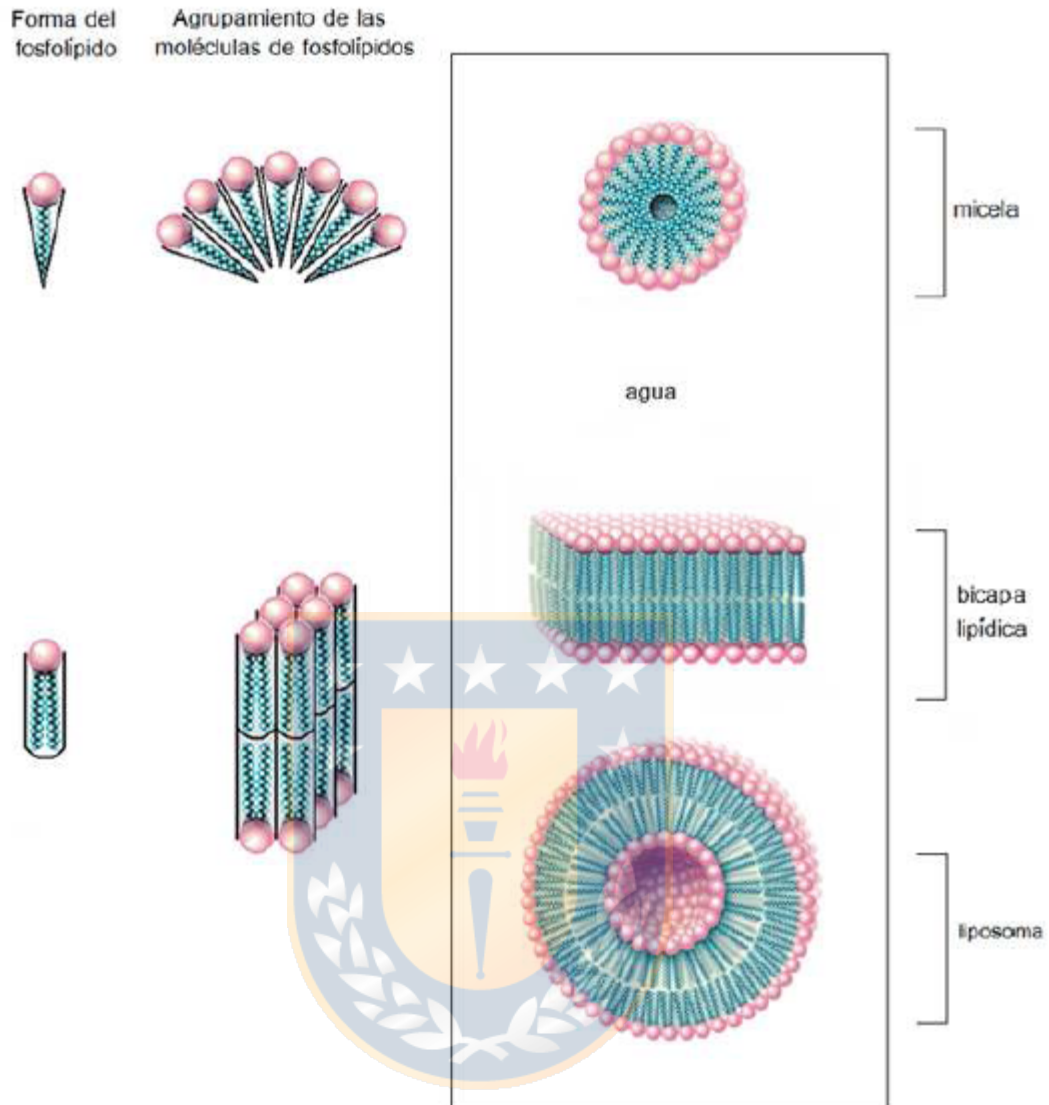
La estructura de la membrana celular es de una enorme complejidad debido a la mezcla heterogénea de lípidos y proteínas. Presenta además diferencias en su composición dependiendo de los distintos tipos de células; sin embargo, comparten características y una estructura básica de bicapa común a todas ellas lo que permite la utilización de sistemas representativos para facilitar el estudio de las propiedades de estas; el uso de estos modelos de membrana reduce el gran número de variables que existen en una membrana biológica real.

Por lo general estos modelos de membranas están formados por uno o dos fosfolípidos sintéticos y pueden ser separados fácilmente debido a la disposición natural de los fosfolípidos de agruparse y formar bicapas o micelas espontáneamente cuando se encuentran en agua, dependiendo de la proporción lípido – agua, gracias a su forma y naturaleza anfipática. Las moléculas hidrofílicas se disuelven rápidamente en agua porque contienen grupos cargados o grupos polares no cargados que

interaccionan favorablemente de forma electrostática por puentes de hidrógeno con las moléculas de agua. Las moléculas hidrófobas, por el contrario, son insolubles en medio acuoso y no establecen este tipo de interacciones con el solvente polar.

Cuando los fosfolípidos se dispersan en un medio acuoso ocasionan un aumento de energía libre. Los lípidos extraídos de la mayoría de las membranas celulares se disponen en lamelas (películas formadas por una doble capa) al suspenderse en agua (Fig. 14). Lo mismo sucede con muchos fosfolípidos puros, como por ejemplo la fosfatidilcolina. Estas lamelas se disponen en capas concéntricas evitando que la región hidrofóbica entre en contacto con el solvente polar dando origen a las estructuras denominadas liposomas. Cuando estos liposomas multilamelares se someten a irradiación ultrasónica se forman estructuras de una sola capa llamadas “vesículas lipídicas monolamelares” o liposomas monolamelares. Existen además técnicas que permiten incorporar en los liposomas proteínas intrínsecas y extrínsecas dando origen a los proteoliposomas.

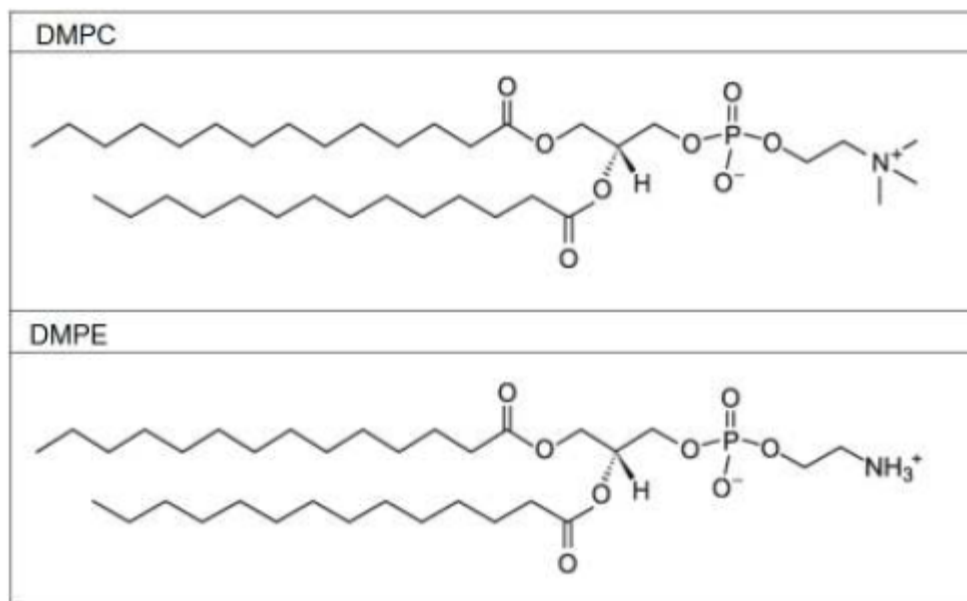




**Figura 14: Empaquetamientos de las moléculas de fosfolípidos en medio acuoso. Las formas cónicas forman micelas, mientras que las cilíndricas forman bicapas<sup>107</sup>.**

En el presente trabajo, los fosfolípidos sintéticos utilizados para los modelos de membrana fueron dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE) (Fig. 15) que representan clases de fosfolípidos que se ubican en la monocapa externa e interna de la membrana plasmática respectivamente.





**Figura 15: Estructura química de la dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE). (Fuente: Elaboración propia)**

Los fosfolípidos dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE) difieren solo en sus grupos amino terminales los cuales son  $+N(CH_3)_3$  en DMPC y  $+NH_3$  en DMPE. Sus conformaciones moleculares son muy similares en sus fases cristalinas con las cadenas hidrocarbonadas en su mayor parte paralelas y extendidas y los grupos polares perpendiculares a éstas. Sin embargo, difieren en sus modos de empaquetamiento (Fig. 16). DMPC presenta espacios interbicapas altamente polares, mientras que el empaquetamiento molecular de DMPE es muy compacto con fuertes interacciones electrostáticas y uniones H-H interbicapas que no dejan espacios libres. La hidratación de DMPC resulta en el ingreso de agua a los espacios polares entre las bicapas incrementando su ancho desde  $54.5\text{Å}$  en estado seco a  $64\text{ Å}$  en estado hidratado (Fig. 16A). Por otra parte DMPE no muestra un cambio significativo en presencia de agua (Fig. 16B).

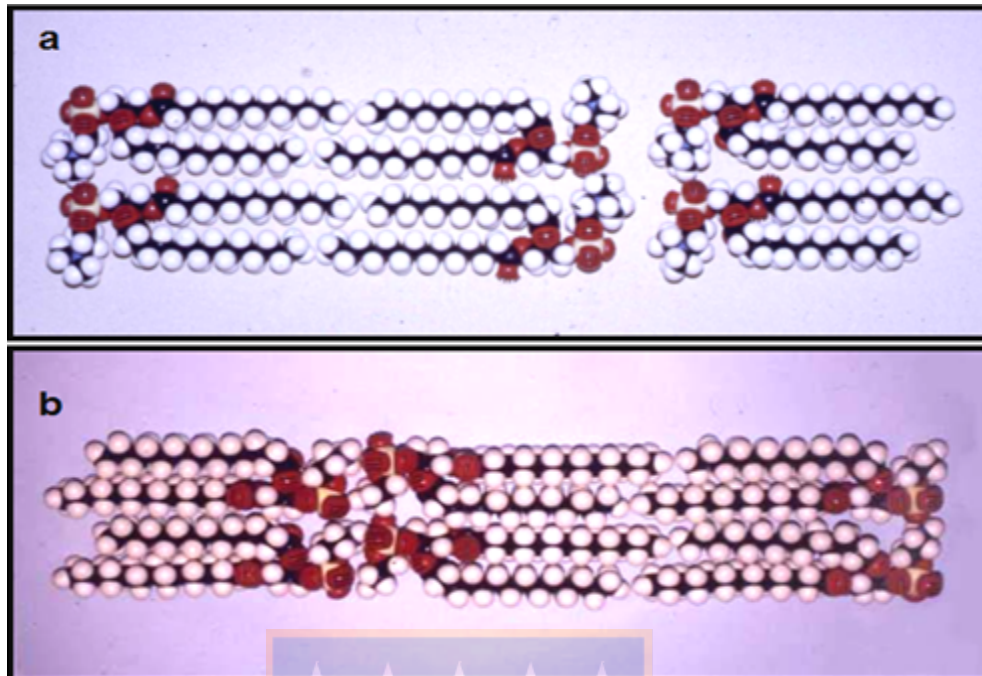
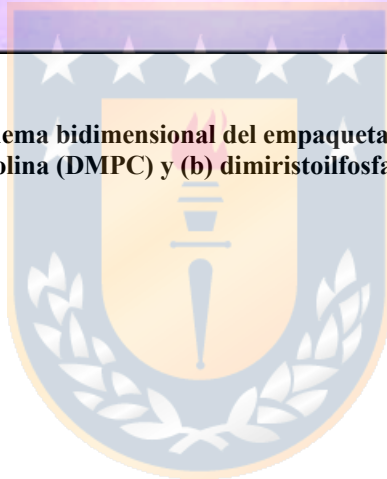


Figura 16: Esquema bidimensional del empaquetamiento molecular de (a) dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y (b) dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE)<sup>107</sup>.



### **3. TÉCNICAS UTILIZADAS PARA EL ESTUDIO DE INTERACCIÓN DE DROGAS CON MEMBRANAS CELULARES.**

La importancia del estudio de la interacción de drogas con membranas celulares radica en la valiosa información que se puede obtener de los resultados de las técnicas utilizadas. Mediante las diferentes experiencias es posible obtener datos acerca de la acción de la membrana sobre la droga y viceversa, es decir, información sobre el efecto de la droga sobre la estructura de la membrana. Con el paso del tiempo y los avances tecnológicos son cada vez más numerosas las técnicas utilizadas en el estudio de la interacción droga – membrana.

En el presente estudio las técnicas utilizadas son:

- Difracción de rayos X.
- Espectroscopía de fluorescencia de Laurdan y DPH.
- Calorimetría diferencial de barrido (DSC)
- Microscopía electrónica de barrido (SEM).

#### **3.1 Difracción de rayos X.**

Los rayos X son radiaciones electromagnéticas con longitudes de onda del orden de  $10^{-10}$  metros, que equivale a 1 Ångstrom. Estas longitudes de onda son similares a las distancias interatómicas en los materiales cristalinos, por lo que se puede utilizar la difracción de rayos X como un método para explorar la naturaleza de la estructura molecular.

La difracción es un fenómeno que consiste en la dispersión de las ondas cuando estas interaccionan con un objeto ordenado. La dispersión de estos rayos ocurrirá de tal forma que se cumpla la condición de Bragg para la difracción:

$$2 d \operatorname{sen} \theta = n \lambda$$

en que:

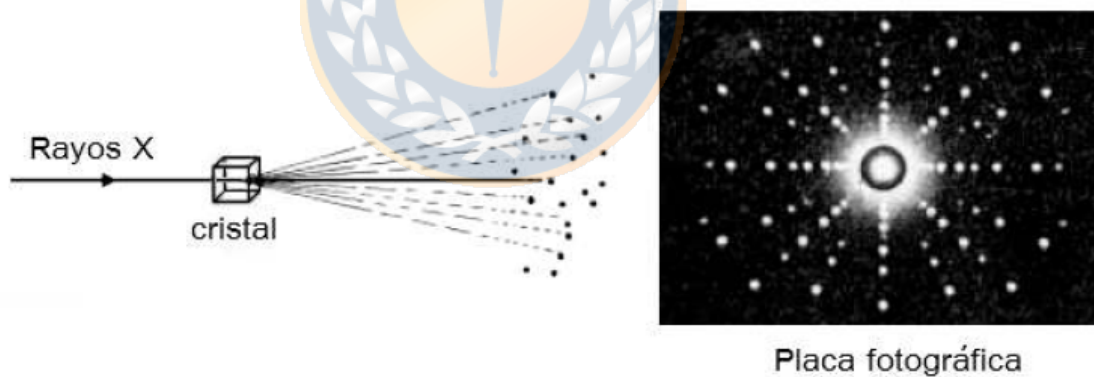
$d$  = espaciado interplanar.

$\theta$  = ángulo de difracción.

$n\lambda$  = número entero de longitudes de onda.

La diferencia de camino recorrido entre dos haces reflejados es de  $2d \operatorname{sen}(\theta)$ . Para tener interferencia constructiva, debe cumplirse que la diferencia de camino sea igual a un número entero de longitud de onda ( $n\lambda$ ), es decir, que las ondas estén en fase.

El método en general consiste en irradiar cristales con rayos X de una longitud de onda determinada (Fig. 17 y 18). El registro gráfico o diagrama de difracción consiste de círculos concéntricos distribuidos en función de valores angulares  $2\theta$ .



**Figura 17: Esquema de rayos X difractados. El cristal difracta el haz de rayos X y produce una distribución regular de puntos sobre una placa fotográfica<sup>107</sup>.**

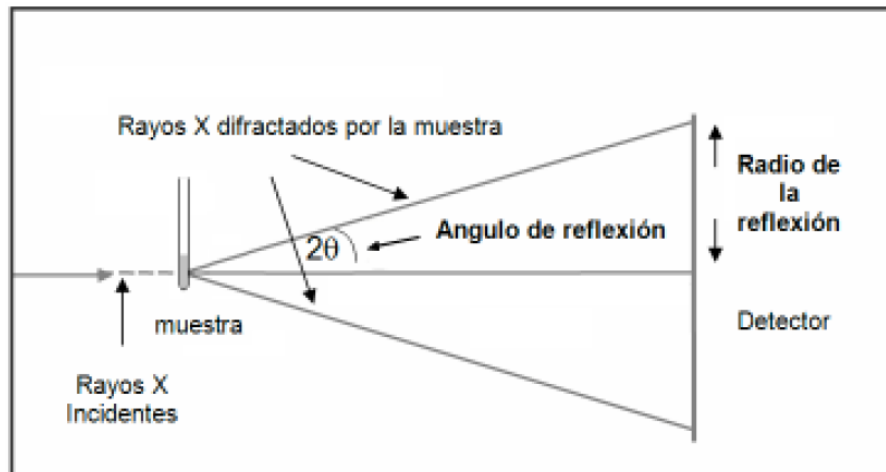


Figura 18: Esquema de rayos X difractados por una muestra en polvo<sup>107</sup>.

El aspecto limitante de la técnica de rayos X es que requiere no solo que las sustancias a analizar sean puras, sino que además sus átomos, iones o moléculas constitutivas estén regularmente ordenadas en las tres dimensiones del espacio.

En la membrana de los glóbulos rojos humanos estas condiciones no se dan ya que como se mencionó, están constituidas por tres clases de moléculas diferentes: proteínas, lípidos y agua. Por otra parte, existen alrededor de 200 proteínas y 100 tipos de lípidos diferentes. Además de esta gran heterogeneidad química, las proteínas se encuentran irregularmente distribuidas e inmersas en las bicapas lipídicas.

Otro factor importante es la presencia de una gran cantidad de agua en las membranas (alrededor del 50% de su peso) que contribuye a su fluidificación. Es por esta razón que las bicapas lipídicas son ampliamente utilizadas como modelos moleculares de membranas celulares.

### 3.2 Espectroscopía de fluorescencia.

La espectroscopia de fluorescencia es una de las técnicas espectroscópicas más utilizadas en los campos de la bioquímica y la biofísica molecular. Aunque las mediciones de fluorescencia no proporcionan información estructural, la técnica ha demostrado ser un método muy útil para investigar el entorno y el movimiento de moléculas fluorescentes y fluoróforos dentro de macromoléculas más grandes.

Las membranas típicamente no muestran fluorescencia intrínseca. Por esta razón, es común etiquetar membranas con sondas que se dividen espontáneamente en las regiones polares y no polares de las membranas. Dos de las sondas de membrana más utilizadas son 6-dodecanoil-2-dimetilaminonaftaleno (laurdan) y 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH). El espectro fluorescente de Laurdan es sensible a la polaridad (nivel de hidratación), a la dinámica dipolar del ambiente y al estado de fase de las bicapas de fosfolípidos. Por lo tanto, lauridan proporciona información sobre la dinámica molecular a nivel del esqueleto de glicerol y puede distinguir si una membrana está en un estado de gel o líquido cristalino. La molécula de Laurdan está fuertemente anclada en el núcleo hidrófobo de la bicapa por las interacciones hidrófobas entre su cola de ácido láurico y las colas de alquilo lipídico, mientras que el resto fluorescente está ubicado al nivel de glicerol de los grupos de cabeza de fosfolípidos (Fig. 19).

Los cambios espectrales en el espectro de emisión de lauridan se pueden caracterizar por la relación denominada polarización generalizada (GP), que se define como:

$$GP = \frac{I_b - I_r}{I_b + I_r}$$

donde  $I_b$  e  $I_r$  son las intensidades de fluorescencia medidas en los máximos de emisión de lauridan que se caracterizan por el gel y las fases cristalinas líquidas, respectivamente.

La sonda fluorescente DPH se ha utilizado ampliamente para estudiar la estructura y las propiedades dinámicas del modelo y las membranas naturales. El DPH se propuso

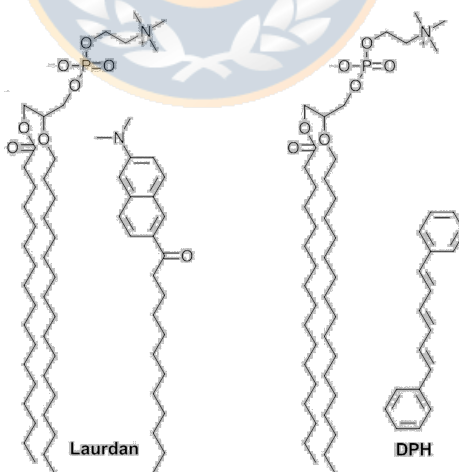
originalmente como una sonda para estimar la microviscosidad de las membranas celulares y la rigidez de los sitios de unión en las proteínas.

Este procedimiento supone que la ubicación de la sonda en las membranas se encuentra en el núcleo hidrófobo profundo de la bicapa (Figura 19). Mide la anisotropía de fluorescencia en estado estacionario ( $r$ ), que se define como:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

donde  $I_{\parallel}$  y  $I_{\perp}$  son las intensidades de fluorescencia de las emisiones polarizadas vertical ( $\parallel$ ) y horizontal ( $\perp$ ), cuando la muestra sale con luz polarizada.

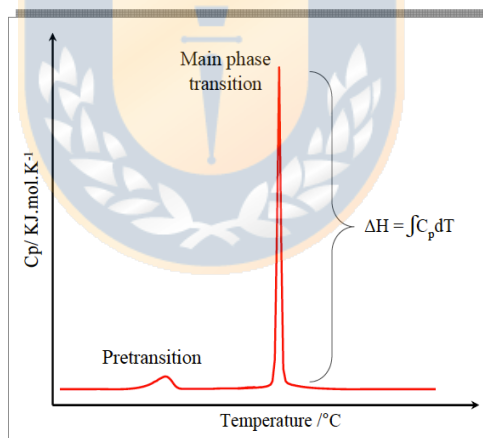
Por lo tanto, un fluoróforo en un entorno altamente viscoso gira lentamente en relación con su vida útil fluorescente tendrá un gran valor de  $I_{\parallel}$  y un pequeño valor de  $I_{\perp}$  y por ende, una anisotropía relativamente grande. Para los fluoróforos que caen rápidamente en relación con su vida útil fluorescente,  $I_{\parallel}$  y  $I_{\perp}$  serán similares y la anisotropía será cercana a cero. La medición de  $r$  proporciona información útil sobre la movilidad molecular, el parámetro de orden y la fluidez de un medio (es decir, la bicapa lipídica).



**Figura 19: Estructuras químicas de Laurdan y DPH y su ubicación aproximada frente a una molécula de DMPC. (Fuente: Elaboración propia)**

### 3.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Mediante la técnica de DSC es posible estudiar una amplia variedad de transiciones inducidas por la temperatura en sistemas biológicos, especialmente los procesos de transiciones de fase de membrana lipídicas. Dichos experimentos se analizan para proporcionar no solo el comportamiento de la fase termotrópica y la energía de las transiciones, sino también información sobre la cooperatividad. DSC es una técnica termodinámica no perturbadora que mide el intercambio de calor asociado con las transiciones cooperativas de fase lipídica en el modelo y las membranas biológicas. Los parámetros más importantes asociados con las interacciones entre lípidos y medicamentos son el cambio en la temperatura de transición de la fase principal ( $T_m$ ), el ancho del pico de transición principal y el cambio de entalpía ( $\Delta H$ ) asociado al proceso.



**Figura 20: Perfil de capacidad de calor ( $C_p$ ) esquemático que muestra las temperaturas de pretransición y transición principal de fase. (Fuente: Elaboración propia)**

El primer parámetro es una expresión de los cambios en la fluidez de la membrana, el segundo y el tercero son una medida de desestabilización de la bicapa de fosfolípidos. En un experimento de DSC, una celda de muestra y una celda de referencia se mantienen a la misma temperatura. A medida que avanza el experimento, la muestra y la celda de referencia se calientan de manera controlada, de modo que ambas

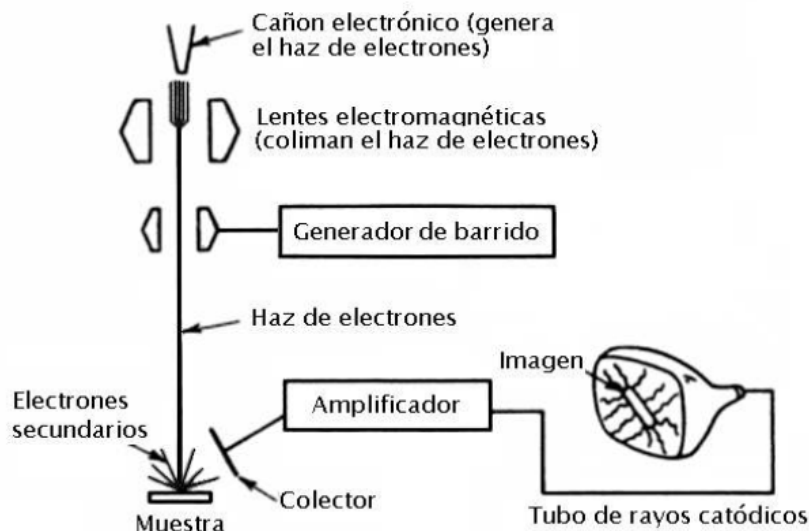


siempre se mantienen a la misma temperatura. La energía suministrada para calentar cada celda se monitorea durante este proceso. Cuando se produce una transición de fase, existe una diferencia en la potencia necesaria para calentar las dos celdas. La potencia requerida para mantener ambas celdas a la misma temperatura se mide y se convierte para obtener una salida de la capacidad de calor en comparación con la temperatura. Esta curva se analiza para determinar la  $T_m$  y se integra para determinar la entalpía calorimétrica de la transición ( $\Delta H$ ) (Figura 20).

### **3.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM).**

El microscopio electrónico de barrido logra la formación de la imagen mediante la amplificación electrónica de señales generadas al irradiar la superficie de la muestra con un haz muy estrecho de electrones. Esta radiación hace que la muestra desprenda electrones de baja energía que pueden ser recogidos sobre una placa cargada positivamente (ánodo) generando de este modo una señal eléctrica que es proporcional al número de electrones que inciden en el ánodo.

Como la cantidad de electrones depende del número desprendido y del número reabsorbido por la cantidad de protuberancias circundantes en la superficie de la muestra, la señal eléctrica puede ser utilizada para generar una imagen de la muestra. Mediante el uso de un generador de barrido se hace que el haz de electrones atraviese la muestra siguiendo un rastreo de trama o barrido. La señal generada se amplifica y se utiliza para modular la intensidad de un punto que barre un tubo de rayos catódicos poniéndola en preciso registro con la pauta del haz de electrones. De este modo, en el tubo de rayos catódicos aparece una imagen amplificada de la topografía de la superficie de la muestra (Fig. 21).



**Figura 21: Representación esquemática de la obtención de una imagen en un microscopio electrónico de barrido<sup>107</sup>.**

Para aplicar esta técnica al presente estudio se utilizan glóbulos rojos humanos. La fácil obtención de este tipo de células ha permitido ser la más estudiada y se ha empleado tradicionalmente como modelo para estudiar la membrana plasmática ya que representan un modelo celular muy simple; además, a pesar de carecer de maquinaria de síntesis proteica y de ser menos especializadas que muchas otras células, sus membranas desarrollan suficientes funciones en común con ellas como son el transporte activo y pasivo, la producción de gradientes iónicos y eléctricos para ser consideradas representativas de las membranas plasmáticas celulares en general. En condiciones fisiológicas el eritrocito normal asume una forma discoidea bicóncava de unos 8  $\mu\text{m}$  de diámetro. Diversos agentes pueden modificar esta forma, modificación que estaría dada por el cambio en la proporción normal entre las áreas de la monocapa externa e interna de la bicapas lipídica de la membrana celular. Sheetz y Singer (1974) propusieron la hipótesis del par bicapas (Fig. 22), según la cual las dos monocapas presentes en las membranas celulares, donde las proteínas y lípidos están distribuidos asimétricamente, pueden responder de forma diferente a una perturbación; de existir interacciones entre un compuesto y la membrana de las

células, éstas sufrirán cambios en su morfología dependiendo de la monocapa en la cual se incorpore el compuesto, lo que provocará la expansión lateral de ésta con respecto a la otra monocapa. Los compuestos que preferentemente se intercalan en la monocapa externa de la bicapas lipídica producen su expansión lateral lo que implica la crenación del glóbulo rojo dando lugar a equinocitos. Por el contrario, si el compuesto se ubica preferentemente en la monocapa interna ésta se expande produciéndose invaginaciones y la formación de estomatocitos.

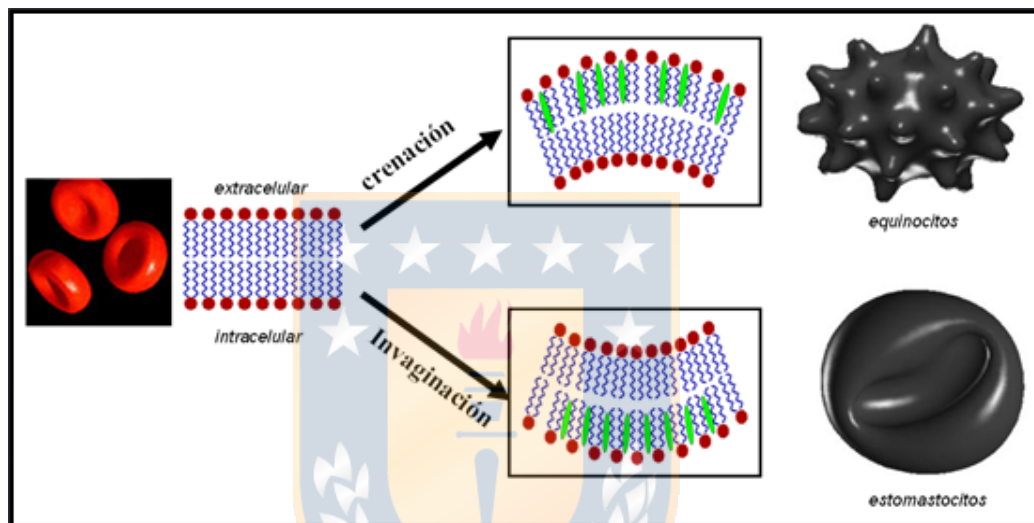
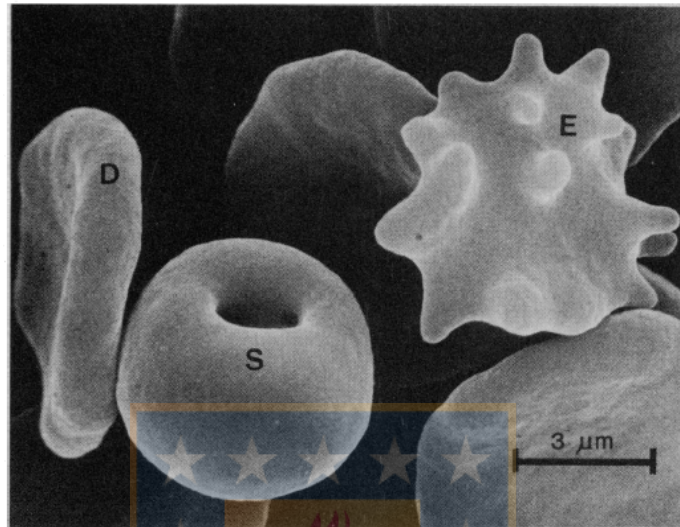


Figura 22: Representación esquemática de la hipótesis del par bicapa<sup>107</sup>.

La deformación del eritrocito ocurre principalmente de manera secuencial a medida que la interacción entre el compuesto y la monocapa sea más intensa. En la deformación de equinocitos se presentarán cada vez un mayor número de espículas que se irán haciendo más pequeñas y numerosas conforme aumenta la interacción. De igual manera, en las formas estomatocíticas la invaginación pasará de una forma circular a la forma de copa y a mayores interacciones se producirán múltiples invaginaciones. También pueden presentarse formas no secuenciales como discocitos asimétricos y knizocitos, aunque en menor proporción que las formas secuenciales.

En la Fig. 23 se presentan, a modo de ejemplo, eritrocitos humanos con su morfología normal alterada debido a la capacidad de algunos fármacos de interactuar con su membrana y provocar algunas de las perturbaciones ya mencionadas<sup>108</sup>.



**Figura 23: Imagen de formas alteradas de eritrocitos: discocitos normales (D); estomatocitos (S) y equinocitos (E) obtenida mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)<sup>108</sup>.**

#### **4. HIPÓTESIS.**

“Las drogas terapéuticas utilizadas en la EA e híbridos de huprina interactúan con membranas celulares y estos últimos poseen un efecto protector frente al péptido amiloide”.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1 Objetivos Generales**

“Estudiar el efecto de las drogas donepezilo, rivastigmina, memantina sobre membranas celulares y determinar el efecto protector de híbridos huprónicos frente a la toxicidad de los péptidos  $A\beta(1-40)$  y  $A\beta(1-42)$ .”

##### **5.2 Objetivos Específicos**

1. Determinar, mediante la técnica de difracción de rayos X, los efectos de los híbridos de huprina y las drogas memantina, donepezilo y rivastigmina sobre la estructura de los modelos moleculares de membrana constituidos por multibicapas lipídicas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE).
2. Determinar, mediante la técnica de difracción de rayos X, los efectos de los péptidos  $A\beta(1-40)$  y  $A\beta(1-42)$  sobre la estructura de los modelos moleculares de membrana constituidos por multibicapas lipídicas de DMPC y DMPE.
3. Determinar, mediante la técnica de difracción de rayos X, el efecto de la mezcla de derivados huprónicos con los péptidos  $A\beta(1-40)$  y  $A\beta(1-42)$  sobre la estructura de los modelos moleculares de membrana constituidos por multibicapas lipídicas de DMPC y DMPE.

4. Determinar, mediante la técnica de espectroscopía de fluorescencia, los efectos de memantina, donepezilo y rivastigmina sobre la polarización generalizada de lauridan y anisotropía de DPH en vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC y en membranas no selladas de eritrocitos humanos (IUM).
5. Determinar, mediante la técnica de espectroscopía de fluorescencia, los efectos de los péptidos A $\beta$ (1-40) y A $\beta$ (1-42) sobre la polarización generalizada de lauridan y anisotropía de DPH en LUV de DMPC y IUM.
6. Determinar, mediante la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC), los efectos de los híbridos de huprina, memantina, donepezilo, rivastigmina y péptidos A $\beta$ (1-40) y A $\beta$ (1-42) sobre el comportamiento termotrópico de vesículas multilamelares (MLV) constituidos por multibicapas lipídicas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE).
7. Visualizar y describir el efecto de los híbridos de huprina, memantina, donepezilo, rivastigmina y los péptidos A $\beta$ (1-40) y A $\beta$ (1-42) en la morfología de eritrocitos humanos mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).
8. Visualizar y describir el efecto de la mezcla de los derivados huprónicos con los péptidos A $\beta$ (1-40) y A $\beta$ (1-42) en modelos moleculares de membrana constituidos por multibicapas lipídicas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y/o dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE).
9. Visualizar y describir el efecto de la mezcla de los derivados huprónicos con los péptidos A $\beta$ (1-40) y A $\beta$ (1-42) en eritrocitos humanos.

## 6. METODOLOGÍA.

### 6.1 Estudio por difracción de rayos X.

Este estudio se realizó mediante la utilización de multibicapas lipídicas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE).

El procedimiento de preparación de las muestras fue el mismo tanto para DMPC como para DMPE. Se preparó un blanco, que contenía 2 mg del respectivo fosfolípido (Microbalanza Cahn C-33, Orion, USA), en tubos Eppendorf a los que se adicionó 150  $\mu$ L de agua bidestilada. Posteriormente, para la preparación de las muestras con los compuestos, se pusieron 2 mg de cada fosfolípido en tubos Eppendorf y se adicionó a cada uno 200  $\mu$ L de solución acuosa del compuesto híbrido más el A $\beta$  en distintas concentraciones. Luego, el blanco y los tubos con los fosfolípidos más la droga se sometieron a incubación durante 30 minutos en un baño de agua con termostato de inmersión (Thermo Haake C10, Germany) a 30 °C para el caso del DMPC y a 60 °C para DMPE. Una vez terminada la incubación se puso cada suspensión en un capilar especial de vidrio (Glas-Technick & Konstruktion, Berlin, Germany) y se centrifugó a 2500 rpm por 15 minutos (Centrífuga Selecta, Mod. Mixtasel, España) para finalmente llevar la muestra al equipo generador de rayos X (Bruker Kristalloflex 760, Germany) donde fueron difractadas utilizando radiación CuK $\alpha$  ( $\lambda=1.52$  Å) con filtro de Ni a una temperatura ambiente controlada de  $18 \pm 2$  °C. Las intensidades y espaciados interplanares fueron obtenidas a través del software ASA acoplado al detector (Hecus M. Braun, Mod. PSD 50M, Germany). Para el análisis y tratamiento de los datos se utilizó el programa Origin 8.0 (OriginLab Corporation, USA) con el que se compararon los diagramas de las intensidades de los fosfolípidos de las muestras blanco con los obtenidos por incubación con cada una de las soluciones y suspensiones de los distintos compuestos.<sup>109-114</sup>

## **6.2 Espectroscopía de fluorescencia de vesículas unilamelares grandes (LUV) y membranas aisladas de eritrocitos humanos sin sellar (IUM).**

La espectroscopia de fluorescencia se utilizó para estudiar la interacción de las moléculas en estudio con liposomas grandes unilamelares (LUV) de DMPC y membranas aisladas de eritrocitos no sellados (IUM). Para esto, se utilizaron las sondas laurdan y 1,6-difenil-hexa-1,3,5-trieno (DPH). Los LUV se prepararon mediante el método de extrusión detallado por Suwalsky et al.<sup>115</sup> Por otro lado, los IUM se prepararon siguiendo el método de Dodge et al.<sup>116</sup> con sangre de un donante sano sin tratamiento farmacológico. Las sondas de DPH y laurdan se incorporaron a las suspensiones LUV y IUM mediante la adición de alícuotas de 1  $\mu$ l / ml de soluciones madre 0,5 mM de la sonda en dimetilsulfóxido y etanol, respectivamente, y se incubaron a 37 °C durante 1 h. La temperatura de las muestras se controló mediante un circulador de baño externo y se verificó antes y después de cada medición. Las moléculas y drogas en estudio se incorporaron a las LUV y IUM agregando un volumen adecuado de una solución concentrada de la droga para obtener las diferentes concentraciones utilizadas en los estudios. La sustracción del blanco se desarrolló en todas las mediciones utilizando muestras sin sondas.

Las mediciones de polarización generalizada y anisotropía se realizaron en un espectrofluorómetro K-2 (ISS Inc., Champaign, IL, EE. UU.) utilizando el software ISS para la recopilación y el análisis de datos. Las mediciones se realizaron a 18 °C y 37 °C para LUV y 37 °C para suspensiones de IUM. Los datos presentados en las figuras representan valores medios y error estándar de 15 mediciones en tres experimentos independientes.



### **6.3 Análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de vesículas multilamelares (MLV) de DMPC y DMPE.**

Se prepararon cantidades apropiadas de DMPC o DMPE disueltos en cloroformo puro (calidad analítica) en un tubo de ensayo de vidrio para obtener una concentración final de fosfolípidos de 1 mM. Mediante un flujo suave de gas nitrógeno, se eliminó el disolvente y se formó una película delgada en las paredes de los tubos de vidrio. Las películas se hidrataron con agua destilada (y soluciones acuosas de las drogas y moléculas en estudio) y se formaron liposomas multilamelares (MLV) agitando en vórtex las muestras durante 1 minuto a una temperatura superior a la de transición de fase de la cadena del fosfolípido puro (aproximadamente 30 ° C y 60 ° C para DMPC y DMPE, respectivamente). Los experimentos de DSC se realizaron usando el sistema NANO DSC Serie III con célula capilar de platino (TA Instruments, New Castle, EE. UU.) con un volumen activo de 300 µl. Las muestras se desgasificaron para evitar la formación de burbujas tirando de un vacío de 30,4 - 50,7 kPa en la solución durante 15 minutos. Luego, se colocaron 300 µl de solución de muestra en la celda de muestra y se utilizó un volumen igual de agua destilada como referencia. Las células se sellaron y se equilibraron térmicamente durante 10 minutos a la temperatura de partida. Los análisis calorimétricos se llevaron a cabo en muestras con una presión de 0,3 MPa. Las tasas de calentamiento/enfriamiento fueron 1 °C min<sup>-1</sup> y los escaneos se registraron dentro de un rango de 5-40 °C (DMPC) y 30-70 °C (DMPE). Los termogramas se corrigieron restando escaneos de agua en blanco y normalizando a la concentración de lípidos correspondiente. Los parámetros termodinámicos se obtuvieron utilizando el paquete de software TA Instruments. Las mediciones de DSC se realizaron por triplicado.

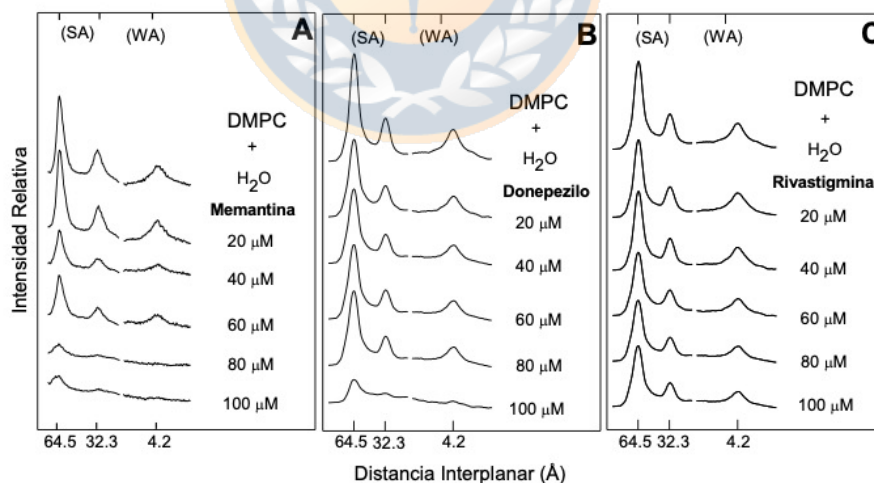
#### **6.4 Estudio por microscopía electrónica de barrido (SEM).**

El estudio *in vitro* de los efectos de los compuestos sobre eritrocitos humanos se realizó mediante la observación de los cambios en su morfología. Para esto se obtuvo sangre desde un donante adulto sano sin tratamiento farmacológico. Aproximadamente una gota de sangre se recibió en un tubo Eppendorf con 1000  $\mu\text{L}$  de PBS (Phosphate Buffer Saline) 1X pH 7.4 con 1mg/mL de BSA (Bovine Serum Albumine). Se sometió la muestra a centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos (Centrífuga Selecta, Mod. Mixtasel, España), y luego se extrajo el sobrenadante y se reemplazó con igual cantidad de solución de PBS y BSA. Este procedimiento se repitió tres veces para asegurar la eliminación completa del plasma. La muestra de eritrocitos se repartió en tubos Eppendorf considerando también una muestra control. Se centrifugó y se reemplazó el sobrenadante por 250  $\mu\text{L}$  de solución del compuesto en estudio en diferentes concentraciones preparadas en solución de PBS y BSA. Posteriormente las muestras se incubaron a 37 °C durante una hora en un baño de agua con termostato de inmersión (Thermo Haake C10, Germany), y luego se centrifugaron a 1000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se eliminó y se reemplazó por 250  $\mu\text{L}$  de solución de glutaraldehído al 2.5% y se dejó reposar por 24 horas a 4 °C. Posterior a esto, las muestras se centrifugaron a 1000 rpm por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de agua nanopura. Con el objetivo de eliminar completamente el glutaraldehído de los eritrocitos este procedimiento se realizó tres veces más. Posteriormente, se depositaron aproximadamente 10  $\mu\text{L}$  de cada muestra sobre una fina placa de vidrio dispuesto en un soporte de aluminio. Se dejó secar en estufa a 37 °C, siendo posteriormente metalizadas con un baño de oro a 13.3 Pa por 3 minutos mediante un metalizador (Edwards S150, Sussex, England). A continuación, se observaron las muestras en el microscopio electrónico de barrido (JEOL, Mod. JSM 6380 LB, Japan) obteniéndose en promedio tres fotografías por muestra con un aumento de 2500X.

## 7. RESULTADOS.

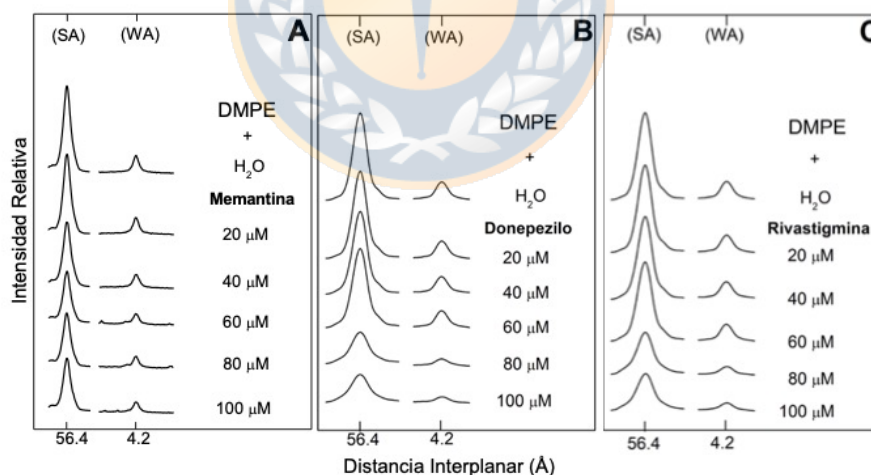
### 7.1 Estudios por difracción de rayos X.

Las interacciones moleculares de memantina, donepezilo, rivastigmina, péptido A $\beta$ (1-40), péptido A $\beta$ (1-42) y los híbridos H1, H2 y H3 fueron determinadas mediante difracción de rayos X. La Fig. 24 muestra los patrones de difracción de DMPC puro y DMPC incubado con diferentes concentraciones de soluciones acuosas de memantina, donepezilo y rivastigmina. Como era de esperar, el agua alteró la estructura de DMPC, lo que se vio reflejado en que el espacio interbicapa aumentó de aproximadamente 55 Å en su forma cristalina seca a 64.5 Å cuando se sumergió en agua, y sus reflexiones de ángulo pequeño (SA) se redujeron a solo las dos primeras órdenes del ancho de la bicapa. Por otro lado, una fuerte reflexión de 4,2 Å ubicado en la región de gran angular (WA) corresponde a la distancia promedio entre cadenas de acilo totalmente extendidas empaquetadas hexagonalmente con desorden rotacional.



**Figura 24: Microdensitogramas de difracción de rayos X de multibicapas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) con agua (H<sub>2</sub>O) y soluciones acuosas de (A) memantina, (B) donepezilo y (C) rivastigmina. SA y WA corresponden a reflexiones de ángulo bajo y ancho respectivamente. (Fuente: Elaboración propia)**

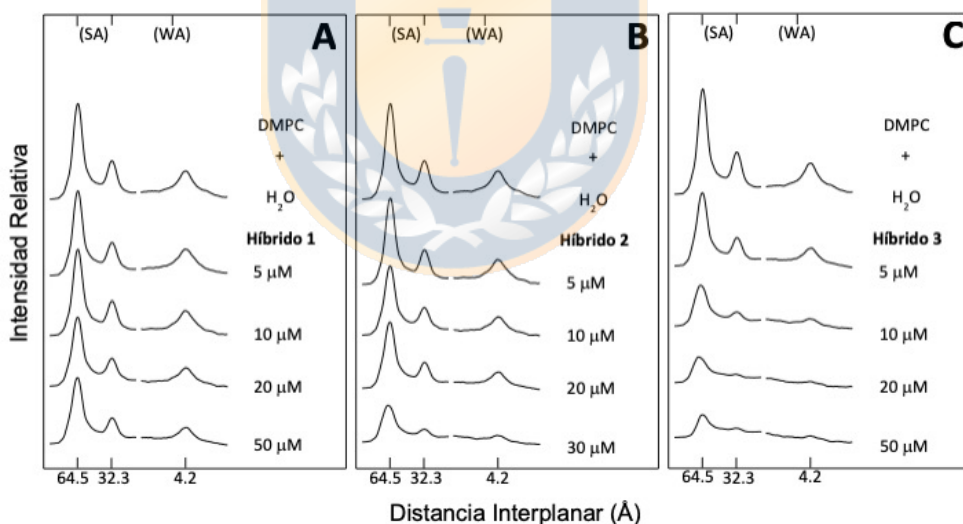
La Fig. 24-A revela que después de la exposición a memantina en el rango de 20  $\mu\text{M}$  a 80  $\mu\text{M}$  hubo un debilitamiento gradual de las intensidades de las reflexiones de DMPC. La Tabla 7.1 también muestra que con memantina 80  $\mu\text{M}$ , hubo un debilitamiento de un 91.3 % de la intensidad de difracción en la zona de las cabezas polares de DMPC y un 98.4 % en la zona de las colas. A partir de estos resultados se puede concluir que memantina produjo una perturbación estructural tanto de las regiones polares como de las colas acil hidrófobas de las bicapas DMPC. La Fig. 24-B muestra los patrones de difracción de DMPC incubado con diferentes soluciones acuosas de donepezilo. En este caso se observa un debilitamiento gradual de las intensidades de reflexión correspondientes tanto a las cabezas polares (SA) como a las colas hidrofóbicas (WA) del fosfolípido. A 100  $\mu\text{M}$  de donepezilo ambas reflexiones prácticamente desaparecen (74.4 % de debilitamiento para SA y 90.3 % para WA (Tabla 7.2). Por otro lado, los efectos producidos por rivastigmina sobre la estructura de DMPC se observan en la Fig. 24-C. Como se puede apreciar, incluso a una concentración 100  $\mu\text{M}$  se produce solamente una suave disminución de las intensidades de las reflexiones en ambas regiones (SA y WA).



**Figura 25: Microdensitogramas de difracción de rayos X de multicapas de dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE) con agua (H<sub>2</sub>O) y disoluciones acuosas de (A) memantina, (B) donepezilo y (C) rivastigmina. SA y WA corresponden a reflexiones de ángulo bajo y ancho respectivamente. (Fuente: Elaboración propia)**

La Fig. 25 muestra los patrones de difracción de DMPE puro y DMPE incubado con diferentes soluciones acuosas de memantina, donepezilo y rivastigmina en distintas

concentraciones. La Fig. 25-A muestra los patrones de DMPE incubado con agua y con soluciones acuosas de memantina. Se ha reportado previamente que el agua no causa ningún efecto significativo en las bicapas de DMPE<sup>117</sup>. Por otro lado, el aumento de la concentración de memantina hasta 100  $\mu\text{M}$  indujo solo cambios moderados en los patrones de difracción de DMPE produciendo una reducción de la intensidad de 45.6 % en la zona de SA y un 43.7 % en la zona de WA (Tabla 7.1). La Fig. 25-B muestra el efecto de donepezilo sobre la estructura del DMPE. En este caso se observa que al incrementar la concentración de donepezilo hasta 100  $\mu\text{M}$  se aprecia una notable reducción de las intensidades de las reflexiones en ambas zonas de la bicapa del fosfolípido superando el 80 % de reducción tanto en las cabezas polares como en las colas acílicas (Tabla 7.2). De igual modo, la Fig. 25-C muestra los resultados obtenidos para rivastigmina, en los cuales se observa que a medida que se aumentó la concentración de la droga, la intensidad de ambas reflexiones (SA y WA) disminuyó hasta un 53.5 % y 42.1 % respectivamente (Tabla 7.3).

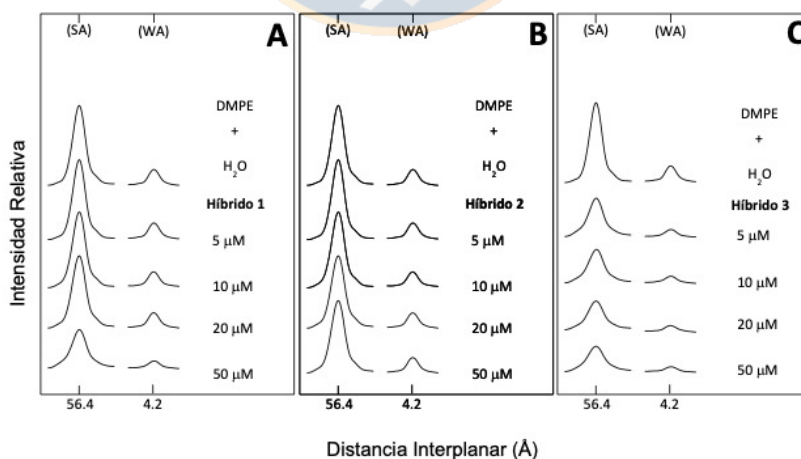


**Figura 26: Microdensitogramas de difracción de rayos X de multibicapas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) con agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ) y soluciones acuosas de (A) Híbrido 1, (B) Híbrido 2 y (C) Híbrido 3. SA y WA corresponden a reflexiones de ángulo bajo y ancho respectivamente. (Fuente: Elaboración propia)**

Una comparación de los patrones de difracción de DMPC en agua y DMPC incubado con disoluciones acuosas de los híbridos 1, 2 y 3 en un rango de concentraciones de 5-50  $\mu\text{M}$  se muestran en la Fig. 26. Como se observa, la incubación de estos tres

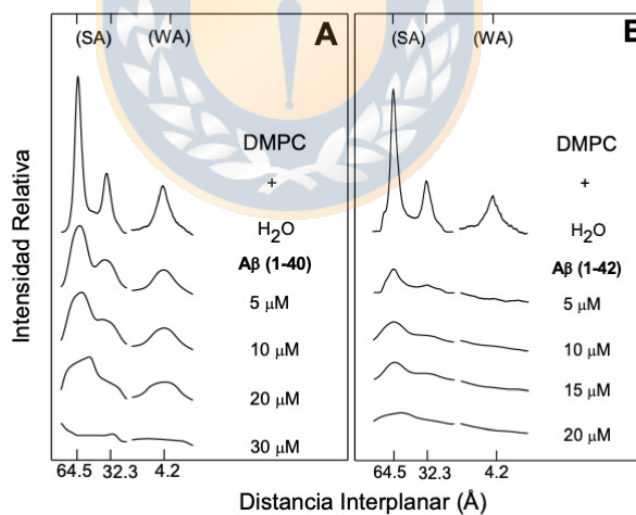
compuestos con DMPC produce un debilitamiento gradual de las intensidades de difracción del fosfolípido tanto en las regiones de las cabezas polares como en las colas hidrofóbicas. H1 (Fig. 26-A) en concentraciones de 5-50  $\mu\text{M}$  no produce cambios significativos, reduciendo la intensidad de difracción en 13.4 % (para SA) y 8.2% (para WA) con la concentración máxima estudiada (Tabla 7.4). En cambio, H2 (Fig. 26-B) fue capaz de alterar la estructura de DMPC debilitando la intensidad de difracción en más de un 50 % para ambas regiones del fosfolípido: 64.6 % para SA y 52.2 % para WA (Tabla 7.5). El efecto de H3 sobre DMPC se muestra en la Fig. 26-C. En el rango de concentraciones de 5-50  $\mu\text{M}$  H3 indujo una fuerte disminución de las intensidades de difracción llegando prácticamente a desaparecer la señal WA, con un debilitamiento del 89.3 % respecto al blanco (Tabla 7.6).

Por otra parte, se estudió el efecto de los híbridos H1, H2 y H3 en multibicapas de DMPE utilizando las concentraciones de 5, 10, 20 y 50  $\mu\text{M}$ . Como se puede apreciar en la Fig. 27, el híbrido H1 (Fig. 27-A) posee un efecto moderado sobre el ordenamiento de las moléculas de DMPE ya que incubado en el rango de concentraciones de 5-20  $\mu\text{M}$  altera débilmente la intensidad de difracción de rayos X. Este debilitamiento es mayor a 50  $\mu\text{M}$  en donde la intensidad de difracción disminuyó un 41.3 % y 43.6 % para las regiones de la cabeza polar y colas hidrofóbicas del fosfolípido, respectivamente (ver Tabla 7.4).



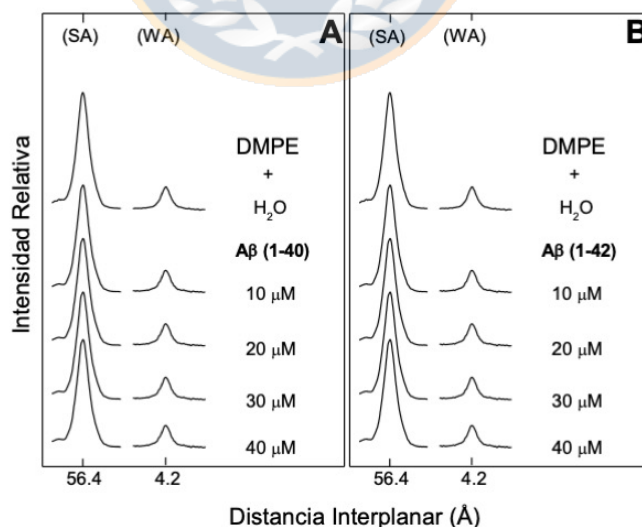
**Figura 27: Microdensitogramas de difracción de rayos X de multibicapas de dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE) con agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ) y soluciones acuosas de (A) Híbrido 1, (B) Híbrido 2 y (C) Híbrido 3. SA y WA corresponden a reflexiones de ángulo bajo y ancho respectivamente. (Fuente: Elaboración propia)**

La Fig. 27-B también muestra que H2 en el rango de concentraciones de 5-50  $\mu\text{M}$  no produce alteraciones significativas en el fosfolípido. Esto se ve reflejado en la débil disminución de las intensidades de difracción de las cabezas polares y cadenas acílicas que disminuyeron solo un 2.6 % y 1.3 %, respectivamente (Tabla 7.5). Por otra parte, H3 (Fig. 27-C) mostró un marcado efecto sobre DMPE cuando se incubó en concentraciones de 5-50  $\mu\text{M}$ . Con una concentración de 5  $\mu\text{M}$  la intensidad de difracción de la señal de WA disminuyó un 34.6% (Tabla 7.6). Esta disminución paulatina de las intensidades de difracción se presentó en ambas regiones del fosfolípido (cabezas polares y colas hidrofóbicas), y a 50  $\mu\text{M}$  H3 indujo una disminución del 56.3% de la intensidad relativa correspondiente a las cabezas polares de DMPE (SA) (Tabla 7.6). Con esto es posible decir que los tres híbridos fueron capaces de alterar (en diferentes niveles) el orden y empaquetamiento de DMPE en estado puro e inducir las alteraciones estructurales demostradas a través de los patrones de difracción de las muestras.



**Figura 28: Microdensitogramas de difracción de rayos X de multicapas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) con agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ) y soluciones de (A) péptido  $\text{A}\beta$  (1-40) y péptido  $\text{A}\beta$  (1-42). SA y WA corresponden a reflexiones de ángulo bajo y ancho respectivamente. (Fuente: Elaboración propia)**

En la Fig. 28 Se muestran los resultados de los experimentos de difracción de rayos X de DMPC puro incubado con agua y DMPC incubado con los péptidos A $\beta$  (1-40) y A $\beta$  (1-42) en el rango de concentraciones de 5 – 30  $\mu$ M. Tal como se aprecia en la Fig. 28-A, A $\beta$  (1-40) fue capaz de disminuir fuertemente las intensidades de difracción de DMPC tanto a nivel de las cabezas polares como las colas hidrofóbicas. Este efecto fue observado incluso a bajas concentraciones (5  $\mu$ M) con la cual la intensidad de difracción disminuyó un 42.4 % en la zona de las cabezas polares y un 21.8 % en las colas hidrofóbicas (Tabla 7.7). Al aumentar sucesivamente las concentraciones de A $\beta$  (1-40) este debilitamiento de las señales fue periódico y a 30  $\mu$ M casi la totalidad de las señales para ambas regiones (SA y WA) desaparecieron. El mismo efecto puede apreciarse al incubar DMPC con soluciones de A $\beta$  (1-42) (Fig. 28-B). Sin embargo, el efecto de este péptido es más fuerte que A $\beta$  (1-40) debido a que a las mismas concentraciones se produce un debilitamiento mucho mayor llegando a extinguirse por completo las señales correspondientes a las colas acílicas a una concentración de 10  $\mu$ M del fosfolípido. Al mismo tiempo, las señales correspondientes a las cabezas polares (SA) de DMPC sufrieron un debilitamiento gradual el cual fue máximo a 20  $\mu$ M, en el cual hubo un decaimiento de 99.9 % de la intensidad relativa (Tablas 7.7 y 7.8).



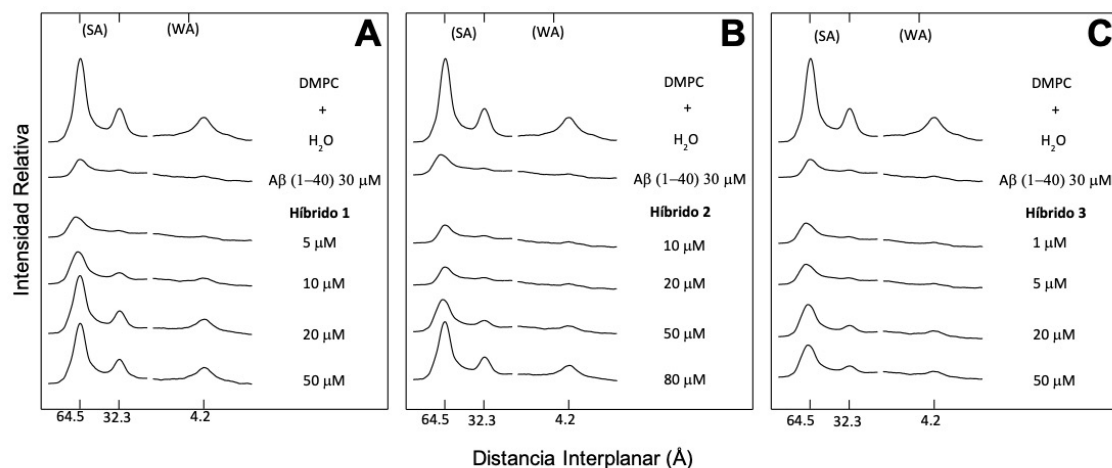
**Figura 29: Microdensitogramas de difracción de rayos X de multicapas de dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE) con agua (H<sub>2</sub>O) y soluciones de (A) péptido A $\beta$  (1-40) y péptido A $\beta$  (1-42). SA y WA corresponden a reflexiones de ángulo bajo y ancho respectivamente. (Fuente: Elaboración propia)**



Los resultados de los estudios de difracción de rayos X de DMPE incubado con agua y DMPC incubado con soluciones de los péptidos A $\beta$  (1-40) y A $\beta$  (1-42) se muestran en la Fig. 29.

Como se aprecia en la Fig. 29-A, el péptido A $\beta$  (1-40) en el rango de concentraciones de 10-40  $\mu$ M tuvo un muy débil efecto en el ordenamiento de las cabezas polares y cadenas acílicas de DMPE. Con la máxima concentración estudiada para este fosfolípido (40  $\mu$ M) se observó una muy baja disminución de la intensidad de difracción correspondiente a un 6.3 % para las cabezas polares y un 1.5 % para las colas hidrofóbicas (Tabla 7.7). De manera similar, el péptido A $\beta$  (1-42) tuvo un efecto muy débil sobre este fosfolípido el cual puede apreciarse en la Fig. 29-B. En el rango de concentraciones de 5-40  $\mu$ M de A $\beta$  (1-42) se produjo un máximo de reducción de la intensidad de difracción de 3.0 % para la señal SA y 3.3 % para la señal WA (Tabla 7.8).

Junto con estudiar el efecto de las drogas terapéuticas y los híbridos de manera individual, se determinó también el posible efecto protector de H1, H2 y H3 frente al efecto de los péptidos A $\beta$  (1-40) y A $\beta$  (1-42) en multibicapas de DMPC mediante difracción de rayos X. Este efecto se estudió solamente en DMPC debido a que ambos péptidos prácticamente no alteraron la estructura de DMPE. La Fig. 30 muestra la comparación de los efectos protectores (o recuperación de la intensidad de difracción) de los híbridos H1, H2 y H3 en el rango general de concentraciones de 1-50  $\mu$ M (rango diferente para cada híbrido) frente al efecto del péptido A $\beta$  (1-40) 30  $\mu$ M.



**Figura 30: Microdensitogramas de difracción de rayos X de multicapas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) incubadas con agua (H<sub>2</sub>O), péptido A $\beta$  (1-40) 30  $\mu$ M y diferentes concentraciones de híbrido (A) H1; (B) H2 y (C) H3. SA y WA corresponden a reflexiones de ángulo bajo y ancho, respectivamente. (Fuente: Elaboración propia)**

En la Fig. 30-A se aprecia el patrón de difracción normal de DMPC incubado con agua y el patrón de difracción de DMPC incubado con A $\beta$  (1-40) 30  $\mu$ M. En este caso, tal como se observa en la Fig. 28 el péptido A $\beta$  (1-40) produce la desaparición total de la intensidad de difracción de DMPC a 30  $\mu$ M tanto en la zona de las cabezas polares como en la zona de las cadenas acílicas o colas hidrofóbicas. Sin embargo, al incubarlo primero las multicapas de DMPC con diferentes concentraciones de H1 (5, 10, 20 y 50  $\mu$ M) y luego agregar el péptido A $\beta$  (1-40) se observa un proceso de recuperación de la intensidad a medida que se aumenta la concentración de H1. Con una concentración de 20  $\mu$ M de H1, se produce una recuperación del 46.8% de la intensidad en la zona de las cabezas polares y un 57.9 % en las colas hidrofóbicas (Tabla 7.9).

La Fig. 30-B muestra el efecto de H2 en la recuperación de las intensidades de difracción el cual se presenta de manera dependiente de la concentración. Se observa que a medida que se aumenta la concentración de H2, el efecto del péptido sobre la estructura de DMPC es menos potente. Tal como se aprecia en la Tabla 7.10, la presencia de H2 atenúa el efecto de A $\beta$  (1-40) sobre la estructura de DMPC de tal manera que a una concentración 50  $\mu$ M del híbrido se produce un 54.2 % de

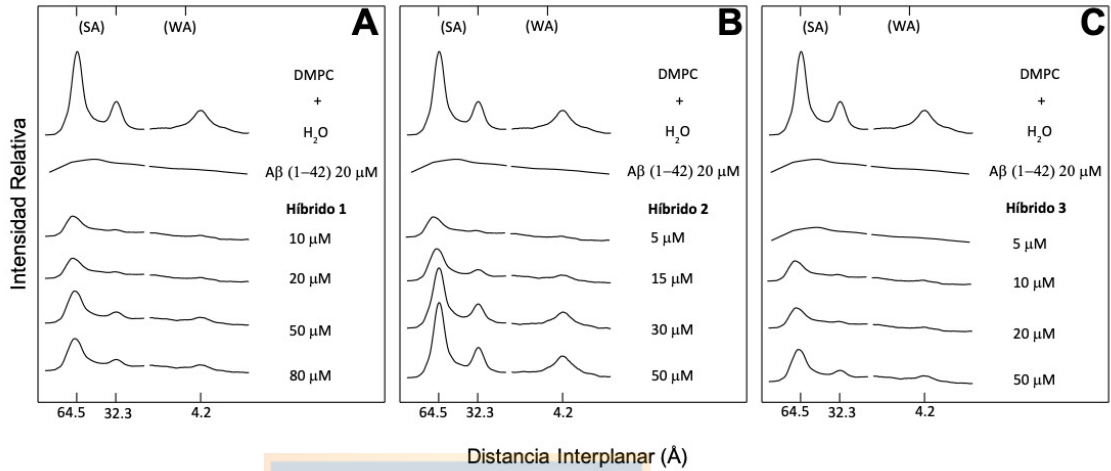
reducción de la intensidad de difracción en la zona de las cabezas polares inducido por el péptido A $\beta$  (1-40), y con 80  $\mu$ M casi se recupera la estructura de bicapa de DMPC.

Por otra parte, el efecto protector de H3 en multibicapas de DMPC frente al péptido A $\beta$  (1-40) se muestran en la Fig. 30-C. En este caso se puede observar que H3 en concentraciones de 20-50  $\mu$ M es capaz de contrarrestar el efecto de A $\beta$  (1-40) sobre la estructura de DMPC recuperando la intensidad de difracción en un 43.7 % en la zona de las cabezas polares (Tabla 7.11). Además, es posible apreciar que este efecto de recuperación de las intensidades de difracción mediadas por la presencia de los híbridos H1, H2 y H3 es más aguda en las cabezas polares del fosfolípido y menos notable en las cadenas acílicas.

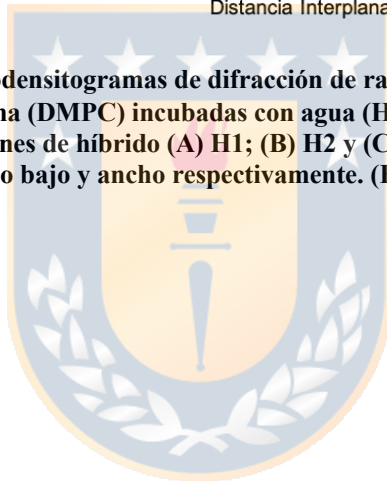
Los estudios del efecto protector de los híbridos H1, H2 y H3 en multibicapas de DMPC frente al péptido A $\beta$  (1-42) 20  $\mu$ M se presentan en la Fig. 31. Tal como se presentó en la Fig. 28, A $\beta$  (1-42) 20  $\mu$ M es capaz de alterar la estructura de DMPC e inducir una fuerte disminución de las intensidades de difracción tanto en la región SA como WA. Cuando DMPC se incubó primero con el híbrido H1 el efecto del péptido A $\beta$  (1-42) 20  $\mu$ M fue considerablemente menor. En la Fig. 31-A se aprecia que H1 en concentraciones de 50-80  $\mu$ M es capaz de neutralizar el efecto perturbador del péptido y existe un efecto de recuperación de la intensidad de difracción a medida que la concentración de H1 se incrementa (Tabla 7.12). En el caso de H2 (Fig. 31-B) esta recuperación es más notoria. H2, en el rango de concentraciones de 5-50  $\mu$ M, ejerce un efecto protector de DMPC frente al efecto del péptido A $\beta$  (1-42) 20  $\mu$ M. Al incubarse las multibicapas de DMPC con una concentración de H2 de 50  $\mu$ M la intensidad de difracción de DMPC prácticamente no se ve alterada por la acción del péptido A $\beta$  (1-42) (Tabla 7.13).

El efecto protector de H3 en DMPC frente a la presencia de A $\beta$  (1-42) se presenta en la Fig. 31-C. Tal como se aprecia en la figura, H3 induce una recuperación de la intensidad de difracción de DMPC a medida que se aumenta la concentración del híbrido. Sin embargo, este efecto es menor que en el caso de H1 y H2. El péptido A $\beta$  (1-42) es capaz de disminuir en un 100% las intensidades de difracción de DMPC en agua. Sin embargo, cuando las multibicapas son pre-incubadas con H1 (en diferentes

soluciones), el efecto del péptido A $\beta$  (1-42) es considerablemente menos pronunciado.



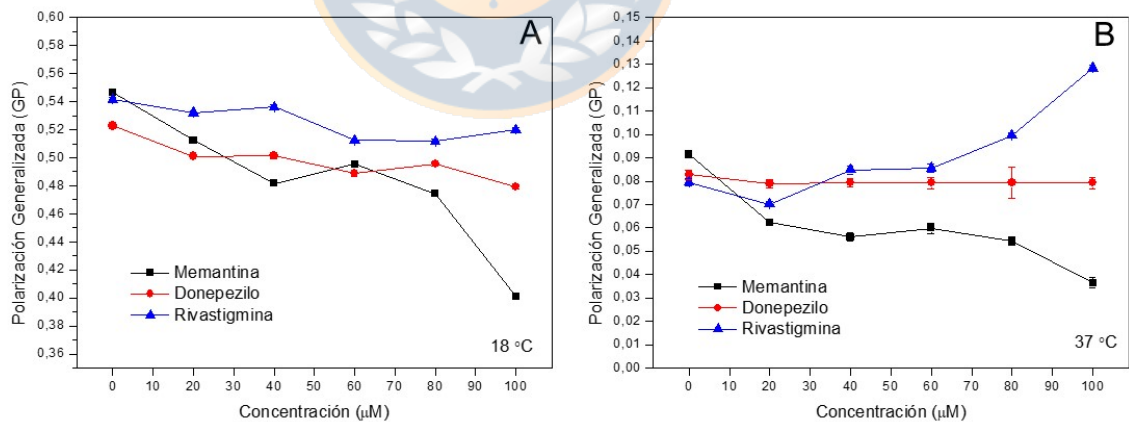
**Figura 31: Microdensitogramas de difracción de rayos X de multicapas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) incubadas con agua (H<sub>2</sub>O), péptido A $\beta$  (1-42) 20 μM y diferentes concentraciones de híbrido (A) H1; (B) H2 y (C) H3. SA y WA corresponden a reflexiones de ángulo bajo y ancho respectivamente. (Fuente: Elaboración propia)**



## 7.2 Espectroscopía de fluorescencia de vesículas unilamelares grandes (LUV) y membranas aisladas de eritrocitos humanos sin sellar (IUM).

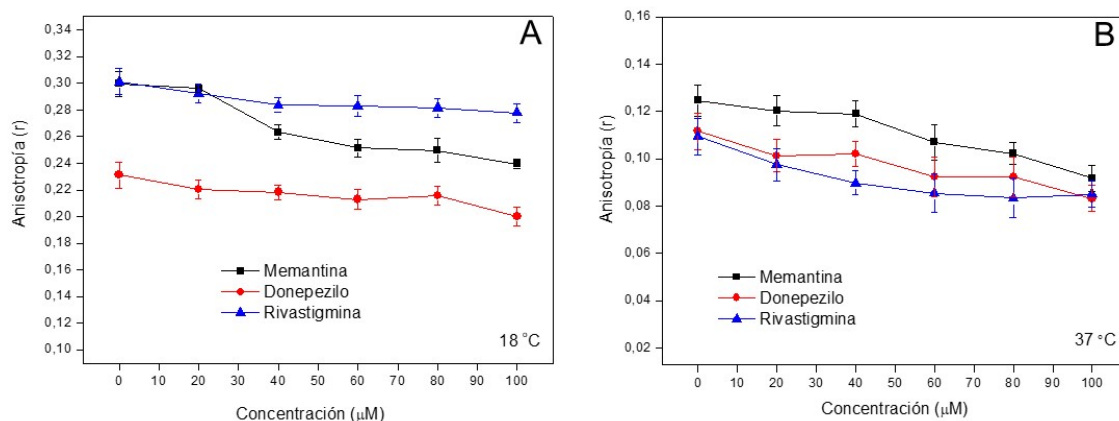
Los efectos de las drogas terapéuticas (memantina, donepezilo y rivastigmina) y péptidos amiloides A $\beta$  (1-40) y A $\beta$  (1-42) sobre vesículas unilamelares grandes (LUV) y membranas aisladas no selladas de eritrocitos humanos (IUM) se estudiaron a dos profundidades diferentes mediante espectroscopía de fluorescencia. En el nivel hidrofílico/hidrofóbico de la membrana se utilizó la sonda laurdan y se estudió su cambio espectral de fluorescencia mediante el parámetro de polarización generalizada (GP). Además, la zona hidrofóbica profunda se estudió determinando los cambios de anisotropía de fluorescencia ( $r$ ) en estado estable de DPH.

Los resultados de los cambios de GP en LUV de DMPC inducidos por las drogas memantina, donepezilo y rivastigmina se muestran en la Fig. 32 y Tabla 7.15. Como se aprecia en la Fig. 32-A, a 18 °C la adición creciente de las tres drogas indujo una disminución de GP la cual fue mayor para memantina, con un  $\Delta$ GP de 0.145 a la mayor concentración. Para donepezilo y rivastigmina estos cambios fueron menores.

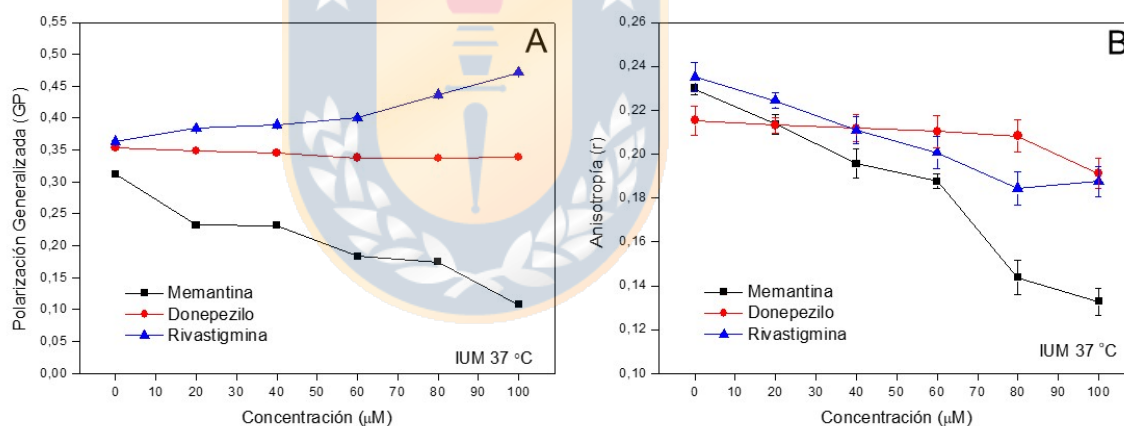


**Figura 32: Efectos de memantina, rivastigmina y donepezilo sobre polarización generalizada (GP) de laurdan incubado en vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC a (A) 18 °C y (B) 37 °C. (Fuente: Elaboración propia)**

A 37 °C (Fig. 32-B, Tabla 7.16) no hubo cambios significativos de GP con la adición creciente de donepezilo, mientras que al aumentar la concentración de rivastigmina los valores de GP incrementaron en función de la concentración.



**Figura 33: Efectos de memantina, rivastigmina y donepezilo sobre anisotropía (r) de DPH incubado en vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC a (A) 18 °C y (B) 37 °C. (Fuente: Elaboración propia)**

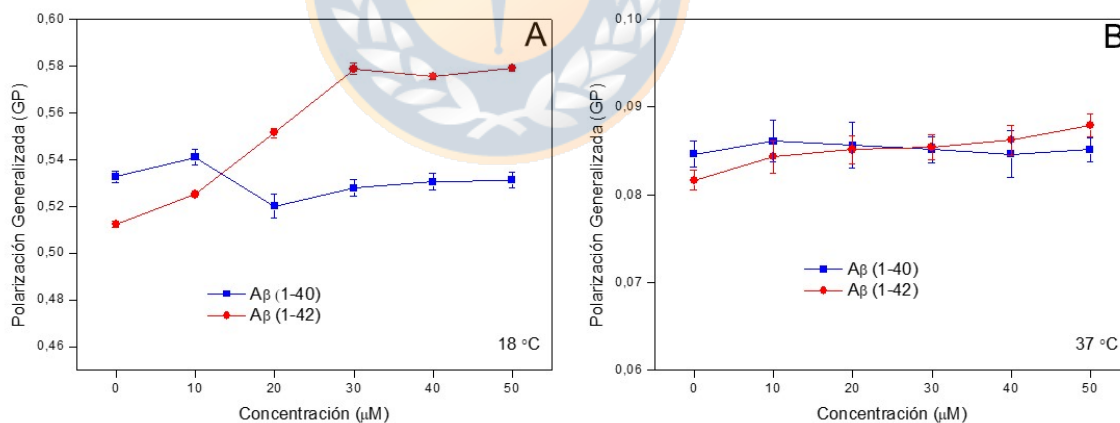


**Figura 34: Efectos de memantina, rivastigmina y donepezilo sobre (A) polarización generalizada (GP) de laurdan y (B) anisotropía (r) de DPH incubados en membranas aisladas de eritrocitos humanos no sellados (IUM) a 37 °C. (Fuente: Elaboración propia)**

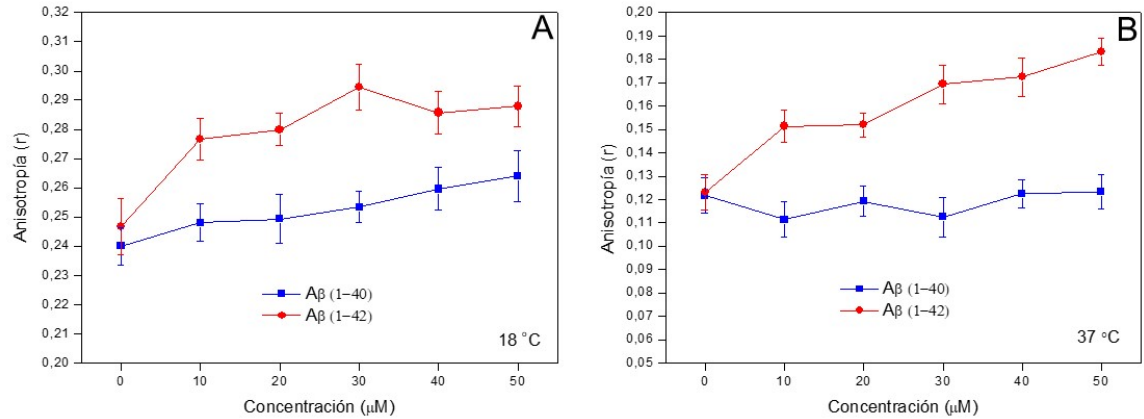
Por otra parte, el cambio de anisotropía (r) de DPH incubado en LUV inducido por las drogas terapéuticas en estudio se presentan en la Fig. 33. Las tres drogas mostraron la misma tendencia a 18 °C (Fig. 33-A, Tabla 7.17): al aumentar la concentración del compuesto los valores de anisotropía disminuyeron levemente a excepción de memantina en el cual el cambio de anisotropía fue más notorio. A 37 °C (Fig. 33-B, Tabla 7.18) los cambios en los valores de anisotropía siguieron una

misma tendencia. En las tres drogas estudiadas la anisotropía descendió a valores más bajos.

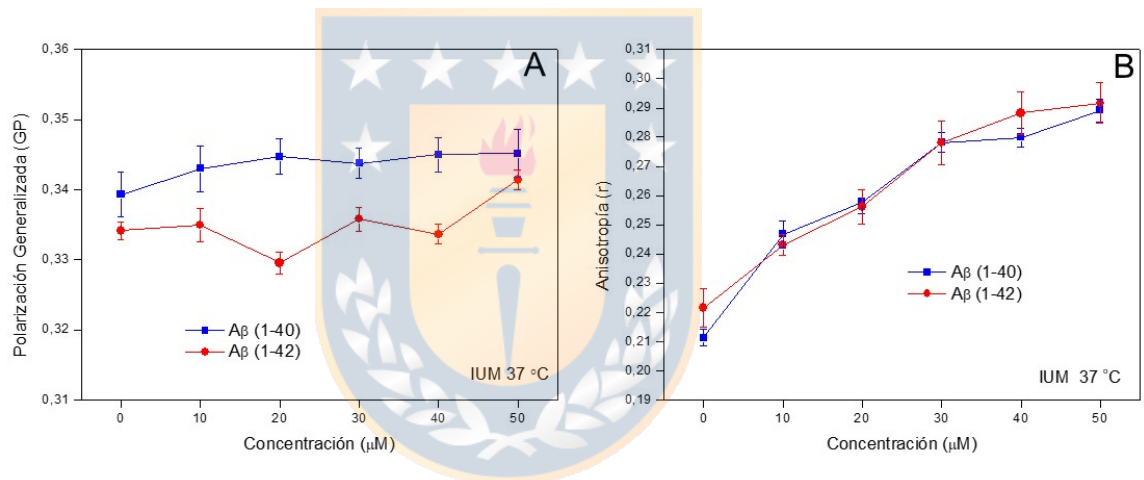
Los efectos de estas drogas sobre las mediciones de GP y anisotropía en IUM pueden observarse en la Fig. 34 y Tabla 7.19. Como se observa en la Fig. 34-A, donepezilo no indujo cambios en los valores de GP. Por su parte, al aumentar la concentración de rivastigmina, los valores de GP aumentaron hacia valores superiores a 0.45. Un efecto distinto tuvo memantina, la cual a concentraciones más bajas que los otros dos compuestos, indujo un cambio mayor llevando GP a valores mucho menores que el control (IUMs sin droga). Los cambios en los valores de anisotropía inducidos por memantina, donepezilo y rivastigmina sobre IUMs a 37 °C se muestran en la Fig. 34-B y Tabla 7.20. En estas condiciones, memantina induce una disminución de la anisotropía dependiente de la concentración que es mayor al resto de las drogas. Al aumentar la concentración de rivastigmina una leve disminución de la anisotropía fue detectada. Los cambios en los valores de anisotropía inducidos por donepezilo, en estas condiciones, fueron despreciables, a excepción de la máxima concentración ensayada (100  $\mu\text{M}$ ) en que se produjo un descenso.



**Figura 35: Efectos de los péptidos A $\beta$ (1-40) y A $\beta$ (1-42) sobre polarización generalizada (GP) de lauridan incubado en vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC a (A) 18 °C y (B) 37 °C. (Fuente: Elaboración propia)**



**Figura 36: Efectos de los péptidos Aβ (1-40) y Aβ (1-42) sobre anisotropía (r) de DPH incubado en vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC a (A) 18 °C y (B) 37 °C. (Fuente: Elaboración propia)**



**Figura 37: Efectos de los péptidos Aβ (1-40) y Aβ (1-42) sobre (A) polarización generalizada (GP) de lauridan y (B) anisotropía (r) de DPH incubados en membranas aisladas de eritrocitos humanos no sellados (IUM) a 37 °C. (Fuente: Elaboración propia)**

La Fig. 35 muestra los efectos en la polarización generalizada (GP) luego de la incorporación de los péptidos Aβ (1-40) y Aβ (1-42) en LUV de DMPC en un rango de concentraciones (0-50 μM) a 18 °C y 37 °C. En la fase de gel (18 °C, Fig. 35-A, Tabla 7.21), solo el péptido Aβ (1-42) indujo un aumento de los valores de GP, mientras que en la fase cristalina líquida (37 °C, Fig. 35-B, Tabla 7.22) ambos péptidos no presentaron alteraciones significativas de este parámetro en el rango de concentraciones estudiado. Por otro lado, las mediciones de anisotropía de

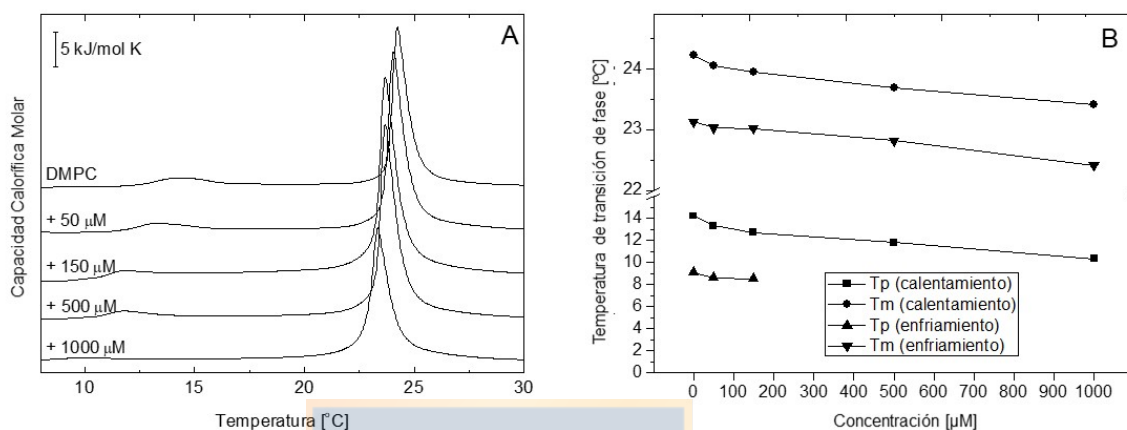


fluorescencia de DPH ( $r$ ) presentadas en la Fig. 36 mostraron que la incorporación de los péptidos a 18 ° C aumentó moderadamente los valores de  $r$  (Fig. 36-A, Tabla 7.23), siendo mayor el cambio con el péptido A $\beta$  (1-42). A 37 ° C, (Fig. 36-B, Tabla 7.24) el péptido A $\beta$  (1-42) mostró un aumento más significativo que en la fase gel (18 °C), mientras que a esta misma temperatura el péptido A $\beta$  (1-40) no indujo cambios importantes en los valores de anisotropía. Es necesario tener en cuenta que a 37 °C DMPC se encuentra en un estado más fluido que a 18 ° C.

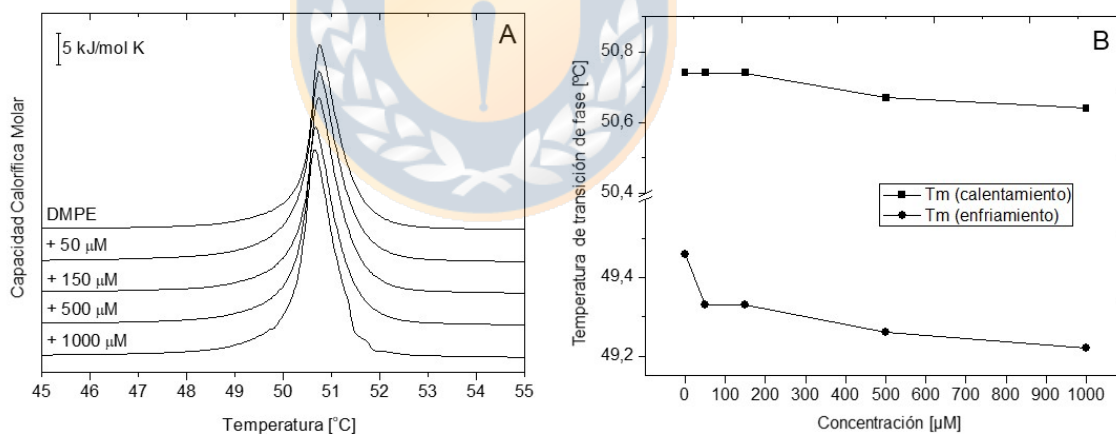
El efecto de los péptidos amiloides sobre los valores de GP en IUM a 37 °C pueden observarse en la Fig. 37-A y Tabla 7.25. En el rango de concentraciones estudiado ambos péptidos aumentaron de manera muy leve los valores de GP a medida que aumentó la concentración. Por el contrario, los valores de anisotropía en IUM (Fig. 37-B, Tabla 7.26) a 37 °C se elevaron considerablemente cuando la concentración de ambos péptidos aumentó, llegando a ser máxima a 50  $\mu$ M.



### 7.3 Análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de vesículas multilamelares (MLV) de DMPC y DMPE.



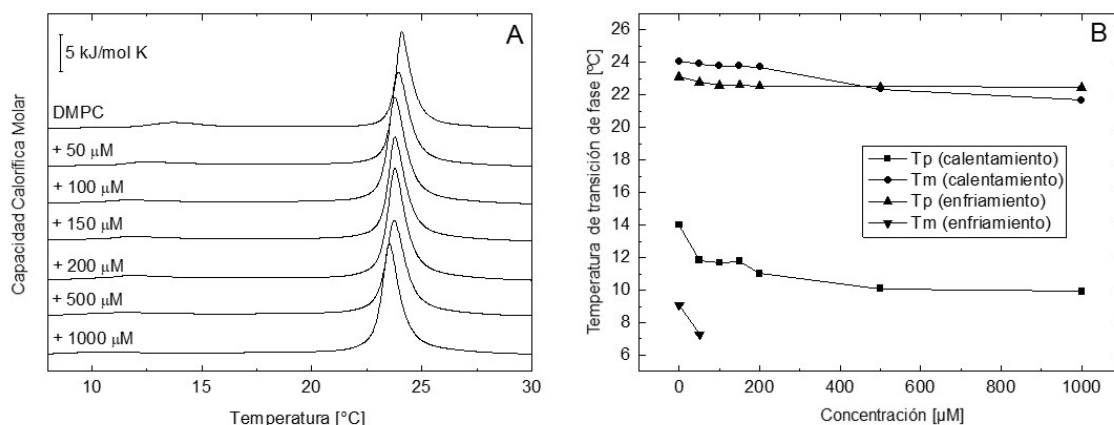
**Figura 38: (A) Termogramas representativos de DSC obtenidos para liposomas multilamelares de DMPC que contienen diferentes concentraciones de memantina. Los barridos se realizaron a una velocidad de calentamiento de  $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ; (B) Gráfico de las temperaturas de transición de fase de liposomas multilamelares de DMPC determinadas para los barridos de enfriamiento y calentamiento en función de la concentración de memantina. (Fuente: Elaboración propia)**



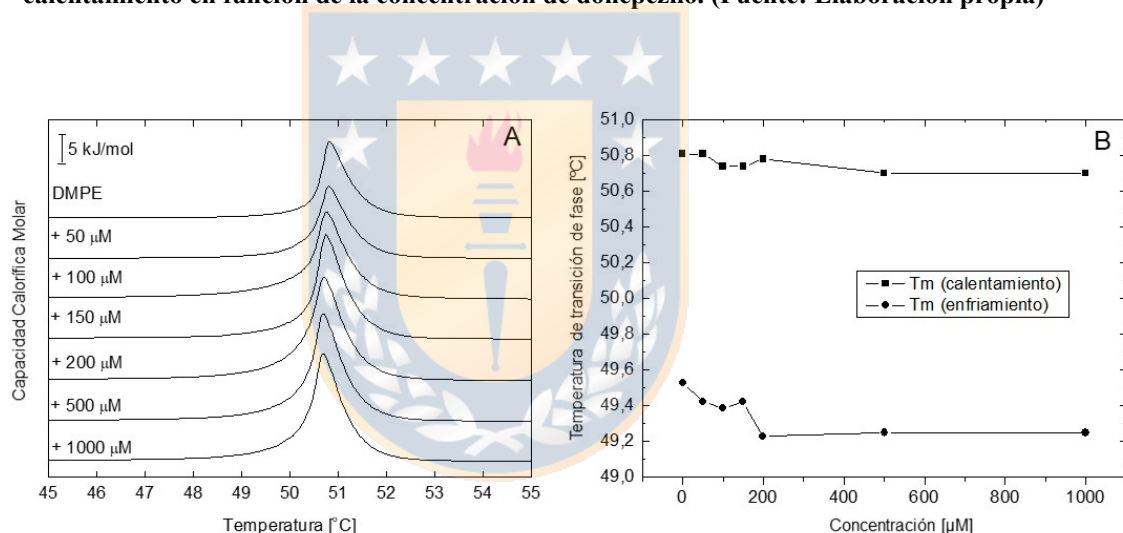
**Figura 39: (A) Termogramas representativos de DSC obtenidos para liposomas multilamelares de DMPE que contienen diferentes concentraciones de memantina. Los barridos se realizaron a una velocidad de calentamiento de  $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ; (B) Gráfico de las temperaturas de transición de fase de los liposomas multilamelares de DMPE determinadas para barridos de enfriamiento y calentamiento en función de la concentración de memantina. (Fuente: Elaboración propia)**

Los resultados de los experimentos de DSC realizados en vesículas multilamelares (MLV) de DMPC incubadas con memantina se muestran en la Fig. 38-A y Tabla

7.28. Cuando están completamente hidratados, las MLV muestran una característica termotrópica conocida y bien definida. En el rango de temperatura de 5 °C a 30 °C, los liposomas de DMPC mostraron un peak fuerte y agudo de transición principal a 24.23 °C (Tabla 7.28), con un cambio de entalpía ( $\Delta H$ ) de 18.46 kJ mol<sup>-1</sup> correspondiente a la conversión de la fase de gel ondulado ( $P_{\beta}$ ) a la fase de cristal líquido lamelar ( $L_{\alpha}$ ). Además de este peak de transición principal, también apareció un pequeño peak a 14.22 °C con un  $\Delta H$  de 2.36 kJ mol<sup>-1</sup> correspondiente a la transformación de  $L_{\beta} \rightarrow P_{\beta}$ , llamada pretransición. Estos resultados son consistentes con informes anteriores en la literatura<sup>109</sup>. La presencia de memantina indujo una perturbación del comportamiento termotrópico de las vesículas de DMPC. Se puede observar que la transición de la fase principal se desplazó en 0,82 °C, mientras que la pretransición tuvo un cambio marcado de 3,87 °C para una concentración 1 mM, ambas siguiendo una tendencia que fue dependiente de la concentración (Fig. 38-B). A medida que se aumentó el contenido de memantina, el peak de pretransición disminuyó e incluso desapareció por completo al enfriarse. La Fig. 39 y Tabla 7.28 muestra los resultados de los experimentos de DSC para vesículas de DMPE en presencia de memantina. En el rango de temperatura de 30 °C a 70 °C, los liposomas de DMPE mostraron un peak de transición único, fuerte y agudo a 50.74 °C (Tabla 7.28) con un  $\Delta H$  de 21.60 kJ mol<sup>-1</sup> de la conversión de la fase gel a la fase de cristal líquido. Estos parámetros calorimétricos son consistentes con los encontrados en investigaciones anteriores<sup>118</sup>. Cuando se agregó memantina, el comportamiento termotrópico de DMPE solo se vio ligeramente afectado y se observó un cambio descendente de la temperatura de transición que no excedió los 0.1 °C para la mayor concentración de fármaco estudiada. Para todos los datos de DSC proporcionados, la temperatura de transición corresponde al valor máximo del peak y la entalpía de transición corresponde al área integrada bajo la curva dividida por la concentración de fosfolípido. Los conjuntos de datos completos de los parámetros termodinámicos asociados a memantina, incluidos los valores de temperatura, entropía y entalpía, se muestran en las Tablas 7.28 y 7.29 para DMPC y DMPE, respectivamente.



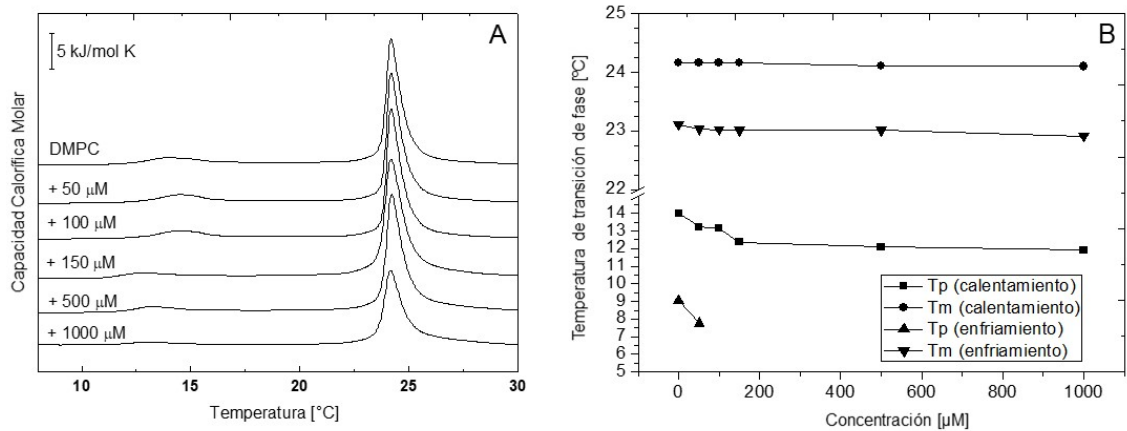
**Figura 40: (A) Termogramas representativos de DSC obtenidos para liposomas multilamelares de DMPC que contienen diferentes concentraciones de donepezilo. Los barridos se realizaron a una velocidad de calentamiento de  $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ; (B) Gráfico de las temperaturas de transición de fase de liposomas multilamelares de DMPC determinadas para los barridos de enfriamiento y calentamiento en función de la concentración de donepezilo. (Fuente: Elaboración propia)**



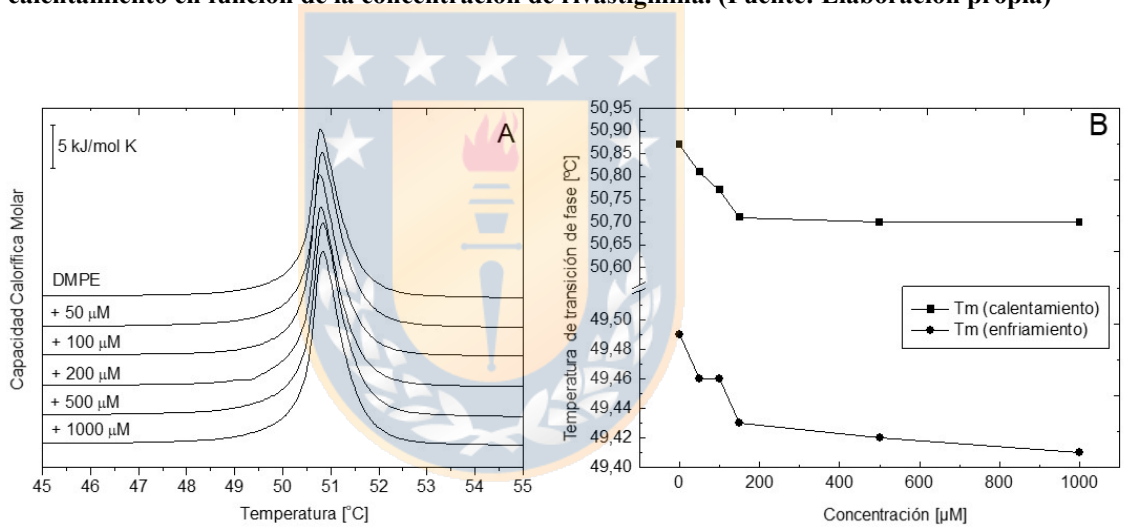
**Figura 41: (A) Termogramas representativos de DSC obtenidos para liposomas multilamelares de DMPE que contienen diferentes concentraciones de donepezilo. Los barridos se realizaron a una velocidad de calentamiento de  $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ; (B) Gráfico de las temperaturas de transición de fase de los liposomas multilamelares de DMPE determinadas para barridos de enfriamiento y calentamiento en función de la concentración de donepezilo. (Fuente: Elaboración propia)**

Los resultados de los experimentos de DSC obtenidos para MLV de DMPC expuestos a donepezilo en diferentes concentraciones se exponen en la Fig. 40 y Tabla 7.30. El análisis termotrópico del blanco (DMPC + agua) presenta un comportamiento acorde a la literatura<sup>119</sup>. Los MLV de DMPC fueron sometidos a un escaneo desde  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  y exhibieron un peak fuerte y agudo de transición primaria a  $24.08\text{ }^{\circ}\text{C}$ , con un  $\Delta H$  de  $18.03\text{ kJ mol}^{-1}$  correspondiente a la conversión de

la fase de gel ondulado ( $P_{\beta'}$ ) a la fase laminar de cristal líquido,  $L_{\alpha}$  (Fig. 40-A; Tabla 7.30). Adicionalmente, también apareció un pequeño peak (pretransición) a una temperatura de 14.01 °C con un  $\Delta H$  de 2.63 kJ mol<sup>-1</sup> el cual corresponde a la transformación  $L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta}$ . Después de agregar donepezilo, se observó una alteración del comportamiento termotrópico de DMPC. Para una concentración de donepezilo de 1 mM, la temperatura de la transición de fase principal disminuyó en 2.4 °C respecto al blanco, mientras que el peak de pretransición desapareció por completo. Esta variación de la temperatura como una función de concentración se grafica en la Fig. 40-B. Por otro lado, la Fig. 41 expone los resultados de los experimentos de DSC para MLV de DMPE. Tal como se explica detalladamente en otras fuentes bibliográficas<sup>118</sup>, DMPE en un estado muy hidratado presenta un pico de transición único, fuerte y agudo a 50,81 °C (Fig. 41-A) con una entalpía de transición de 21,63 kJ mol<sup>-1</sup> (Tabla 7.30) la cual corresponde a la conversión de fase gel a fase cristal líquido. El comportamiento termotrópico de DMPE se vio afectado suavemente y se observó un cambio en la temperatura de transición de fase de 0,11 °C para la concentración de donepezilo más alta (1 mM) (Fig. 41-B). Los datos de los parámetros termodinámicos obtenidos para los experimentos de DSC asociados a donepezilo, incluidos los valores de temperatura, entropía y entalpía se muestran en las tablas 7.29 y 7.30 para DMPC y DMPE, respectivamente.



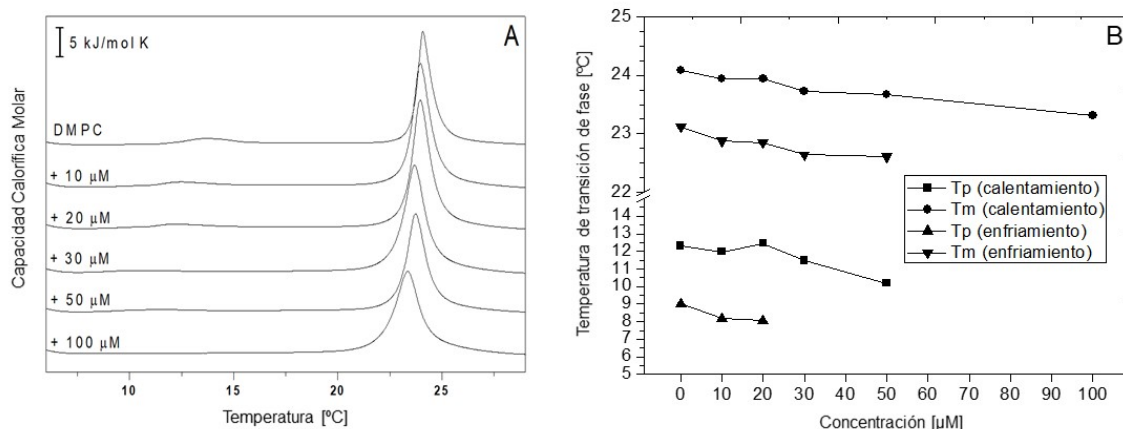
**Figura 42: (A) Termogramas representativos de DSC obtenidos para liposomas multilamelares de DMPC que contienen diferentes concentraciones de rivastigmina. Los barridos se realizaron a una velocidad de calentamiento de  $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ; (B) Gráfico de las temperaturas de transición de fase de liposomas multilamelares de DMPC determinadas para los barridos de enfriamiento y calentamiento en función de la concentración de rivastigmina. (Fuente: Elaboración propia)**



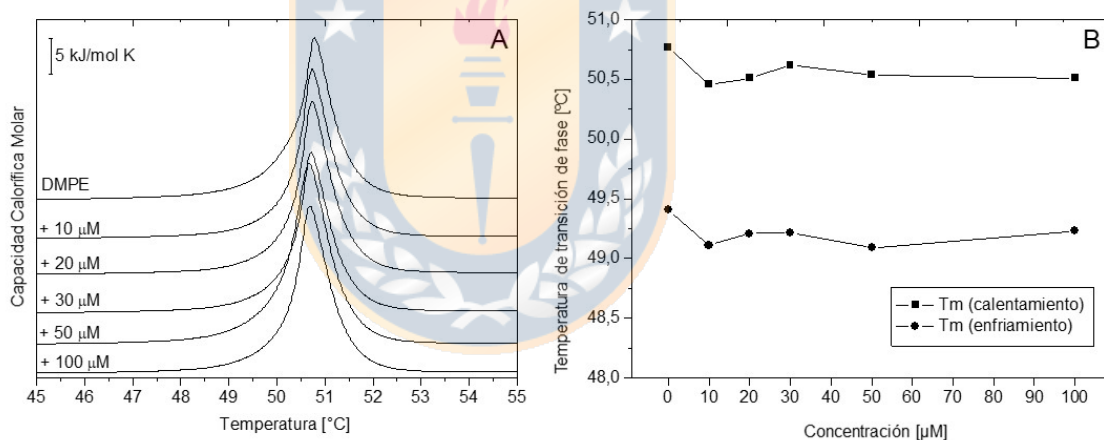
**Figura 43: (A) Termogramas representativos de DSC obtenidos para liposomas multilamelares de DMPE que contienen diferentes concentraciones de rivastigmina. Los barridos se realizaron a una velocidad de calentamiento de  $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ; (B) Gráfico de las temperaturas de transición de fase de los liposomas multilamelares de DMPE determinadas para barridos de enfriamiento y calentamiento en función de la concentración de rivastigmina. (Fuente: Elaboración propia)**

El comportamiento termotrópico de vesículas multilamelares de DMPC se estudió mediante DSC en ausencia y tras la incorporación de cantidades crecientes de rivastigmina, en el rango de concentración de 0,05–1 mM (Fig. 42). Las MLV de DMPC puro mostraron la conversión de una fase de gel laminar ( $L_{\beta'}$ ) en una fase de gel ondulada ( $P_{\beta'}$ ), correspondiente a la pretransición y centrada en  $14,09\text{ }^{\circ}\text{C}$ , y la

conversión de la fase  $P_{\beta}$  en cristal líquido lamelar ( $L_{\alpha}$ ) a 24,16 °C conocida como transición principal. La pretransición estuvo acompañada por una pequeña entalpía de transición de 2,68 kJ mol<sup>-1</sup>, mientras que la entalpía de la transición principal fue de 18,03 kJ mol<sup>-1</sup> (Tabla 7.31). Las temperaturas de transición correspondieron al peak de transición en su máximo valor y las entalpías de transición al área integrada bajo el peak dividido por la concentración de lípidos. Como se aprecia en la Fig. 42-A, rivastigmina no fue capaz de reducir la cooperatividad de la transición de la fase principal de DMPC, que se mantuvo marcada incluso a una concentración de 1 mM de la droga. Además, su temperatura no se redujo significativamente y sólo se desplazó en 0,06 °C a la máxima concentración de rivastigmina (Fig. 42-B, Tabla 7.31). Sin embargo, la fase de pretransición de DMPC se vio fuertemente afectada por la presencia de rivastigmina de manera dependiente de la concentración, provocando un desplazamiento de la temperatura de pretransición en 2,1 °C. En la Fig. 43-A se ilustran los termogramas de calentamiento de liposomas de DMPE con agua y en presencia de concentraciones crecientes de rivastigmina. En el rango térmico de 30–70 °C, las bicapas de DMPE puro mostraron una transición principal fuerte y aguda a 50,87 °C, con un  $\Delta H$  de 20,91 kJ mol<sup>-1</sup>, derivado de la conversión de la fase gel en la fase cristal líquido. Al añadir rivastigmina a las vesículas de DMPE, solo se observó un ligero efecto sobre el comportamiento de la fase termotrópica tanto en el calentamiento como en el enfriamiento. El cambio en la temperatura de la transición de fase de DMPE no fue muy pronunciado, y para la concentración más alta de rivastigmina apenas alcanzó un 0,08 °C en el calentamiento y 0,17 °C en el enfriamiento (Fig. 43-B, Tabla 7.32). Los valores de temperatura, entalpía y entropía para los barridos de calentamiento y enfriamiento de DMPC y DMPE se presentan en las Tablas 7.31 y 7.32, respectivamente.



**Figura 44: (A) Termogramas representativos de DSC obtenidos para liposomas multilamelares de DMPC que contienen diferentes concentraciones de Híbrido 1 (H1). Los barridos se realizaron a una velocidad de calentamiento de  $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ; (B) Gráfico de las temperaturas de transición de fase de liposomas multilamelares de DMPC determinadas para los barridos de enfriamiento y calentamiento en función de la concentración de Híbrido 1 (H1). (Fuente: Elaboración propia)**



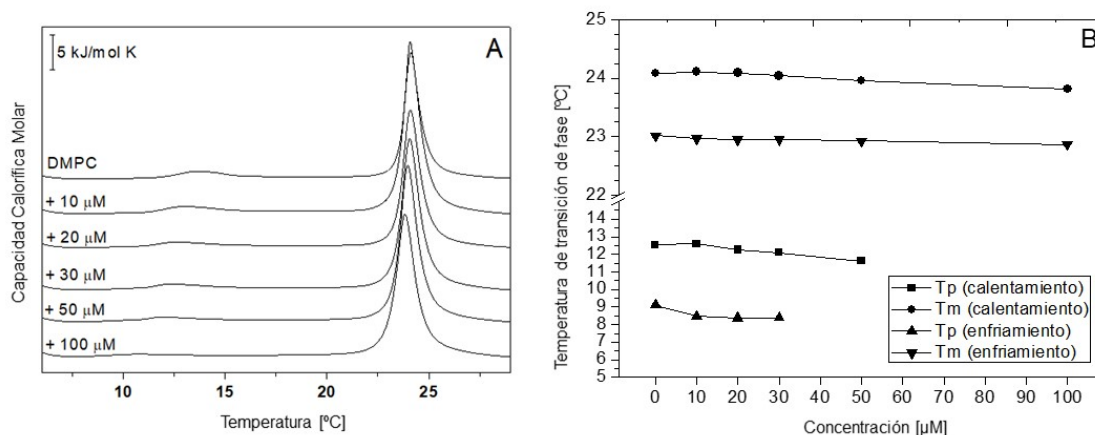
**Figura 45: (A) Termogramas representativos de DSC obtenidos para liposomas multilamelares de DMPE que contienen diferentes concentraciones de Híbrido 1 (H1). Los barridos se realizaron a una velocidad de calentamiento de  $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ; (B) Gráfico de las temperaturas de transición de fase de los liposomas multilamelares de DMPE determinadas para barridos de enfriamiento y calentamiento en función de la concentración de Híbrido 1 (H1). (Fuente: Elaboración propia)**

En los experimentos de DSC para el híbrido 1 (H1), las bicapas de DMPC y DMPE completamente hidratadas en ausencia de agentes externos mostraron un comportamiento térmico bien definido y conocido. En el rango de temperatura de 0-30  $^{\circ}\text{C}$ , los liposomas DMPC mostraron la típica transición principal fuerte y aguda a

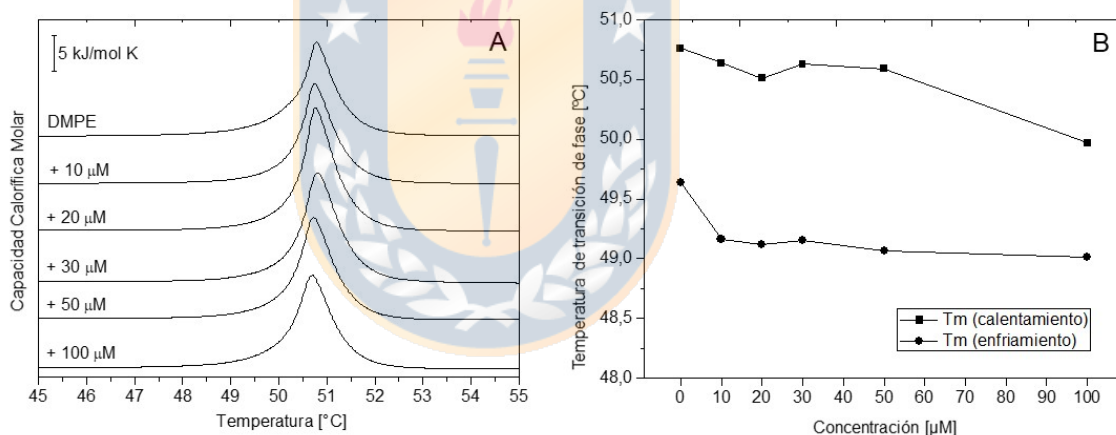


24,08 °C, con un  $\Delta H$  de 19,93 kJ mol<sup>-1</sup> que surge de la conversión de la fase de gel ondulado ( $P_{\beta}$ ) a la fase de cristal líquido ( $L_{\alpha}$ ) lamelar (Fig. 44, Tabla 7.33). A 12,31 °C, se observó una pretransición derivada de la conversión de una fase de gel laminar ( $L_{\beta}$ ) a una fase de gel ondulado, con  $\Delta H$  de 1,98 kJ mol<sup>-1</sup> (Tabla 7.33). En la Fig. 44-A, se muestra un conjunto de termogramas representativos de calentamiento que se obtuvieron para MLV de DMPC puras y mezclas de DMPC e híbrido 1 (H1) en una concentración de 10 a 100  $\mu$ M. Tras la adición de H1, el comportamiento de la fase termotrópica de DMPC cambió levemente. Solamente a una concentración alta del compuesto (100  $\mu$ M) se observó una disminución gradual del peak de transición de la fase principal y un pequeño cambio a temperaturas más bajas (Fig. 44-B). Además, H1 afectó la pretransición de la bicapa DMPC; la cual desapareció completamente a 100  $\mu$ M.

Los liposomas de DMPE puro mostraron una transición aguda única a 50,77 °C con un cambio de entalpía de 20,73 kJ mol<sup>-1</sup> en el rango térmico de 30–70 °C (Fig. 45-A, Tabla 7.34). Esta transición, designada como transformación de la fase de gel ( $L_{\beta}$ ) a la fase  $L_{\alpha}$ , fue altamente reproducible, fuerte y aguda, con un perfil casi simétrico. Representados en la Fig. 45-A, los perfiles de calentamiento registrados para las bicapas de DMPE mostraron una capacidad considerablemente menor de H1 para distorsionar la transición de fase de las moléculas de DMPE. En la Fig. 45-B, los valores de las temperaturas de transición principal y pretransición se representan en función de la concentración de H1. Como característica general, tanto en los procesos de calentamiento como de enfriamiento en presencia de H1, no se observaron cambios significativos en el comportamiento termotrópico de MLV de DMPE. Los conjuntos de datos completos de los parámetros termodinámicos, incluidos los valores de temperatura, entropía y entalpía para esta serie de experimentos, se muestran en la Tabla 7.33 y Tabla 7.34 para DMPC y DMPE, respectivamente.



**Figura 46: (A) Termogramas representativos de DSC obtenidos para liposomas multilamelares de DMPC que contienen diferentes concentraciones de Híbrido 2 (H2). Los barridos se realizaron a una velocidad de calentamiento de  $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ; (B) Gráfico de las temperaturas de transición de fase de liposomas multilamelares de DMPC determinadas para los barridos de enfriamiento y calentamiento en función de la concentración de Híbrido 2 (H2). (Fuente: Elaboración propia)**

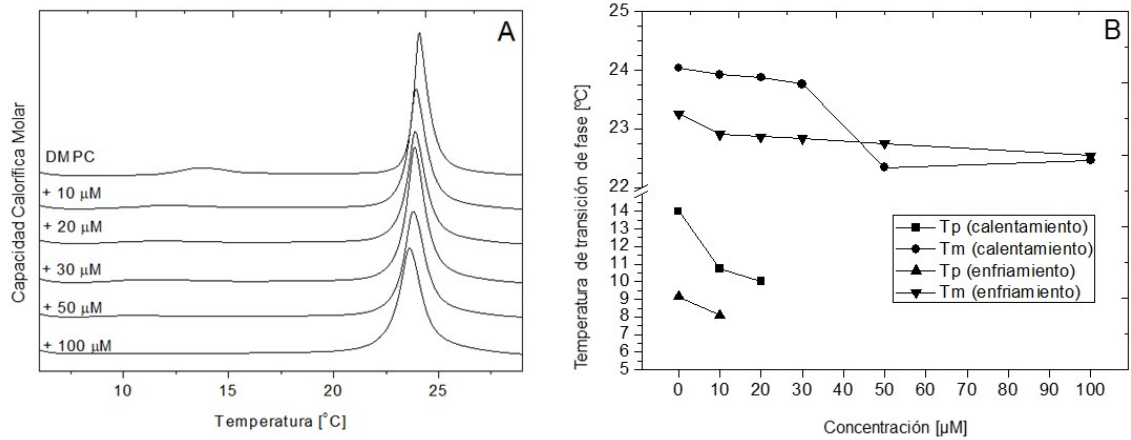


**Figura 47: (A) Termogramas representativos de DSC obtenidos para liposomas multilamelares de DMPE que contienen diferentes concentraciones de Híbrido 2 (H2). Los barridos se realizaron a una velocidad de calentamiento de  $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ; (B) Gráfico de las temperaturas de transición de fase de los liposomas multilamelares de DMPE determinadas para barridos de enfriamiento y calentamiento en función de la concentración de Híbrido 2 (H2). (Fuente: Elaboración propia)**

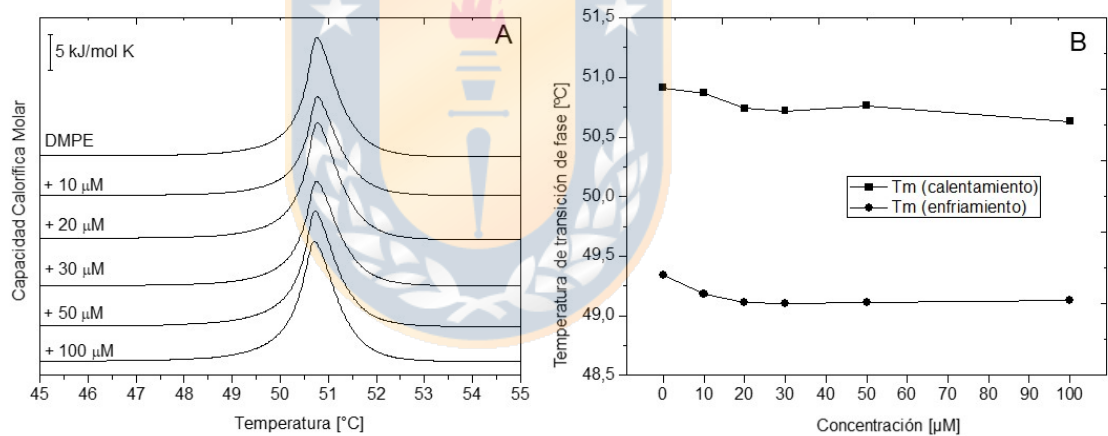
En la Fig. 46-A se muestran los termogramas de calentamiento obtenidos mediante DSC para vesículas de multilamelares de DMPC puras y mezclas de DMPC e Híbrido 2 (H2) en un rango de concentraciones de 10 a 100 μM. En el rango térmico de 0–30 °C, las bicapas DMPC totalmente hidratadas experimentaron una transición

principal fuerte y marcada a 24,08 °C, con un  $\Delta H$  de 13,06 kJ mol<sup>-1</sup>, que corresponde a la conversión de la fase de gel ondulado ( $P_{\beta'}$ ) a la fase líquido-cristalino lamelar ( $L_{\alpha}$ ). Por otro lado, a 12,54 °C con un  $\Delta H$  de 1,97 kJ mol<sup>-1</sup>, tuvo lugar la transición más pequeña ( $L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$ ), llamada pretransición (Tabla 7.35). Como puede apreciarse, la presencia de H2 indujo una perturbación bastante leve del comportamiento termotrópico de las vesículas de DMPC. Tanto la temperatura de pretransición como la temperatura de transición principal no tuvieron alteraciones importantes con un máximo de diferencia de 0,26 °C y 0,93 °C respectivamente. (Fig. 46-B, Tabla 7.35). Con respecto a la fase de pretransición con H2 100  $\mu$ M, no se observó en las curvas de calentamiento y se perdió completamente durante el enfriamiento.

La Fig. 47-A muestra termogramas de DSC representativos para MLV de DMPE y DMPE que contienen H2. En el rango térmico de 30–70 °C, las bicapas de DMPE puro mostraron la típica transición principal fuerte y aguda a 50,76 °C, con un cambio de entalpía de 20,12 kJ mol<sup>-1</sup>, derivado de la conversión de la fase gel a fase cristal líquido. Al añadir H2 a las vesículas de DMPE, se observó un suave y ligero efecto sobre el comportamiento de la fase termotrópica tanto al calentamiento (Fig. 47-B) como al enfriamiento (no mostrado). La efectividad en las perturbaciones de la transición de fase termotrópica de DMPE ejercida por H2 se analizó adicionalmente en términos de parámetros termodinámicos. Para estos datos, la temperatura de transición corresponde al valor máximo del peak y la entalpía de transición corresponde al área integrada bajo la curva dividida por la concentración de fosfolípido. Las tablas 7.35 y 7.36 muestran los valores de temperatura, entalpía y entropía para los sistemas DMPC y DMPE, respectivamente, determinados sobre la base de los barridos de calentamiento y enfriamiento.



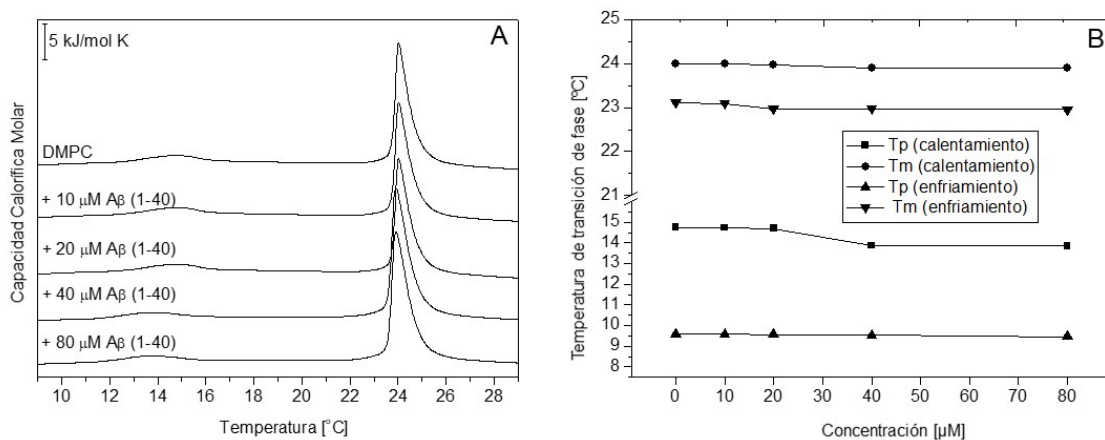
**Figura 48: (A) Termogramas representativos de DSC obtenidos para liposomas multilamelares de DMPC que contienen diferentes concentraciones de Híbrido 3 (H3). Los barridos se realizaron a una velocidad de calentamiento de  $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ; (B) Gráfico de las temperaturas de transición de fase de liposomas multilamelares de DMPC determinadas para los barridos de enfriamiento y calentamiento en función de la concentración de Híbrido 3 (H3). (Fuente: Elaboración propia)**



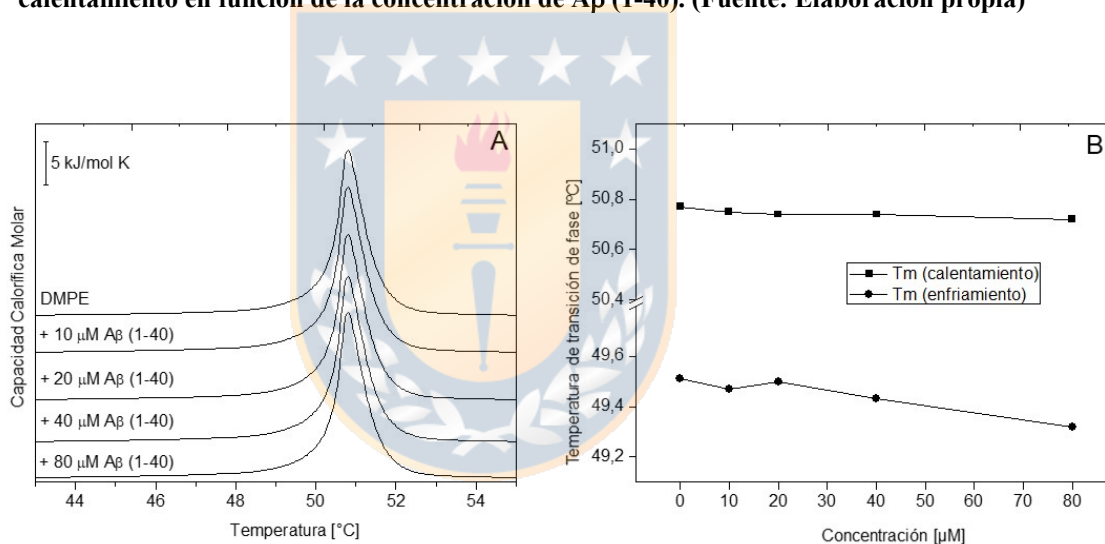
**Figura 49: (A) Termogramas representativos de DSC obtenidos para liposomas multilamelares de DMPE que contienen diferentes concentraciones de Híbrido 3 (H3). Los barridos se realizaron a una velocidad de calentamiento de  $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ; (B) Gráfico de las temperaturas de transición de fase de los liposomas multilamelares de DMPE determinadas para barridos de enfriamiento y calentamiento en función de la concentración de Híbrido 3 (H3). (Fuente: Elaboración propia)**

La Fig. 48-A presenta los termogramas de DSC de calentamiento obtenidos para vesículas multilamelares (MLV) de DMPC que contienen diferentes concentraciones de Híbrido 3 (H3). El primer perfil de calentamiento corresponde a los valores de los parámetros térmicos obtenidos para las MLV completamente hidratadas en ausencia

de moléculas externas, donde la temperatura de pretransición ( $T_p = 14.01\text{ }^\circ\text{C}$ ) y la temperatura de transición de fase principal ( $T_m = 24.03\text{ }^\circ\text{C}$ ) están en concordancia con datos publicados anteriormente<sup>118</sup>. La transición principal altamente cooperativa ( $P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$ ) con un  $\Delta H$  de  $19.03\text{ kJ mol}^{-1}$  corresponde a la transición de gel a líquido-cristal, mientras que la más pequeña ( $L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$ ) con un  $\Delta H$  de  $2.17\text{ kJ mol}^{-1}$  corresponde a la pretransición. El análisis de la variación de los valores de  $T_m$  con cantidades crecientes de H3 en las MLV de DMPC se muestra en la Fig. 48-B y Tabla 7.37. Claramente se aprecia que H3 tiene un efecto perturbador sobre la fluidez del modelo de membrana utilizado. Concentraciones crecientes de H3 inducen un desplazamiento de la  $T_m$  y  $T_p$  a valores de temperatura menores. Por otra parte, los valores de entalpía asociados a la transición principal también decrecen en un proceso concentración-dependiente. La diferencia entre la entalpía para DMPC puro y DMPC con la máxima concentración de H3 fue de  $10.04\text{ kJ mol}^{-1}$ . Por otra parte, la Fig. 49-A muestra el conjunto de termogramas de calentamiento obtenidos para MLV de DMPE. En el rango térmico de  $30\text{--}70\text{ }^\circ\text{C}$ , las bicapas de DMPE puro exhiben una transición principal fuerte y aguda a  $50.91\text{ }^\circ\text{C}$ , con un cambio de entalpía de  $20.14\text{ kJ mol}^{-1}$ , correspondiente de la conversión de la fase gel a la fase cristal-líquido del fosfolípido. Como se aprecia en los termogramas y en el gráfico de temperaturas de transición de fase (Fig. 49-B), H3 no alteró significativamente los valores de  $T_m$  incluso a concentraciones más altas. Además, no se observaron cambios pronunciados de  $\Delta H$  a altas concentraciones del híbrido. Las Tablas 7.37 y 7.38 presentan los valores de temperatura, entalpía y entropía para los sistemas estudiados en presencia de H3, determinados en base a los barridos de calentamiento y enfriamiento.



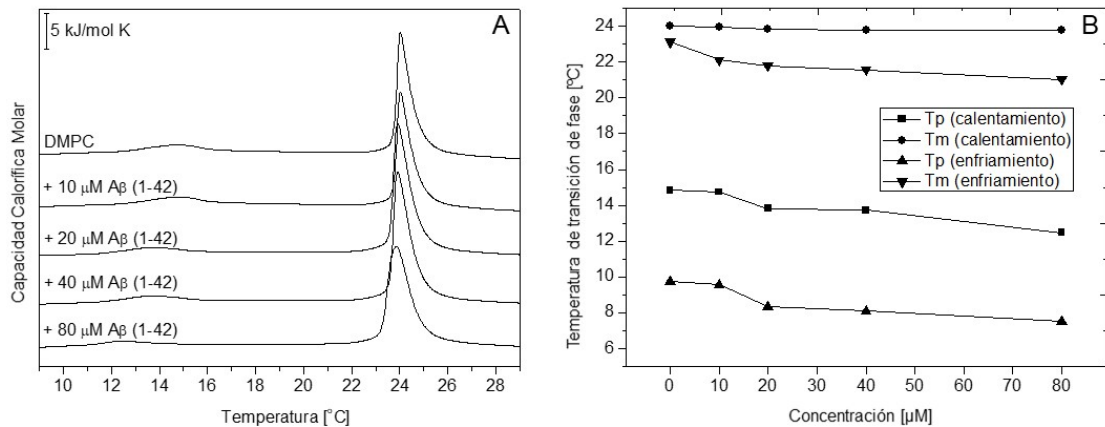
**Figura 50: (A) Termogramas representativos de DSC obtenidos para liposomas multilamelares de DMPC que contienen diferentes concentraciones de Aβ (1-40). Los barridos se realizaron a una velocidad de calentamiento de 1 °C min<sup>-1</sup>; (B) Gráfico de las temperaturas de transición de fase de liposomas multilamelares de DMPC determinadas para los barridos de enfriamiento y calentamiento en función de la concentración de Aβ (1-40). (Fuente: Elaboración propia)**



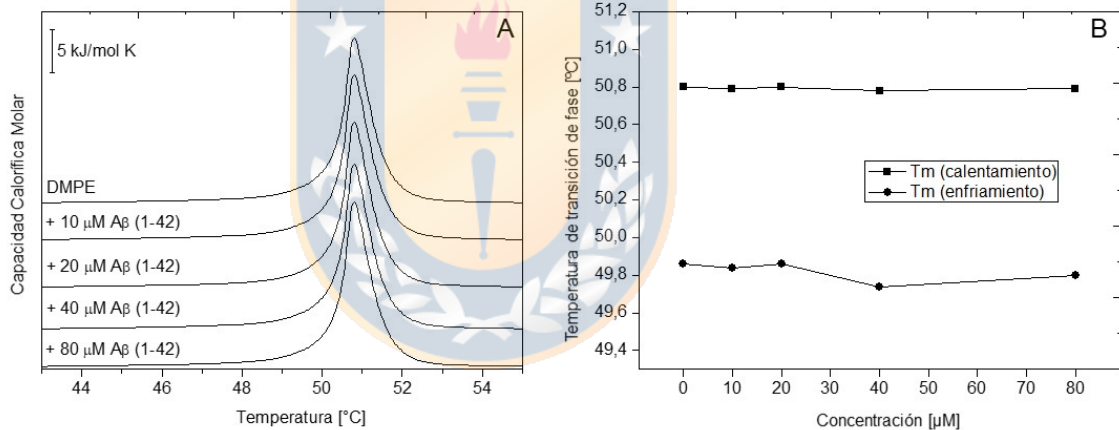
**Figura 51: (A) Termogramas representativos de DSC obtenidos para liposomas multilamelares de DMPE que contienen diferentes concentraciones de Aβ (1-40). Los barridos se realizaron a una velocidad de calentamiento de 1 °C min<sup>-1</sup>; (B) Gráfico de las temperaturas de transición de fase de los liposomas multilamelares de DMPE determinadas para barridos de enfriamiento y calentamiento en función de la concentración de Aβ (1-40). (Fuente: Elaboración propia)**

La Fig. 50-A muestra los termogramas de DSC de calentamiento de vesículas de múltiples capas (MLV) de DMPC y mezclas de DMPC y péptido Aβ (1-40) en el rango de concentraciones de 10-80 μM. Como en el resto de los experimentos, para las vesículas de DMPC totalmente hidratadas, se observó una transición principal fuerte y aguda a 24,00 °C con un cambio de entalpía de 19.03 kJ mol<sup>-1</sup>, correspondiente a la conversión de la fase de gel ondulado (Pβ') a la fase de cristal

líquido laminar ( $L\alpha$ ). La transición de fase más pequeña ( $L\beta' \rightarrow P\beta'$ ), denominada pretransición, tuvo lugar a 14,74 °C con un  $\Delta H$  de 2.32 kJ mol<sup>-1</sup>. En MLV de DMPC, el péptido A $\beta$  (1-40) indujo una perturbación bastante suave, y un desplazamiento hacia abajo de la  $T_m$  que no fue más de 0,11 °C para la concentración más alta estudiada (Fig. 50-B, Tabla 7.39). Además, la pretransición experimentó un cambio dependiente de la concentración ( $\Delta T_{max} = 0.88$ ) a una concentración de 80  $\mu$ M del péptido. Por otro lado, la Fig. 51-A presenta los termogramas obtenidos del proceso de calentamiento de MLV de DMPE, puro y en presencia de péptido A $\beta$  (1-40). Se observó una transición típica de este fosfolípido a 50,77 °C, con un cambio de entalpía de 20,01 kJ mol<sup>-1</sup>, como resultado de la conversión de la fase gel a la fase cristal-líquido de DMPE. La adición del péptido A $\beta$  (1-40) a las vesículas de DMPE prácticamente no tuvo ningún efecto sobre el comportamiento de la fase termotrópica después del calentamiento (Fig. 51-B). Incluso después del recalentamiento posterior, los patrones de los perfiles calorimétricos todavía se mantienen. Estos hallazgos indican que la presencia del péptido A $\beta$  (1-40) no origina desestabilización de la fase de gel de las bicapas de DMPE. Al igual que en los otros experimentos de DSC, para todos los datos proporcionados, la temperatura de transición corresponde al valor máximo del peak y la entalpía de transición corresponde al área integrada bajo la curva dividida por la concentración de fosfolípido. Los parámetros termodinámicos determinados en base a los barridos de calentamiento y enfriamiento para sistemas DMPC y DMPE se recopilan en las Tablas 7.39 y 7.40, respectivamente.



**Figura 52: (A) Termogramas representativos de DSC obtenidos para liposomas multilamelares de DMPC que contienen diferentes concentraciones de Aβ (1-42). Los barridos se realizaron a una velocidad de calentamiento de 1 °C min<sup>-1</sup>; (B) Gráfico de las temperaturas de transición de fase de liposomas multilamelares de DMPC determinadas para los barridos de enfriamiento y calentamiento en función de la concentración de Aβ (1-42). (Fuente: Elaboración propia)**



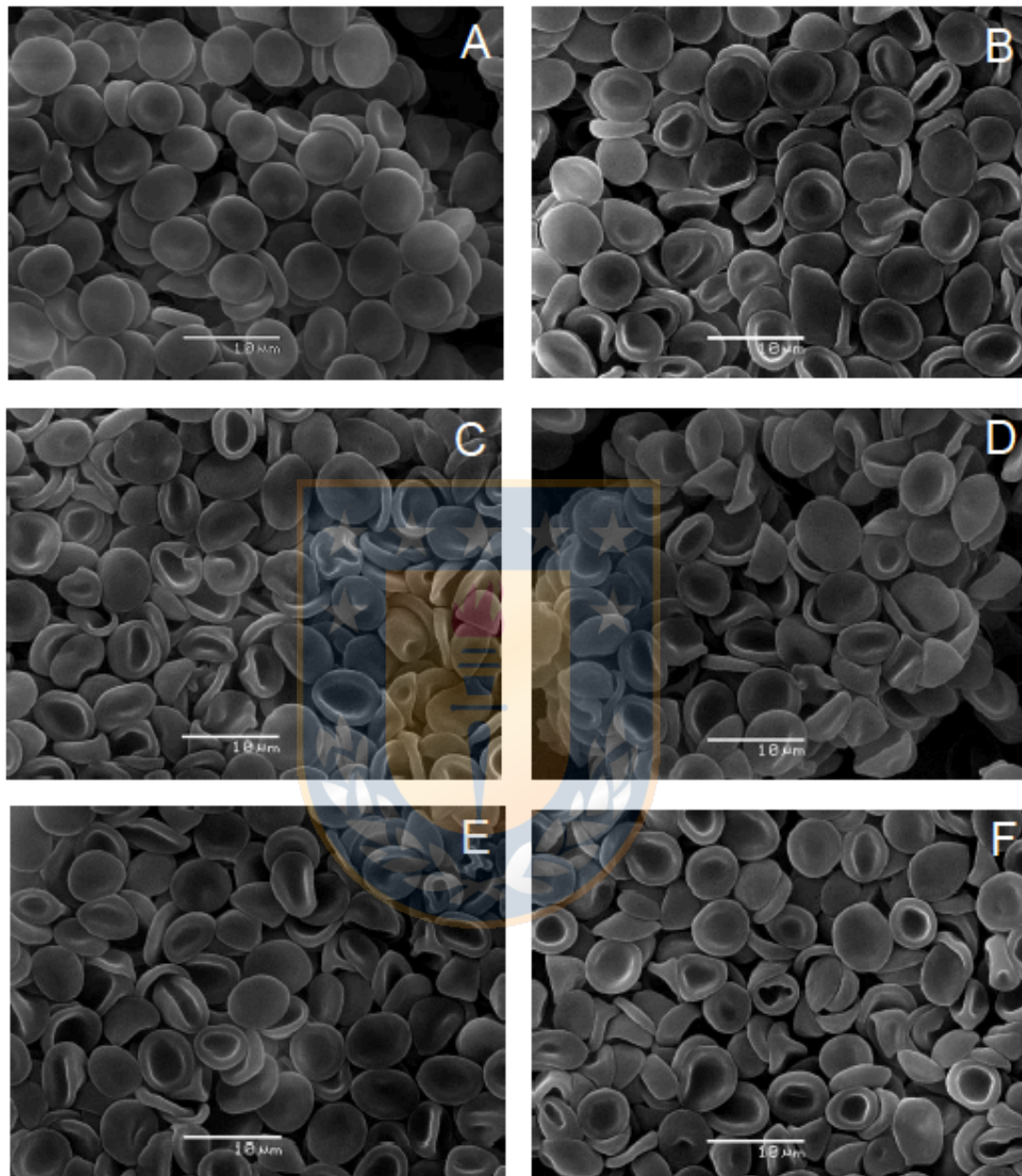
**Figura 53: (A) Termogramas representativos de DSC obtenidos para liposomas multilamelares de DMPE que contienen diferentes concentraciones de Aβ (1-42). Los barridos se realizaron a una velocidad de calentamiento de 1 °C min<sup>-1</sup>; (B) Gráfico de las temperaturas de transición de fase de los liposomas multilamelares de DMPE determinadas para barridos de enfriamiento y calentamiento en función de la concentración de Aβ (1-42). (Fuente: Elaboración propia)**

Los termogramas de DSC de calentamiento obtenidos para MLV de DMPC puro y mezclas de DMPC y péptido Aβ (1-42) en el rango de concentraciones de 10-80 μM se muestran en la Fig. 52-A. En el rango térmico de 0–30 °C, las bicapas DMPC totalmente hidratadas en ausencia de aditivos, experimentaron una transición principal fuerte y aguda a 24.02 °C, con un cambio de entalpía de 19,23 kJ mol<sup>-1</sup>, que correspondió a la conversión de la fase de gel ondulado en la fase de cristal líquido

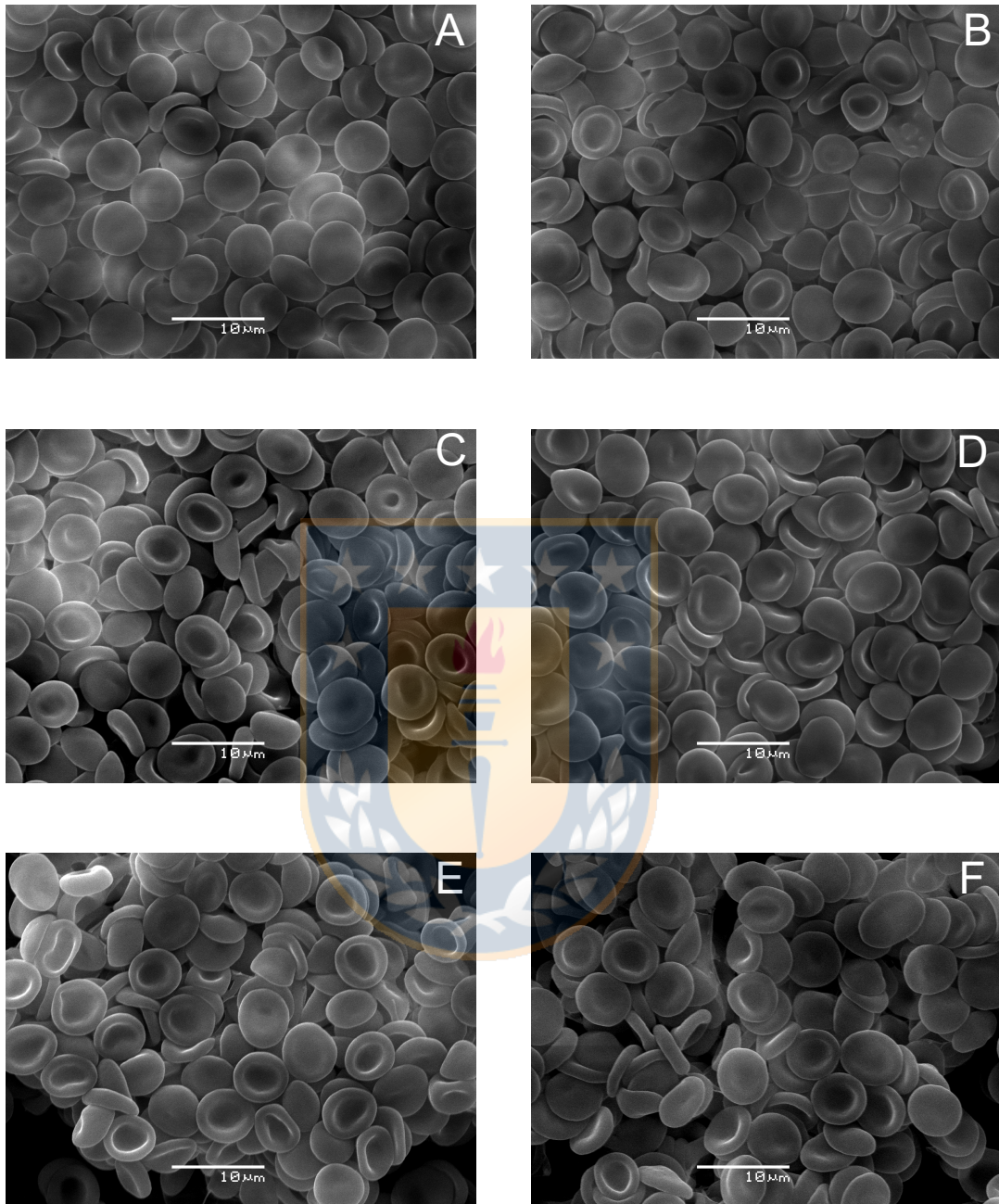


lamelar. A 14,86 °C con un  $\Delta H$  de 2,24 kJ mol<sup>-1</sup> ocurrió la pretransición (transición de fase L <sub>$\beta'$</sub>  → P <sub>$\beta'$</sub> ) (Ver Tabla 7.41). Los resultados para estos datos termodinámicos del DMPC puro están de acuerdo con informes anteriores<sup>119</sup>. Considerando los modestos cambios en el perfil termotrópico de DMPC tras la incorporación del péptido A $\beta$  (1-42) (Fig. 52-A), es posible decir que éste no alteró significativamente la estructura de DMPC. El cambio del valor de T<sub>m</sub> entre DMPC puro y en presencia de la máxima concentración del péptido fue de 0.3 °C (Fig. 52-B, Tabla 7.41). Sin embargo, hubo una diferencia entre la entalpía del proceso de fusión de DMPC puro y de DMPC en presencia de A $\beta$  (1-42) 80  $\mu$ M lo que se relaciona con el cambio de área bajo la curva en los termogramas (Tabla 7.41). En la Fig. 53-A se ilustran los termogramas de DSC para el proceso de calentamiento obtenido para MLV de DMPE y mezclas de DMPE/A $\beta$  (1-42). En el rango térmico de 30–70 °C, las MLV de DMPE puro exhibieron una transición principal fuerte y aguda a 50.80 °C, con un  $\Delta H$  de 23.13 kJ mol<sup>-1</sup> como resultado de la conversión de la fase gel a la fase cristal líquido. La Tabla 7.42 presenta los valores de los parámetros termodinámicos determinados para las mezclas de DMPE / A $\beta$  (1-42) , de los cuales los de DMPE puro coinciden con los datos de la literatura. Los perfiles calorimétricos obtenidos para DMPE no se distorsionaron por la presencia del péptido, especialmente en términos de altura y anchura de peak. Además, no se observó un cambio considerable en la temperatura de transición de fase hacia valores más bajo incluso a concentraciones máximas de A $\beta$  (1-42) (Fig. 53-B; Tabla 7.42). Todos los datos termodinámicos detallados para los experimentos de calorimetría con el péptido A $\beta$  (1-42) en presencia de MLV de DMPC y DMPE se presentan en las tablas 7.41 y 7.42, respectivamente.

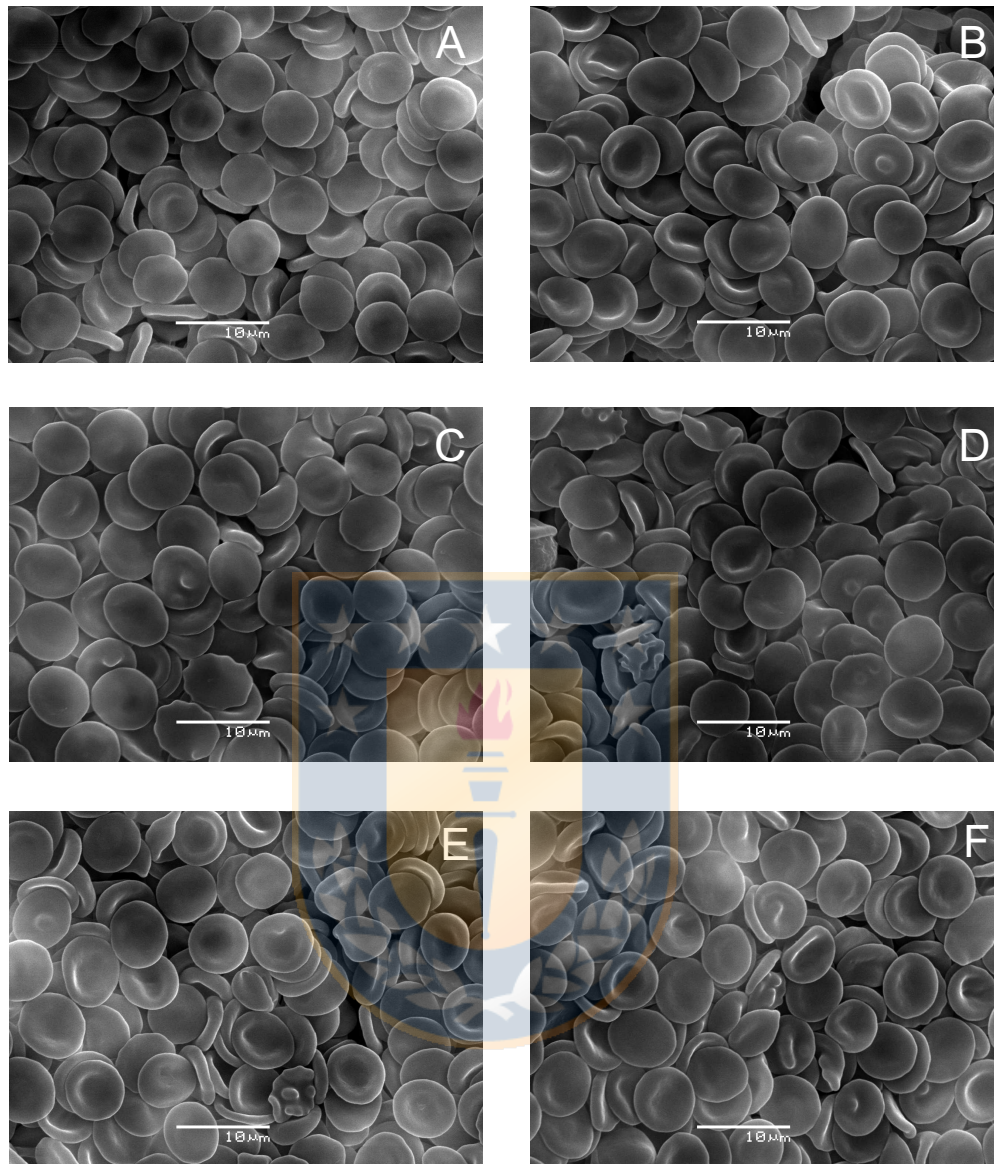
#### 7.4 Estudio por microscopía electrónica de barrido (SEM).



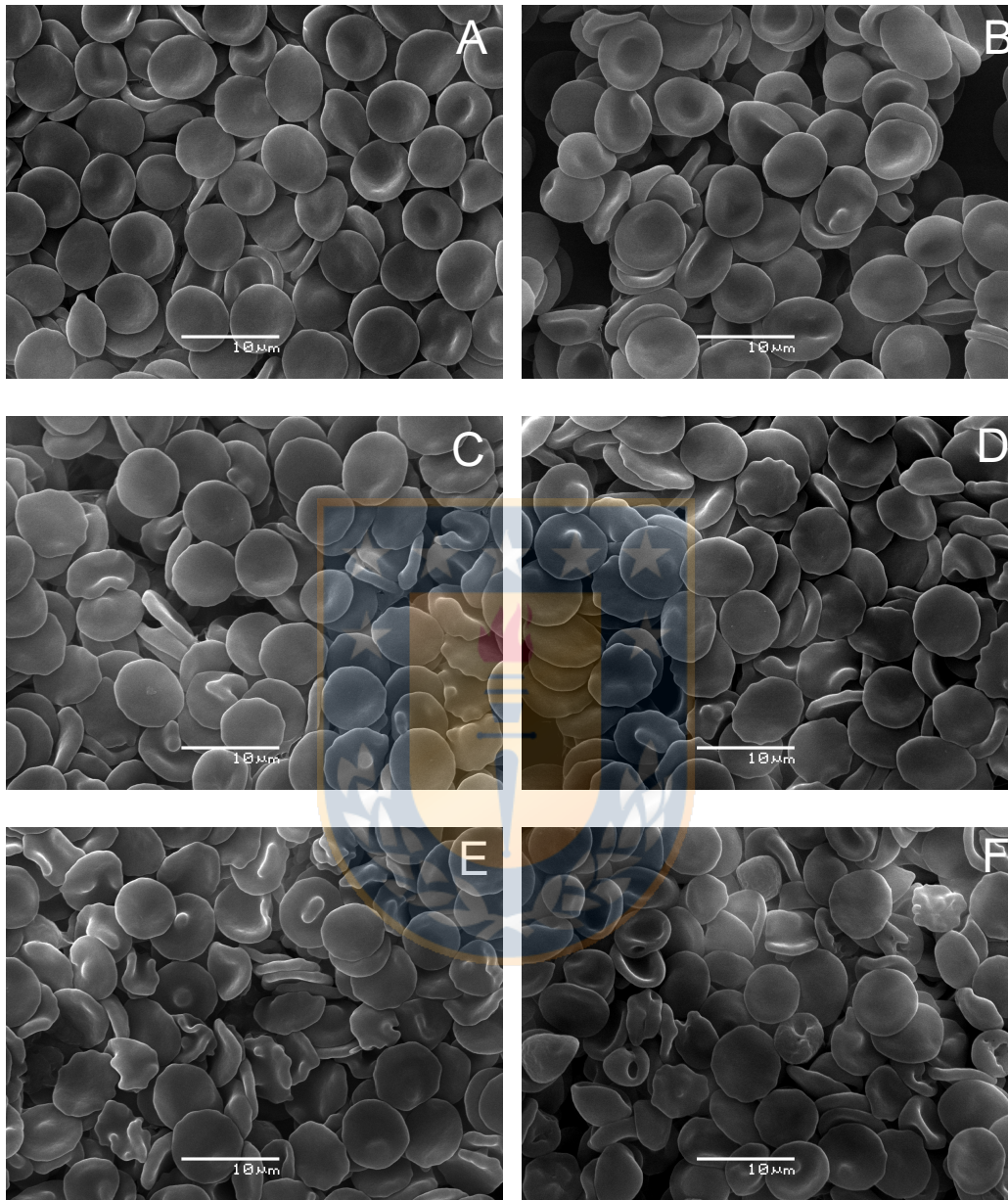
**Figura 54: Efecto de memantina en la morfología de eritrocitos humanos. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de (A) Control; (B) 20  $\mu$ M; (C) 40  $\mu$ M; (D) 60  $\mu$ M; (E) 80  $\mu$ M; (F) 100  $\mu$ M memantina. (Fuente: Elaboración propia)**



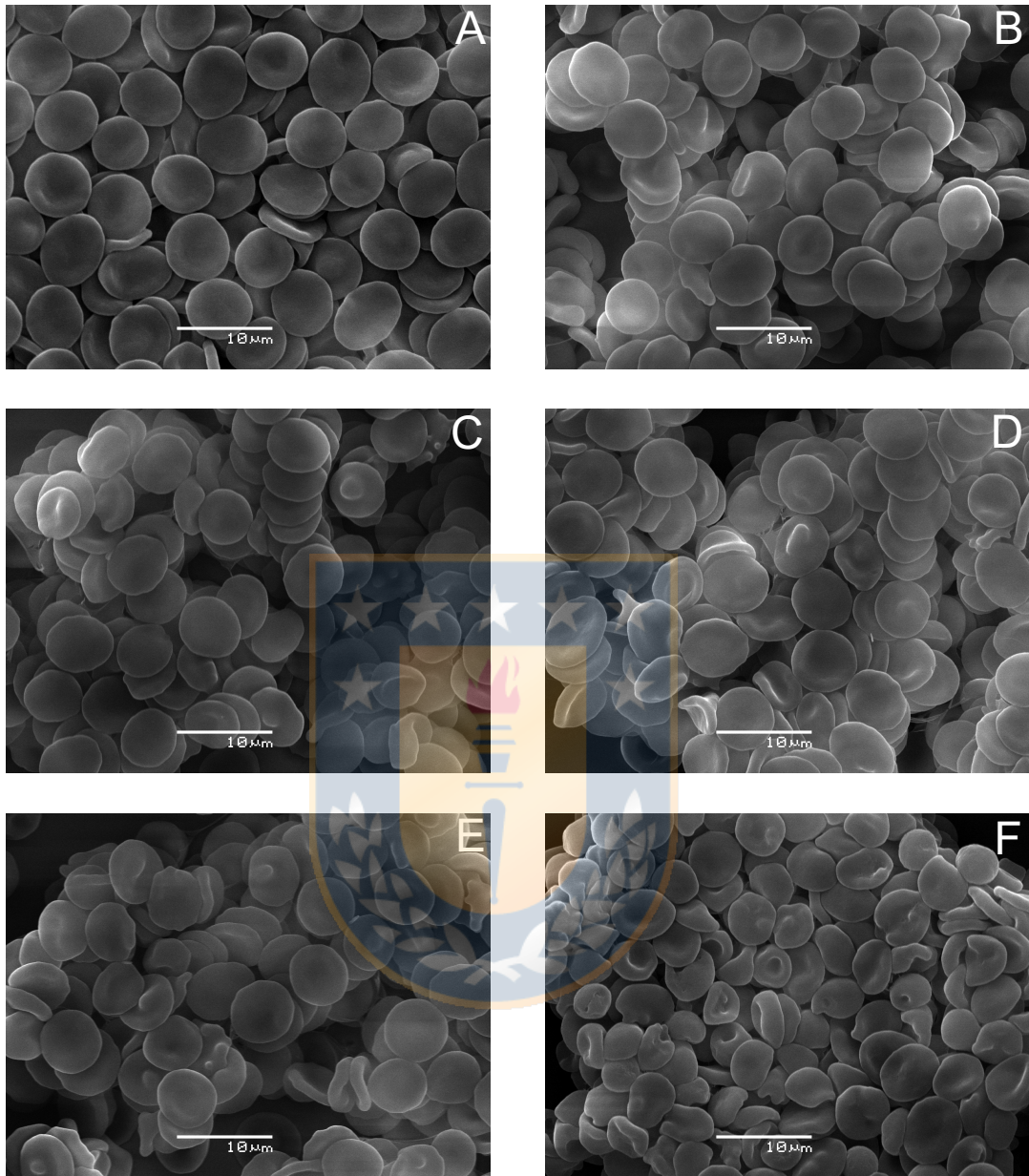
**Figura 55: Efecto de donepezilo en la morfología de eritrocitos humanos. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de (A) Control; (B) 20  $\mu$ M; (C) 40  $\mu$ M; (D) 60  $\mu$ M; (E) 80  $\mu$ M; (F) 100  $\mu$ M donepezilo. (Fuente: Elaboración propia)**



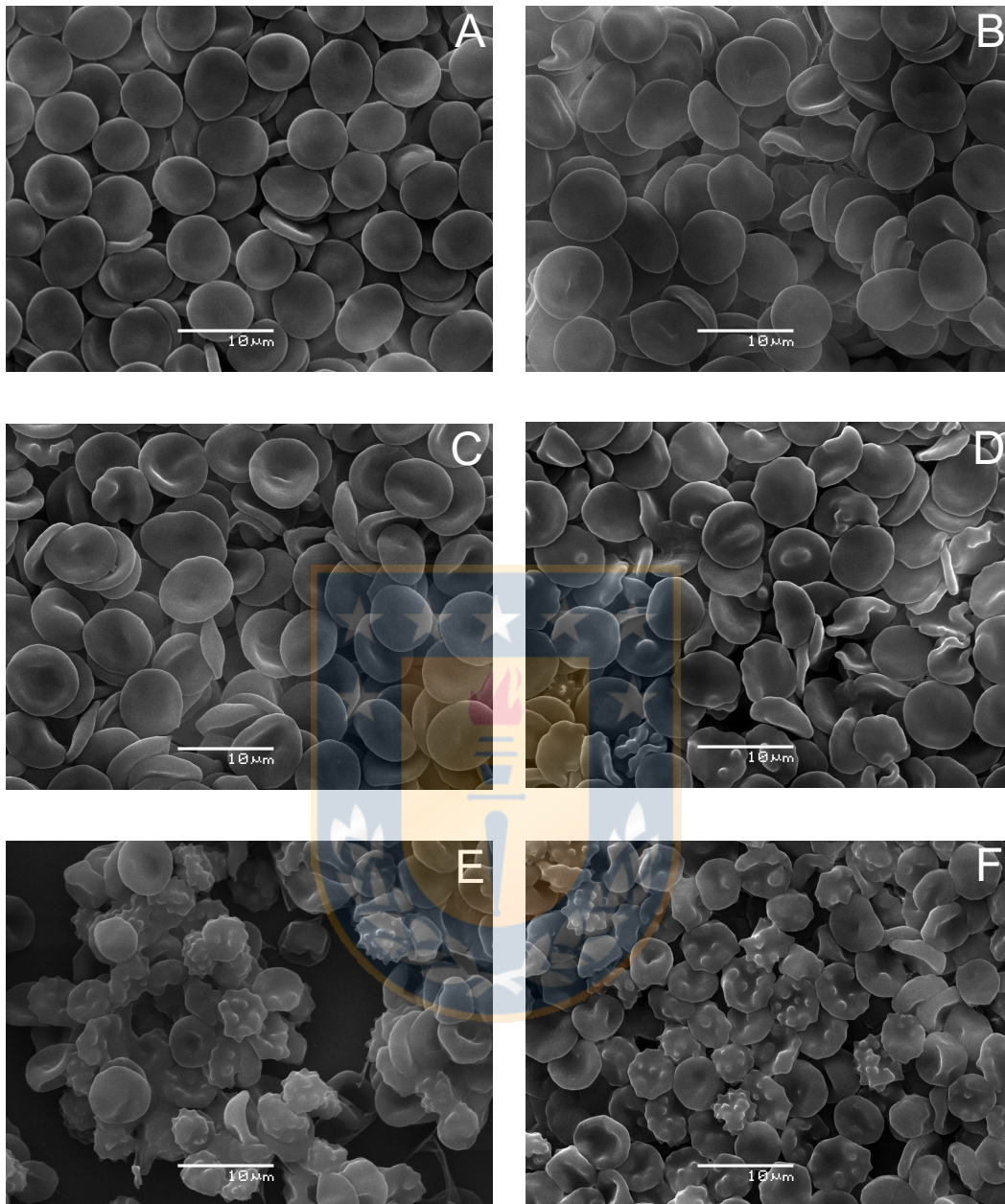
**Figura 56: Efecto de rivastigmina en la morfología de eritrocitos humanos. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de (A) Control; (B) 20  $\mu\text{M}$ ; (C) 40  $\mu\text{M}$ ; (D) 60  $\mu\text{M}$ ; (E) 80  $\mu\text{M}$ ; (F) 100  $\mu\text{M}$  rivastigmina. (Fuente: Elaboración propia)**



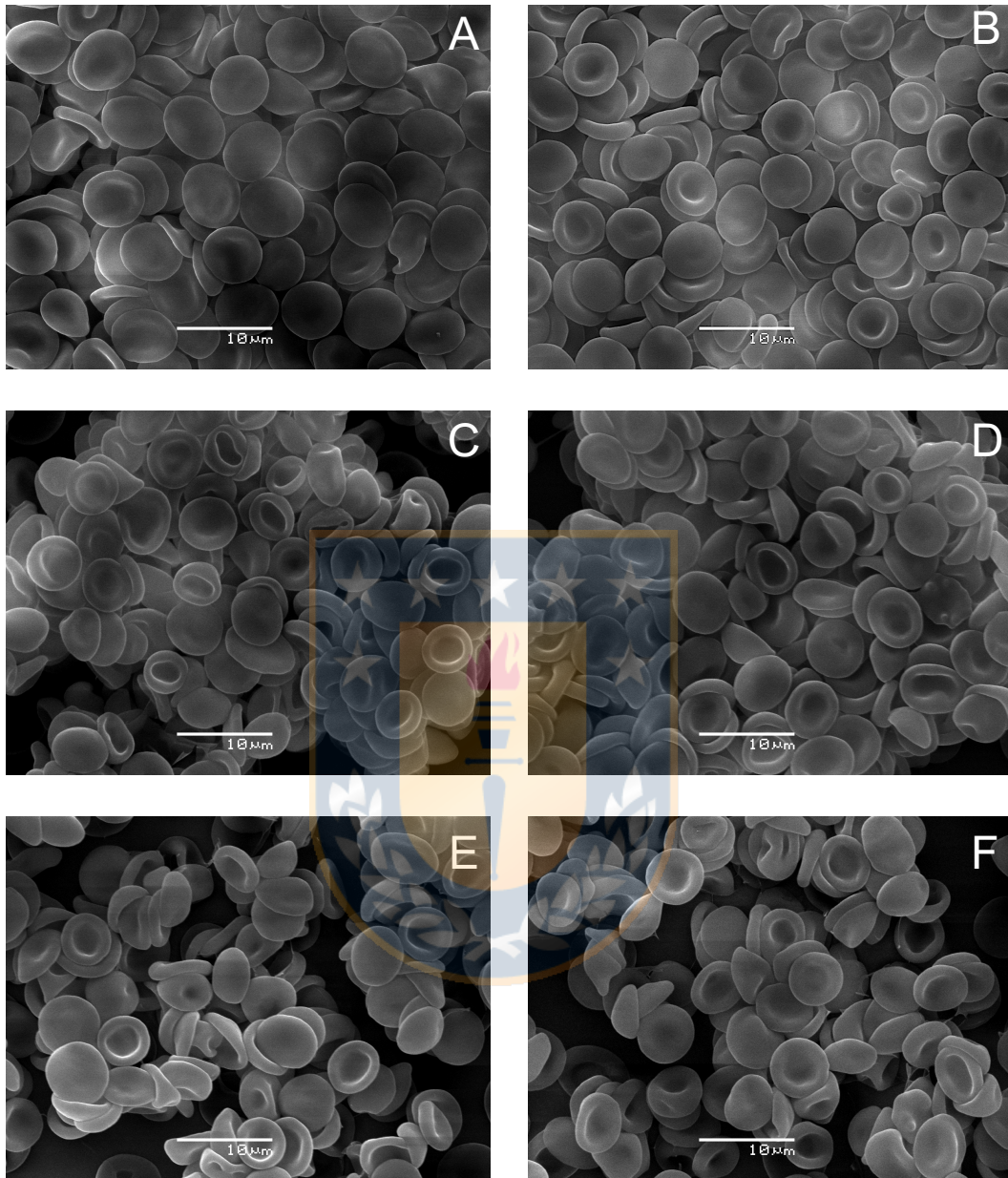
**Figura 57: Efecto de Híbrido 1 (H1) en la morfología de eritrocitos humanos. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de (A) Control; (B) 10  $\mu$ M; (C) 20  $\mu$ M; (D) 30  $\mu$ M; (E) 40  $\mu$ M; (F) 50  $\mu$ M H1. (Fuente: Elaboración propia)**



**Figura 58: Efecto de Híbrido 2 (H2) en la morfología de eritrocitos humanos. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de (A) Control; (B) 10  $\mu\text{M}$ ; (C) 20  $\mu\text{M}$ ; (D) 30  $\mu\text{M}$ ; (E) 40  $\mu\text{M}$ ; (F) 50  $\mu\text{M}$  H2. (Fuente: Elaboración propia)**

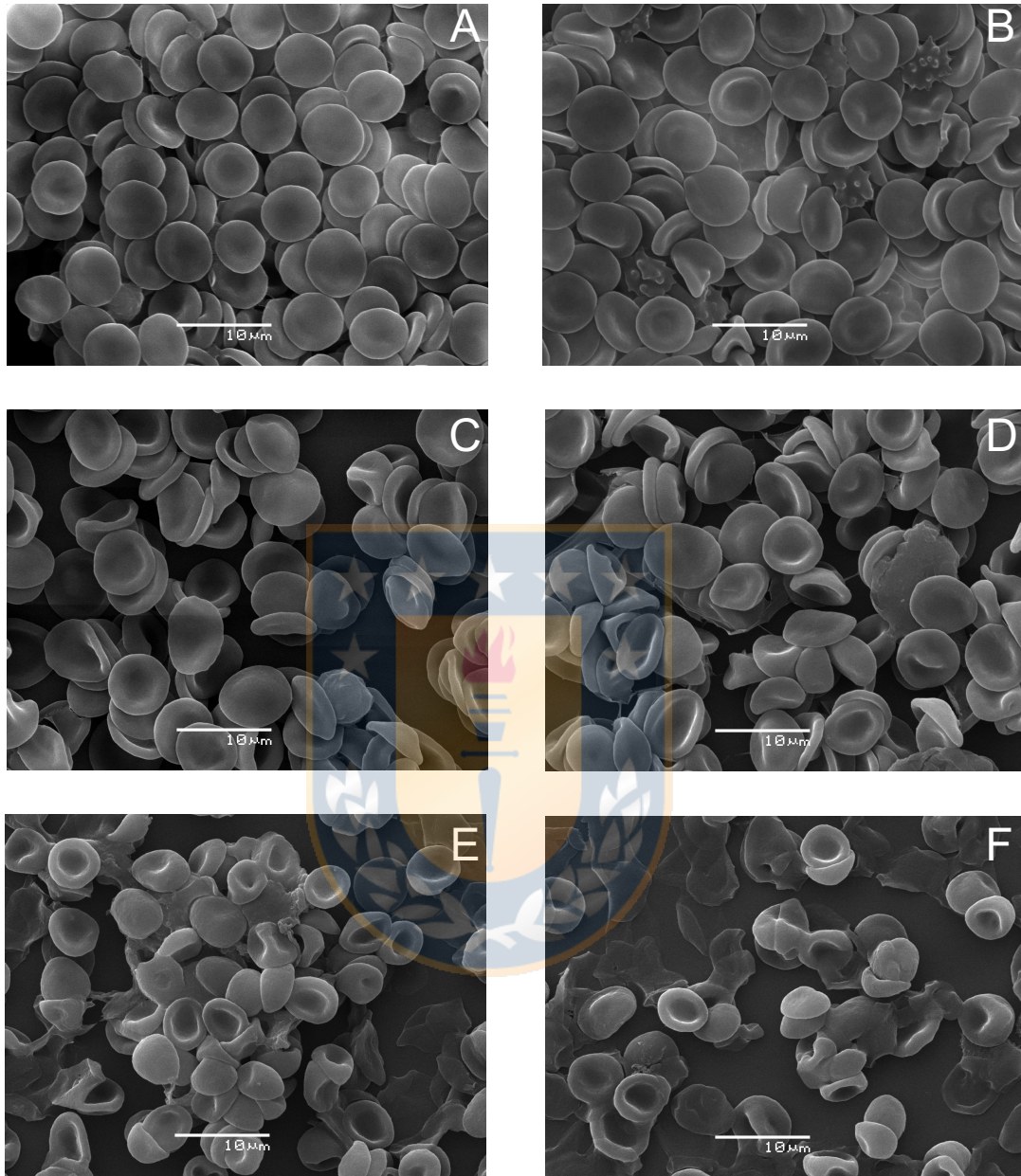


**Figura 59: Efecto de Híbrido 3 (H3) en la morfología de eritrocitos humanos. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de (A) Control; (B) 10  $\mu\text{M}$ ; (C) 20  $\mu\text{M}$ ; (D) 30  $\mu\text{M}$ ; (E) 40  $\mu\text{M}$ ; (F) 50  $\mu\text{M}$  H3. (Fuente: Elaboración propia)**

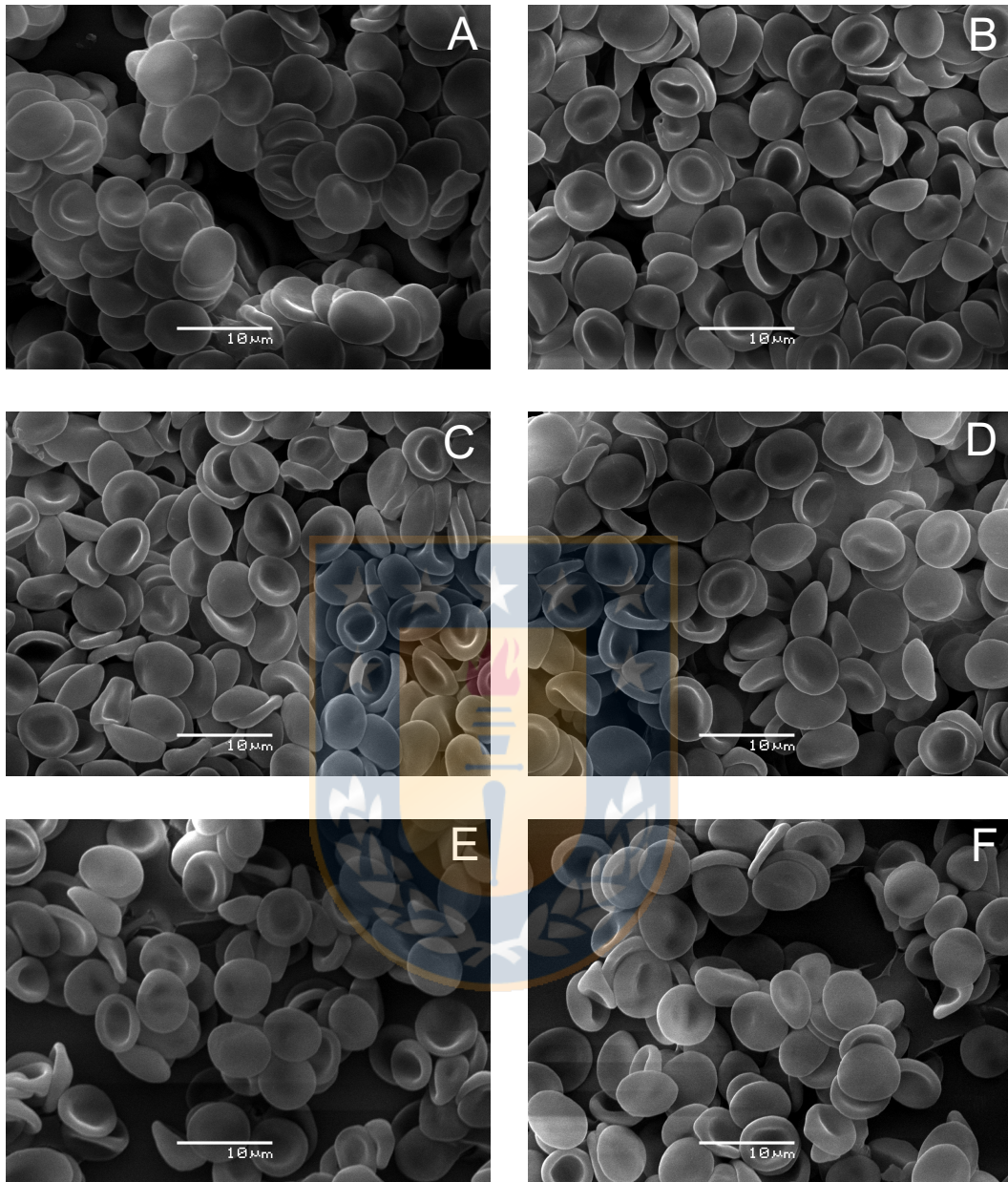


**Figura 60: Efecto del péptido A $\beta$  (1-40) en la morfología de eritrocitos humanos. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de (A) Control; (B) 5  $\mu$ M; (C) 10  $\mu$ M; (D) 15  $\mu$ M; (E) 20  $\mu$ M; (F) 30  $\mu$ M A $\beta$  (1-40). (Fuente: Elaboración propia)**

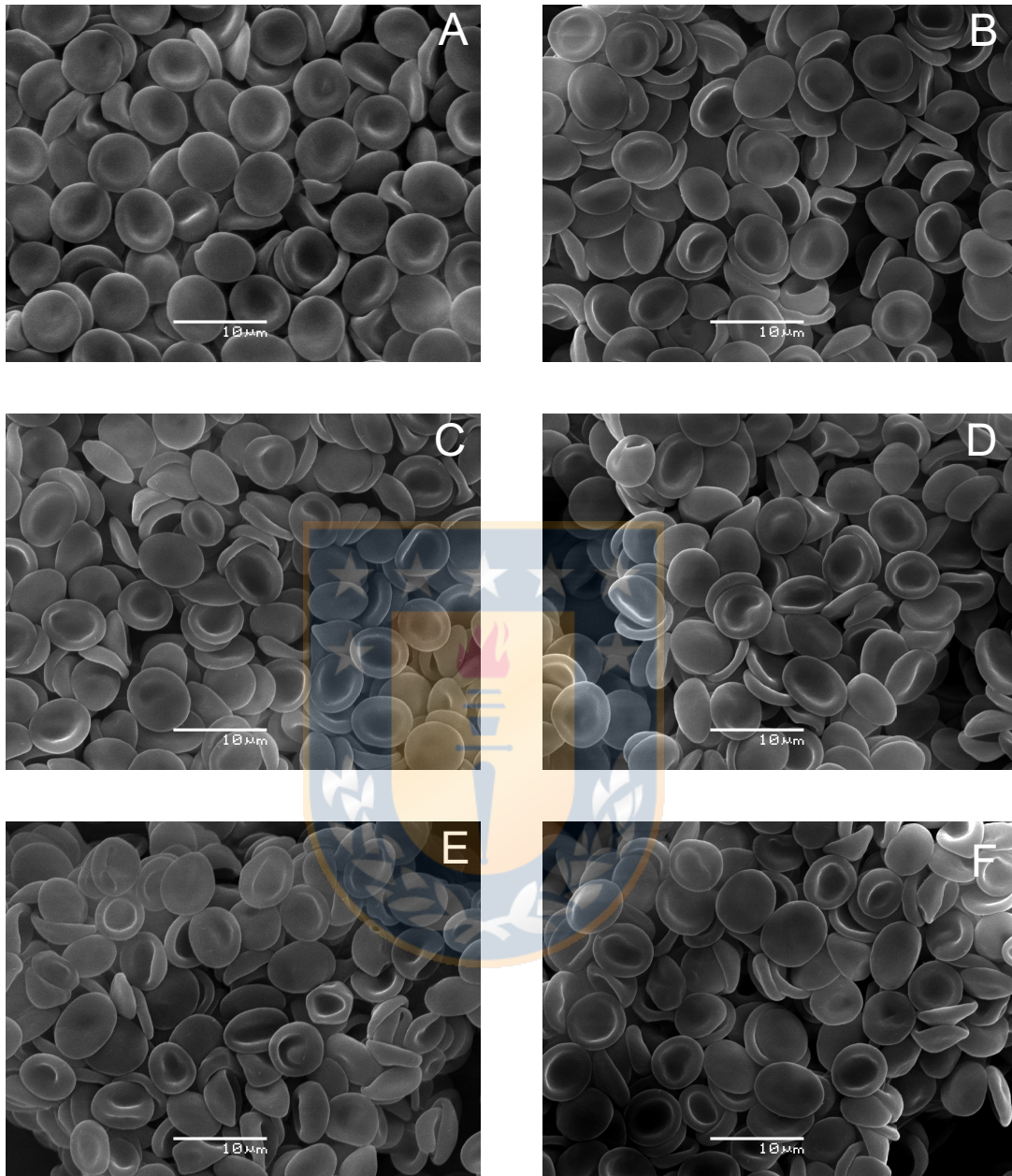




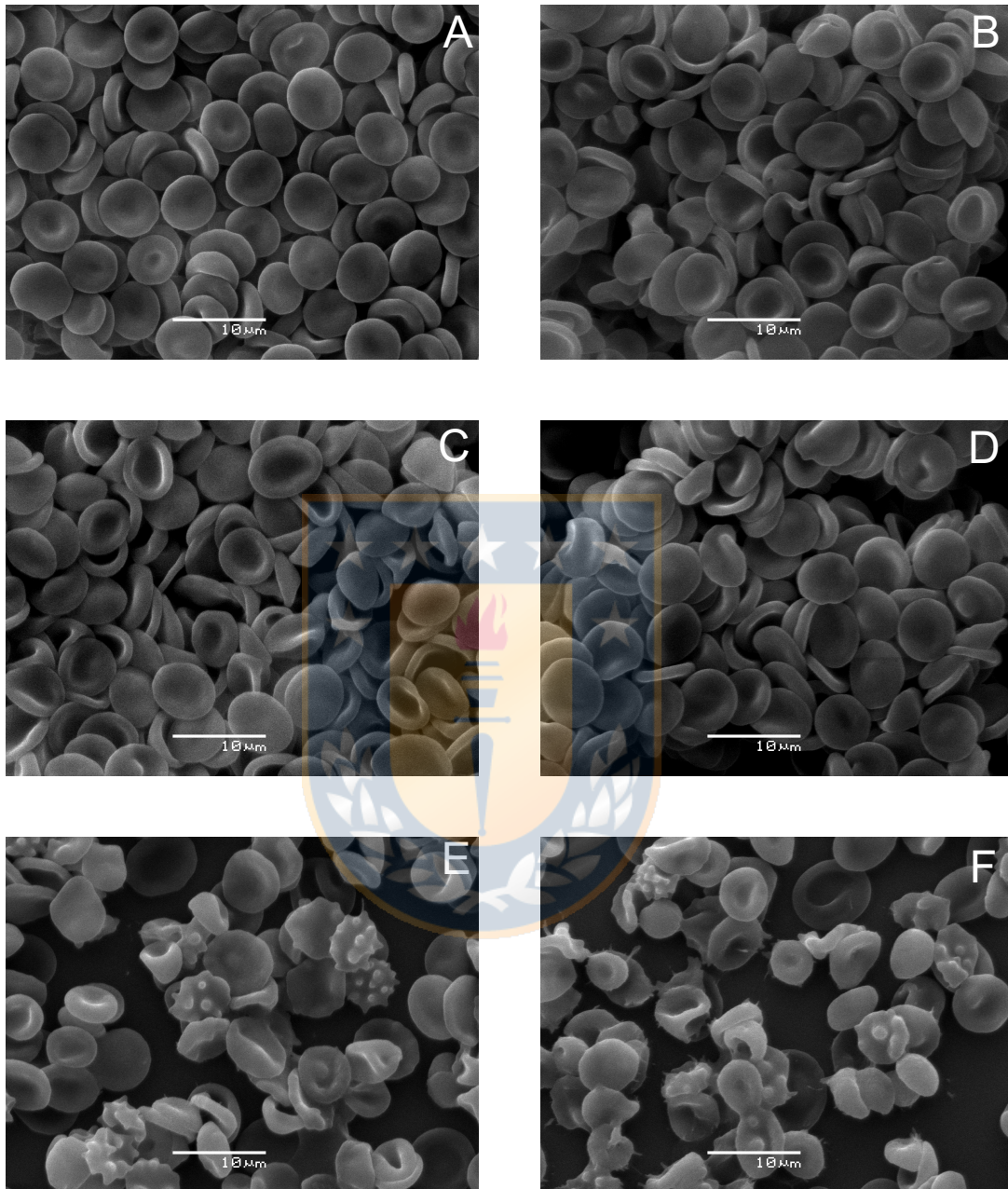
**Figura 61: Efecto del péptido A $\beta$  (1-42) en la morfología de eritrocitos humanos. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de (A) Control; (B) 1  $\mu$ M; (C) 5  $\mu$ M; (D) 10  $\mu$ M; (E) 15  $\mu$ M; (F) 20  $\mu$ M A $\beta$  (1-42). (Fuente: Elaboración propia)**



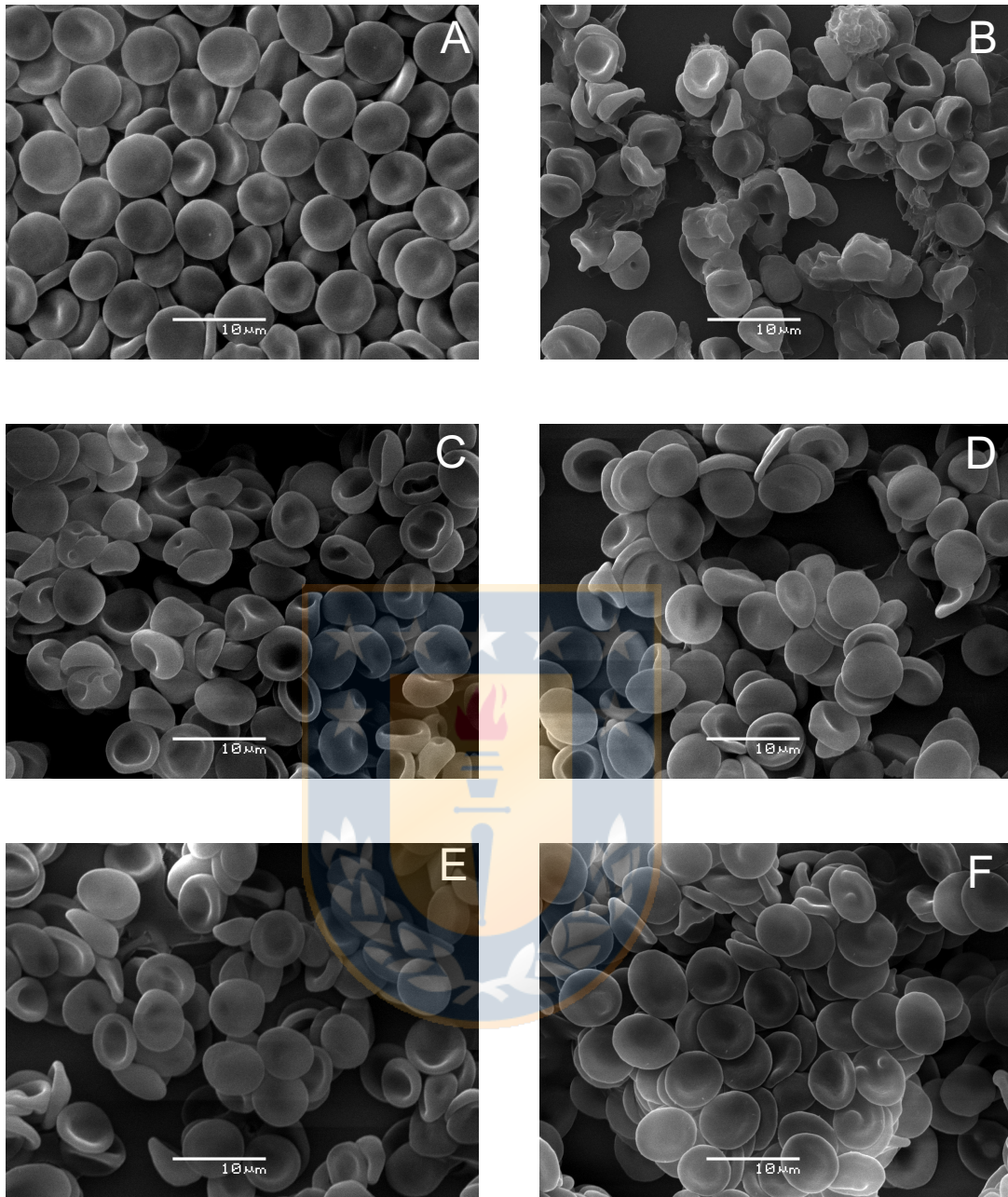
**Figura 62: Efecto protector de H1 frente al péptido A $\beta$  (1-40) en eritrocitos humanos. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de (A) Control; (B) A $\beta$  (1-40) 30  $\mu$ M; Eritrocitos humanos incubados con A $\beta$  (1-40) 30  $\mu$ M más: (C) H1 5  $\mu$ M; (D) H1 10  $\mu$ M; (E) H1 15  $\mu$ M; (F) H1 20  $\mu$ M. (Fuente: Elaboración propia)**



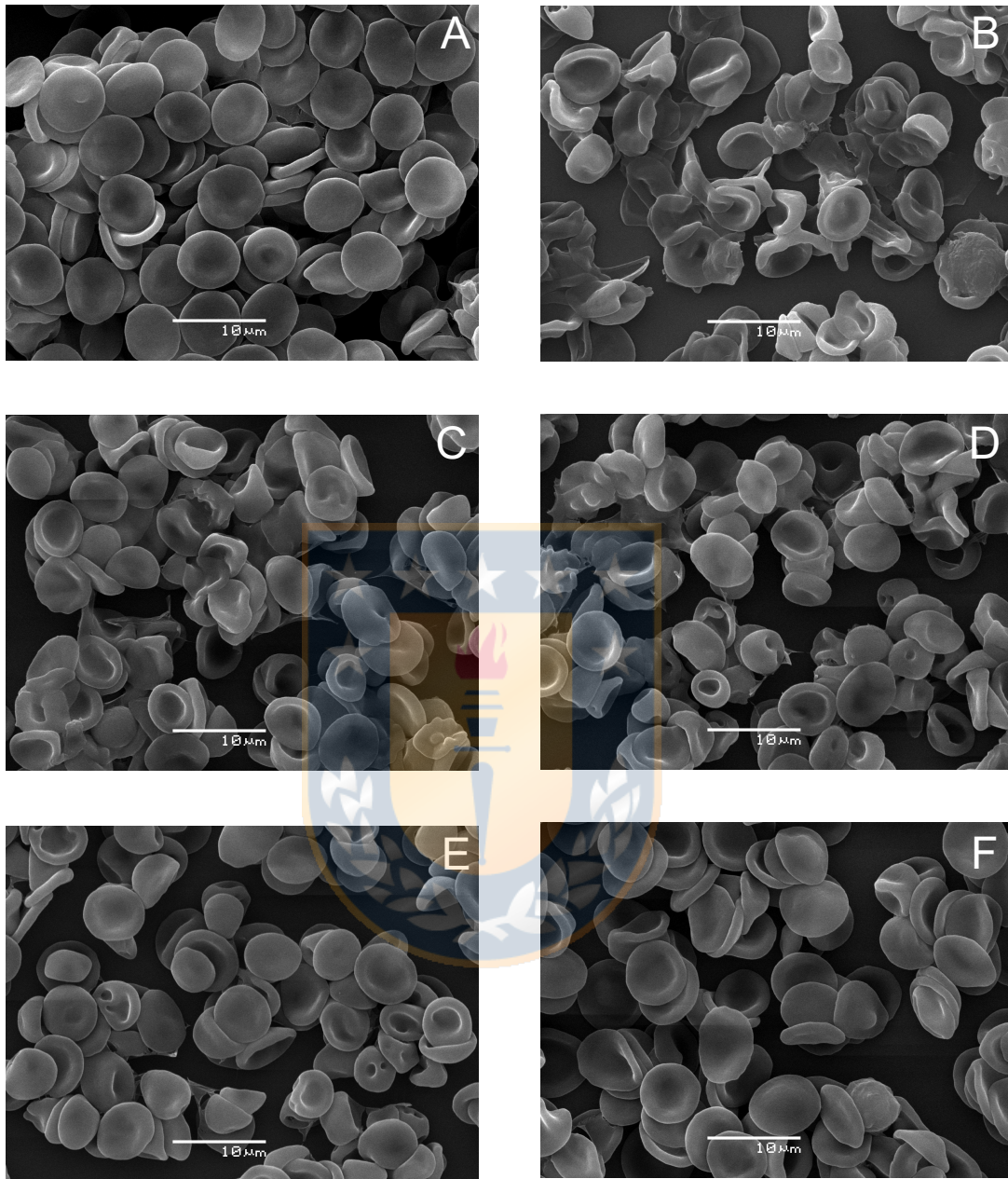
**Figura 63: Efecto protector de H2 frente al péptido Aβ (1-40) en eritrocitos humanos. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de (A) Control; (B) Aβ (1-40) 30 μM; Eritrocitos humanos incubados con Aβ (1-40) 30 μM más: (C) H2 5 μM; (D) H2 10 μM; (E) H2 15 μM; (F) H2 20 μM. (Fuente: Elaboración propia)**



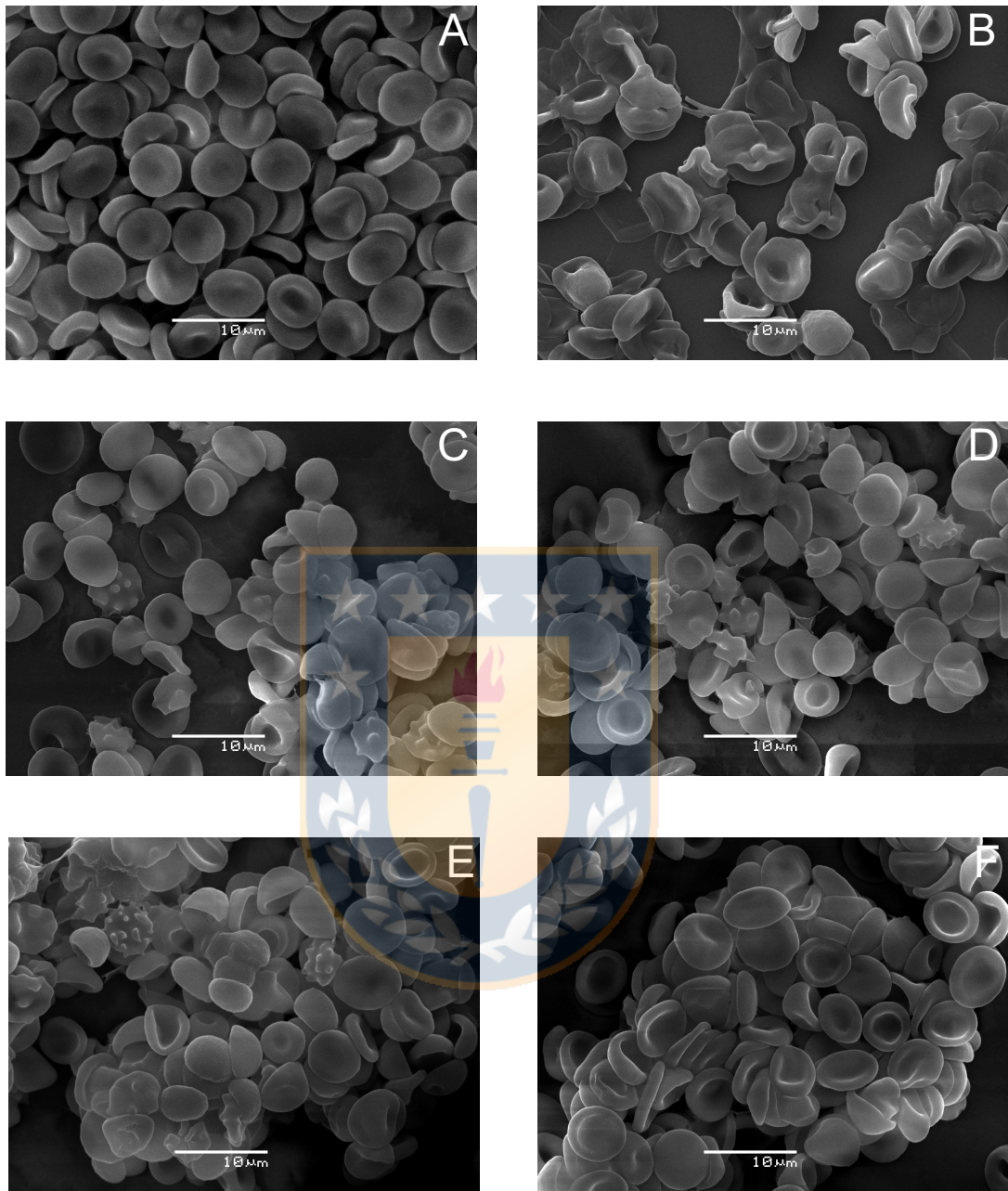
**Figura 64: Efecto protector de H3 frente al péptido A $\beta$  (1-40) en eritrocitos humanos. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de (A) Control; (B) A $\beta$  (1-40) 30  $\mu$ M; Eritrocitos humanos incubados con A $\beta$  (1-40) 30  $\mu$ M más: (C) H3 5  $\mu$ M; (D) H3 10  $\mu$ M; (E) H3 15  $\mu$ M; (F) H3 20  $\mu$ M. (Fuente: Elaboración propia)**



**Figura 65: Efecto protector de H1 frente al péptido A $\beta$  (1-42) en eritrocitos humanos. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de (A) Control; (B) A $\beta$  (1-42) 20  $\mu$ M; Eritrocitos humanos incubados con A $\beta$  (1-42) 20  $\mu$ M más: (C) H1 5  $\mu$ M; (D) H1 10  $\mu$ M; (E) H1 15  $\mu$ M; (F) H1 20  $\mu$ M. (Fuente: Elaboración propia)**



**Figura 66: Efecto protector de H2 frente al péptido Aβ (1-42) en eritrocitos humanos. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de (A) Control; (B) Aβ (1-42) 20 μM; Eritrocitos humanos incubados con Aβ (1-42) 20 μM más: (C) H2 5 μM; (D) H2 10 μM; (E) H2 15 μM; (F) H2 20 μM. (Fuente: Elaboración propia)**



**Figura 67: Efecto protector de H3 frente al péptido Aβ (1-42) en eritrocitos humanos. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de (A) Control; (B) Aβ (1-42) 20 μM; Eritrocitos humanos incubados con Aβ (1-42) 20 μM más: (C) H3 5 μM; (D) H3 10 μM; (E) H3 15 μM; (F) H3 20 μM. (Fuente: Elaboración propia)**

Mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) se estudió *in vitro* el efecto de las drogas terapéuticas, los péptidos A $\beta$  (1-40) y A $\beta$  (1-42) y los híbridos H1, H2 y H3 sobre la morfología de eritrocitos humanos. Además, se evaluó el posible efecto protector de éstos últimos frente a los péptidos amiloides. Todas las imágenes de SEM se obtuvieron con un aumento de 2500X.

Las imágenes resultantes de la interacción de memantina con eritrocitos humanos (Fig. 54) indican que el fármaco indujo cambios en la morfología de los glóbulos rojos. La forma normal de los glóbulos rojos humanos incubados en PBS (pH 7.4, control, Fig. 54-A) es un disco bicóncavo plano (discocito) de 8  $\mu$ m de diámetro. El análisis morfológico de los resultados reveló que la memantina cambió la forma normal de los glóbulos rojos de manera dependiente de la dosis. La Fig. 54-B (20  $\mu$ M) muestra que los discocitos sufrieron una transformación parcial en estomatocitos (células en forma de copa<sup>120-123</sup>). Con 40  $\mu$ M y 60  $\mu$ M de memantina (Fig. 54-C y 54-D) se observaron knizocitos (células con dos o tres concavidades) y estomatocitos. A 100  $\mu$ M aproximadamente el 100 % de las células se encuentra en estado de estomatocitosis.

La Fig. 55 presenta los resultados del análisis morfológico de los eritrocitos humanos expuestos a concentraciones crecientes de donepezilo. La Fig. 55-A muestra la morfología normal (discocitos) de los eritrocitos; sin embargo, cuando se expusieron *in vitro* a donepezilo 20  $\mu$ M (Fig. 55-B), su morfología discoide se alteró y cambió a estomatocitos, forma caracterizada por la presencia de una invaginación pronunciada. Esta alteración de la morfología celular se hizo más notoria cuando la concentración de donepezilo fue de 40  $\mu$ M, condición en la cual se produjo una mayor cantidad de estomatocitos (Fig. 55-C). Esta condición de estomatocitosis se mantuvo aproximadamente en el 90 % de las células observadas en el rango de concentraciones de donepezilo de 60 – 100  $\mu$ M. No se observaron otras morfologías de eritrocitos en las muestras analizadas.

Los resultados de la incubación *in vitro* de eritrocitos con rivastigmina en un rango de concentraciones de 20-100  $\mu$ M se muestran en la Fig. 56. La morfología de los eritrocitos se vio alterada de manera muy sutil a medida que se incrementó la concentración de la droga. A bajas concentraciones (20-40  $\mu$ M) el fármaco indujo la



pérdida de la forma bicóncava normal de la mayoría de los eritrocitos. Las células mostraron una superficie irregular ( $20\ \mu\text{M}$ ) y se observó la presencia de espículas ( $40 - 60\ \mu\text{M}$ ) en algunas superficies eritrocitarias. Con concentraciones crecientes de rivastigmina hubo una leve aparición de equinocitos (Fig. 56-C y Fig. 56-D) y un gran porcentaje de células experimentó estomatocitosis a concentraciones más altas ( $80-100\ \mu\text{M}$ ).

Los resultados de la incubación de eritrocitos con el híbrido H1 se muestran en la figura 57. El análisis reveló que los eritrocitos humanos tratados con H1 en el rango de concentraciones de  $10-50\ \mu\text{M}$  experimentaron cambios notorios sobre la superficie. En presencia de H1 a  $10$  y  $20\ \mu\text{M}$  se observó la presencia de espículas en un bajo porcentaje ( $5-10\%$ ). A  $30\ \mu\text{M}$  el híbrido produjo equinocitosis en más del  $50\%$  de las células. Con concentraciones de H1 de  $40-50\ \mu\text{M}$  se observa una gran cantidad de células deformadas equinocíticas y en la máxima concentración ( $50\ \mu\text{M}$ , Fig. 57-F) también se presentaron estomatocitos en escasa cantidad.

Los eritrocitos tratados con el híbrido H2 y observados mediante SEM se presentan en la Fig. 58. Como se observa en las figuras 58-A, 58-B y 58-C, H2 no alteró significativamente la morfología normal discoídea de los eritrocitos en el rango de concentraciones de  $10-30\ \mu\text{M}$ . Sin embargo, a concentraciones mayores ( $40-50\ \mu\text{M}$ ) se observó una escasa cantidad de células débilmente espiculadas (Fig 58-E) con indicios de equinocitosis. A  $50\ \mu\text{M}$  se observa una gran cantidad de células estomatocíticas cuyo volumen es menor respecto al volumen normal de un eritrocito sano. Al mismo tiempo en esta última concentración se observa un escaso número de eritrocitos con protuberancias en su superficie ( $< 5\%$ ).

Los cambios morfológicos de glóbulos rojos humanos tratados diferentes concentraciones de híbrido 3 (H3) se muestran en la Fig. 59. Del análisis morfológico de las muestras se verifica que H3 es capaz de alterar la estructura normal discoide de los eritrocitos en estado normal e inducir la formación de células con protuberancias (equinocitos) e invaginaciones (estomatocitos). Con una concentración de  $20\ \mu\text{M}$  del compuesto (Fig. 59-B), se observa una escasa cantidad de equinocitos mientras que el resto de las células conserva su estado normal bicóncavo (Fig. 59-C). La Fig. 59-D muestra el efecto de H3  $60\ \mu\text{M}$  sobre la morfología de los eritrocitos. A esta

concentración una gran cantidad de glóbulos rojos presenta protuberancias y espículas en su superficie (> 50%). En el rango de concentraciones de 40-50  $\mu\text{M}$  H3 induce una marcada equinocitosis en más del 90% de las células, modificando significativamente su forma normal discocídea (Fig. 59-E y 59-F).

Los resultados del estudio morfológico de eritrocitos humanos tratados con los péptidos beta-amiloides  $\text{A}\beta$  (1-40) y  $\text{A}\beta$  (1-42) se presentan en las Figuras 60 y 61 respectivamente. Como se aprecia en la figura 60-B y 60-C, al incubar glóbulos rojos humanos sanos en estado normal (Fig. 60-A) a 37 °C con diferentes concentraciones del péptido  $\text{A}\beta$  (1-40) se produce un cambio morfológico en las células que es concentración-dependiente. A 5  $\mu\text{M}$  el péptido induce la formación inmediata de estomatocitos en un gran porcentaje de las células (80%) y al aumentar la concentración el cambio morfológico es evidente en todos los eritrocitos (Fig. 60-D). A medida que se aumenta la concentración del péptido hasta 100  $\mu\text{M}$  (Fig. 60-F), los eritrocitos mantienen su condición estomatocítica y además aparece un número escaso de knizocitos (eritrocitos con más de una cavidad o hendidura en su superficie). Por otra parte, los resultados de los estudios por SEM referentes al péptido  $\text{A}\beta$  (1-42) se muestran en la Fig. 61. Con bajas concentraciones (1  $\mu\text{M}$ , Fig. 61-B) del péptido  $\text{A}\beta$  (1-42) se puede observar que esta molécula induce la aparición tanto de células equinocíticas y estomatocíticas, siendo estas últimas las de mayor número (>60%). Estos equinocitos, presentes a bajas concentraciones del péptido, desaparecen cuando la concentración de  $\text{A}\beta$  (1-42) aumenta a 5-10  $\mu\text{M}$ . Es así como en la Fig. 61-C y 61-D se observa que gran parte de las células (> 80%) adopta una morfología estomatocítica y prácticamente no se observan eritrocitos en estado normal. Concentraciones mayores del péptido (15-20  $\mu\text{M}$ ) inducen en los eritrocitos un evidente y pronunciado cambio en su morfología. Incluso a 15  $\mu\text{M}$  hay evidencia de destrucción (o lisis) celular y se observan restos de membranas de eritrocitos que se destruyeron por efecto del péptido. Este efecto es más notorio a la máxima concentración estudiada para este péptido, 20  $\mu\text{M}$  (Fig. 61-F).

Se comprobó el posible efecto protector de membrana de los híbridos H1, H2 y H3 frente al efecto de los péptidos amiloides  $\text{A}\beta$  (1-40) y  $\text{A}\beta$  (1-42) en eritrocitos humanos, incubando las células con diferentes concentraciones de los híbridos a 37

°C y luego agregando el péptido. Los resultados de los experimentos referentes al efecto protector de los híbridos frente al péptido A $\beta$  (1-40) se presentan en las Figuras 62, 63 y 64. Por otro lado, los resultados de los ensayos del efecto protector de los híbridos frente al péptido A $\beta$  (1-42) se presentan en las Figuras 65, 66 y 67.

La micrografía obtenida por SEM de eritrocitos humanos incubados en ausencia de agentes externos se presenta en la Fig. 62-A. Al igual que en los ensayos anteriores, en esta condición los eritrocitos presentan una morfología discoídea normal. En la Fig. 62-B se presenta el efecto que posee sobre eritrocitos humanos el péptido A $\beta$  (1-40) en una concentración 30  $\mu$ M. Tal como se presentó anteriormente, el péptido induce estomatocitosis en un gran porcentaje de las células (> 80%). La Fig. 62-C muestra el efecto que tiene el péptido péptido A $\beta$  (1-40) frente a eritrocitos pre-incubados con H1 10  $\mu$ M. El número de estomatocitos en esta condición se mantiene constante, similar a la Fig. 62-B. A medida que se aumenta la concentración del híbrido H1 en la pre-incubación, el efecto del péptido (estomatocitosis) disminuye levemente. Una concentración de H1 de 20  $\mu$ M atenúa de manera moderada la cantidad de estomatocitos inducidos por la acción del péptido A $\beta$  (1-40) (Fig. 62-F) y promueve la aparición de eritrocitos con forma discocítica. Esto evidencia un efecto de recuperación de la forma del eritrocito hacia su forma normal discoide.

Por otra parte, el efecto protector de H2 se estudió siguiendo el mismo protocolo anterior. En este caso, el incremento de la concentración de H2 en los eritrocitos (pre-incubación) no alteró significativamente el efecto del péptido A $\beta$  (1-40). Esto se representa en la Fig. 63. Es evidente que el efecto del péptido A $\beta$  (1-40), representado en la Fig. 10-B, se mantiene con la misma intensidad independientemente de la concentración de H2. La cantidad de estomatocitos presentes en las figuras 63-C, 63-D, 63-E y 63-F son bastante similares, lo que demuestra que el efecto protector de H2 fue débil al no revertir esta condición hacia el estado normal del eritrocito.

La Fig. 64 presenta el estudio de la capacidad protectora del híbrido 3 (H3) frente a la propiedad perturbadora del péptido A $\beta$  (1-40) en los eritrocitos humanos. La Fig. 64-B muestra que el péptido A $\beta$  (1-40) 30  $\mu$ M indujo la formación de estomatocitos (células en forma de copa). Las figuras 64-C y 64-D muestran el efecto del péptido A $\beta$  (1-40) sobre eritrocitos pre-incubados con H3 en concentraciones de 5  $\mu$ M y 10

$\mu\text{M}$ , respectivamente. A una concentración de  $5 \mu\text{M}$  de H3 (Fig. 64-C), la condición de estomatocito inducida por el péptido se mantiene aún presente de manera evidente. Sin embargo, al aumentar la concentración de H3 hasta  $10 \mu\text{M}$  (Fig. 64-D) la cantidad de células en estado de estomatocito disminuye y la forma normal discocítica de los eritrocitos se hace más evidente. Por otro lado, al aumentar la concentración de pre-incubación del híbrido a  $15 \mu\text{M}$  (Fig. 64-E) y  $20 \mu\text{M}$  (Fig. 64-F) se presenta equinocitosis en más del 60 % de las células inducidas, probablemente, por el efecto del híbrido H3. Estos resultados indican que la capacidad protectora de H3 frente al péptido  $\text{A}\beta$  (1-40) se presenta a concentraciones bajas del híbrido ( $10 \mu\text{M}$ ), en donde las células recuperan su morfología normal.

Los resultados de los análisis de la capacidad protectora de los híbridos H1, H2 y H3 frente al efecto del péptido  $\text{A}\beta$  (1-42)  $20 \mu\text{M}$  en eritrocitos se muestran en las figuras 65, 66 y 67. Como puede apreciarse en la Fig. 65, el péptido  $\text{A}\beta$  (1-42) en una concentración de  $20 \mu\text{M}$  induce una evidente alteración de la forma discocítica de los glóbulos rojos, generando estomatocitosis y destrucción celular (lisis) (Fig. 65-B). Las imágenes obtenidas mediante SEM del efecto protector de H1 frente al péptido  $\text{A}\beta$  (1-42) muestran que la alteración inducida por el péptido se revirtió en muestras previamente incubadas con H1. De hecho, las células incubadas con  $5 \mu\text{M}$  y  $10 \mu\text{M}$  de H1 todavía muestran una gran cantidad de estomatocitos (Fig. 65-C y 65-D), pero también se observan algunas células normales (discocitos), cuyo número aumentó cuando la concentración de H1 fue de  $20 \mu\text{M}$  (Fig. 65-F). Estos resultados demuestran el efecto protector de H1 frente al efecto del péptido  $\text{A}\beta$  (1-42)  $20 \mu\text{M}$  que perturba la morfología normal de los eritrocitos humanos.

La Fig. 66 presenta la capacidad protectora de H2 frente al efecto del péptido  $\text{A}\beta$  (1-42)  $20 \mu\text{M}$  en eritrocitos humanos. La Fig. 66-B muestra que el péptido  $\text{A}\beta$ (1-42) en una concentración de  $20 \mu\text{M}$  induce una fuerte alteración de la forma normal de los glóbulos rojos induciendo estomatocitosis y lisis celular. Este efecto agresivo sobre la estructura de los eritrocitos se atenuó gradualmente cuando los eritrocitos fueron pre-incubados con H2 en el rango de concentraciones de  $5\text{-}20 \mu\text{M}$ . Con una concentración de  $5 \mu\text{M}$  (Fig. 66-C) se observa una gran cantidad de estomatocitos (> 40%) y aún se observan restos de membranas destruidas por el efecto del péptido. Esa

condición se repite en la Fig. 66-D en que la concentración de H3 en los eritrocitos pre-incubados fue de 10  $\mu$ M. A esta concentración se observa una gran cantidad de estomatocitos y fragmentos de membranas en escasa cantidad. Al aumentar la concentración de H2 hasta 15  $\mu$ M (Fig.66-E), no se observan restos de membranas y el número de estomatocitos disminuyó y se observan algunos discocitos en baja cantidad (20%). En la máxima concentración estudiada para este híbrido (20  $\mu$ M), se observa una gran recuperación de la forma de discocito (Fig. 66-F), sin embargo, aún se presentan células con morfología estomatocítica en mediana cantidad (30%). Este fenómeno indica que la pre-incubación con H2 protege al eritrocito del fuerte efecto que posee el péptido A $\beta$  (1-42) sobre estas células.

Finalmente, los resultados de los ensayos del efecto protector de H3 frente al péptido A $\beta$ (1-42) sobre glóbulos rojos humanos se presentan en la Fig. 67. Nuevamente, la incubación de glóbulos rojos con el péptido A $\beta$  (1-42) en una concentración de 20  $\mu$ M generó los resultados antes detallados: estomatocitosis y lisis celular (Fig. 67-B). En esta condición muchas células tienen formas indefinidas debido a las alteraciones profundas que generó el péptido. Las figuras 67-C, 67-D, 67-E y 67-F muestran una recuperación moderada de la forma normal discocítica de los eritrocitos debido a la pre-incubación de las células con H3 en diferentes concentraciones. Como se aprecia en la Fig. 67-C, la pre-incubación de las células con H3 en concentración 5  $\mu$ M, amortigua en cierta medida el agresivo efecto del péptido sobre los glóbulos rojos. Esto se manifiesta en que no se observan fragmentos de membranas celulares ni células destrozadas. Sin embargo, aproximadamente un 20% de las células sufrió equinocitosis (células con espículas) y un porcentaje también menor adoptó la forma de estomatocito. El mismo resultado puede observarse en la Fig. 67-D en que la pre-incubación de las células con H3 en una concentración de 10  $\mu$ M no genera una recuperación considerable de la forma normal discocítica de los glóbulos rojos. Al aumentar la concentración de H3 en la pre-incubación hasta 15  $\mu$ M, la aparición de equinocitos (10%) y estomatocitos (30%) indica que, a esta concentración, H3 mantiene a los eritrocitos en una condición similar a 5 y 10  $\mu$ M, generando un efecto protector moderado ya que no se observan indicios de destrucción celular. Finalmente, las células pre-tratadas con H3 20  $\mu$ M (Fig. 68-F) se observan

notoriamente menos afectadas por el efecto del péptido A $\beta$  (1-42) debido a que no se observan equinocitos, ni células sin forma determinada ni restos celulares (membranas). Sin embargo, a esta concentración se observa un número importante de estomatocitos aunque no completamente formados. Además, se evidenció que muchas células se encuentran en estado discoide normal, confirmando un posible efecto protector de la membrana por parte de H3.



## 8. DISCUSIÓN.

### 8.1 Acerca de la interacción de moléculas terapéuticas anti-Alzheimer con membranas celulares de eritrocitos humanos y modelos moleculares.

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad compleja. Sus orígenes no están del todo claros y su evolución es difícil de monitorear a escala molecular<sup>124</sup>. A esto se suma el escaso conocimiento del cerebro, el cual sigue siendo mínimo a pesar del tiempo dedicado a su estudio y de la cantidad de literatura existente relacionada con la neurobiología<sup>125</sup>. La EA se diagnosticó por primera vez en 1906 cuando el científico alemán Alois Alzheimer detalló sus hallazgos histopatológicos en la revista *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie*<sup>126</sup> y hoy, más de cien años después de ese primer trabajo publicado, no existe una cura para esta enfermedad.

Dentro de los fármacos utilizados en el tratamiento de la EA se encuentran memantina, donepezilo y rivastigmina. La memantina es un receptor antagonista de los receptores NMDA utilizado clínicamente para tratar la EA de moderada a grave. Los receptores NMDA están dispuestos como un dímero de GluN1-GluN2B con un eje de simetría doble a lo largo de toda la molécula compuesta por un dominio amino terminal, un dominio de unión a ligando y un dominio trans-membrana; estos últimos constituyen el canal iónico heterotetramérico formado por las subunidades GluN1 y GluN2B<sup>127</sup>.

Memantina tiene una estructura de tres anillos (triciclo) y posee un grupo amino que está protonado en condiciones fisiológicas llevando una carga positiva ( $-\text{NH}_3^+$ ). Además, tiene dos grupos laterales de metilo<sup>128</sup>. El diámetro más estrecho en el túnel del canal del receptor de NMDA, denominado sitio N de NR1, es de 5,5 Å<sup>129</sup>. Por otra parte, la dimensión más amplia de 5,5 Å de memantina es una buena coincidencia con las dimensiones de la obstrucción del canal de NMDA<sup>130</sup>. Los sitios de unión primarios de memantina implicarían una interacción entre su grupo amino cargado y la cadena lateral de un residuo de Asn en la subunidad GluN1, mientras que sus dos grupos metilo se unirían a los residuos A645 y A644 en las hélices transmembrana de GluN1 y GluN2B, respectivamente<sup>131</sup>. Los receptores de NMDA

se han identificado en el cerebro; sin embargo, los glóbulos rojos humanos también expresan receptores NMDA en sus superficies<sup>132</sup>. Tomando en cuenta esos datos se consideró de interés estudiar la interacción de memantina con eritrocitos humanos para comprender el mecanismo molecular de su interacción con NMDA y la membrana celular de los glóbulos rojos. De acuerdo con los resultados de SEM, los glóbulos rojos humanos cambiaron gradualmente su forma normal de discocitos a estomatocitos en forma de copa a 20  $\mu\text{M}$  y a concentraciones más altas de memantina. Este resultado no concuerda con los reportados por Reinhart et al.<sup>132</sup> y Kuskonmaz et al.<sup>133</sup> que encontraron que memantina no afecta los parámetros hemorreológicos tales como la capacidad de deformación de los glóbulos rojos o la agregabilidad en sujetos humanos sanos incluso a altas concentraciones (100  $\mu\text{M}$ ). De acuerdo con la hipótesis del par bicapa publicado por Sheetz et al.<sup>134</sup>, los cambios morfológicos inducidos por moléculas externas se deben a una expansión diferencial de las dos monocapas de la membrana de los eritrocitos. Por lo tanto, los estomatocitos se forman cuando las moléculas se insertan en la monocapa interna, mientras que los equinocitos (células con forma espiculada) se forman cuando la molécula se inserta en la monocapa externa. La interacción preferencial de memantina con DMPC, una clase de lípidos localizada principalmente en la monocapa externa de la membrana de los glóbulos rojos, debe haber inducido la equinocitosis en lugar de la estomatocitosis observada. Varios mecanismos hipotéticos podrían explicar esta aparente anomalía. Uno de ellos es el mecanismo de intercambio de lípidos, basado en la redistribución de los lípidos de membrana<sup>135</sup>. En consecuencia, la memantina produciría un movimiento rápido de las fosfatidilcolinas (PC) y esfingomielinas hacia la monocapa interna, y el desplazamiento hacia el exterior de las fosfatidiletanolaminas y fosfatidilserinas<sup>136</sup>. Por lo tanto, la interacción de memantina con fosfatidilcolinas en la monocapa interna induciría la formación de estomatocitos, efecto que puede producirse con tan solo un 0,6% de memantina en el resto de la membrana interna<sup>136</sup>. Otro posible mecanismo es la interacción de memantina con una proteína presente en la membrana de eritrocitos, como la espectrina<sup>137</sup>. Sin embargo, la explicación más plausible implicaría la intercalación de moléculas de memantina en la monocapa interna, donde la interacción con los lípidos



polifosfoinosítidos puede ser factible <sup>138</sup>. Estos forman un componente menor en el lado citosólico de las membranas celulares eucariotas, donde el grupo fosfato proporciona a las moléculas una carga negativa a pH fisiológico<sup>138,139</sup>. Al ser memantina una molécula anfipática, su estructura hidrofóbica de tres anillos se ubicaría en la región de la cadena acilo de la bicapa, mientras que su grupo amino cargado positivamente se uniría electrostáticamente al grupo de fosfato cargado negativamente en el fosfatidilinosítol. Un mecanismo similar ha sido propuesto por Chen et al. <sup>138</sup> para el medicamento anfipático clorpromazina.

Las interacciones entre los fármacos y las membranas celulares se relacionan con aspectos como la administración, distribución, eficacia y la resistencia a los fármacos<sup>140</sup>. Los modelos moleculares de membranas celulares constituidas por bicapas lipídicas se usan comúnmente como alternativas de las membranas celulares reales con el fin de investigar sus interacciones con moléculas biológicamente relevantes. En esta tesis doctoral se desarrollaron experimentos en bicapas de DMPC y DMPE, clases de lípidos presentes respectivamente en la monocapa externa e interna de la membrana de eritrocitos humanos<sup>141</sup>. Los estudios de difracción de rayos X, espectroscopía de fluorescencia y calorimetría diferencial de barrido (DSC) mostraron que memantina interactúa preferentemente con DMPC. Los fosfolípidos DMPC y DMPE difieren solo en sus grupos amino terminales, que son  $^+N(CH_3)_3$  en DMPC y  $^+NH_3$  en DMPE. Este último posee un grupo polar más pequeño y también una carga efectiva más alta lo cual genera un sistema de dos capas más estable sostenido por enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas<sup>142</sup>. Como resultado, el empaquetamiento molecular de DMPE no se ve afectado significativamente por el agua ni por la memantina. A la inversa, el agua llena los espacios interbicapas altamente polares de DMPC, lo que resulta en un aumento de la separación de las capas. Como consecuencia, las moléculas de memantina podrían insertarse en las bicapas de DMPC e inducir perturbaciones estructurales. Los detalles de las fases de gel totalmente hidratadas de PC y PE se han informado en trabajos anteriores<sup>142-144</sup>. Es muy probable que la estructura de triciclodecano de la memantina esté en contacto con las cadenas acilo de DMPC, mientras que el grupo amino cargado positivamente interactúa con los grupos fosfatos cargados negativamente en la cabeza polar del

lípidos. Estas últimas interacciones podrían generar un debilitamiento de las atracciones electrostáticas y los enlaces de hidrógeno que mantienen las moléculas de DMPC en la disposición de dos capas. Estos resultados no concuerdan con los reportados en la literatura. Mientras que Li et al.<sup>140</sup> reportó una interacción insignificante entre la memantina 5 mM y las bicapas de PC, los cálculos de dinámica molecular realizados por Chew et al. concluyeron que el fármaco se encuentra en la región interfacial de las bicapas de POPC<sup>145</sup>.

Nuestros resultados experimentales de rayos X, espectroscopía de fluorescencia y DSC en bicapas lipídicas tienden a indicar que las moléculas de memantina se insertarían en la monocapa externa de la membrana de eritrocitos. Sin embargo, el cambio de forma a estomatocitos inducido por memantina a eritrocitos humanos podría explicarse por su ubicación en el resto interno de la membrana celular como se describió anteriormente. La explicación podría estar en las diferentes concentraciones de memantina utilizadas en este estudio. A bajas concentraciones, del orden de 1  $\mu\text{M}$  como se informa en el plasma humano cuando se aplica terapéuticamente<sup>146</sup>, memantina se ubicaría en el canal del receptor de NMDA sin afectar la forma del eritrocito. Una vez que los receptores se vuelven saturados, el exceso de moléculas de memantina (20  $\mu\text{M}$ ) interactuarían con lípidos ubicados en la monocapa interna de la membrana de eritrocitos que induce la formación de estomatocitos.

En esta tesis doctoral también se estudiaron otros dos fármacos usados en la EA: donepezilo y rivastigmina (ambos inhibidores de la AChE). Los resultados experimentales por difracción de rayos X indicaron que donepezilo alteró las disposiciones de empaquetamiento de las bicapas de DMPC y DMPE, tanto en la región hidrofóbica de las cadenas de hidrocarburo como en la zona hidrofílica (cabezas polares). La repulsión electrostática entre los grupos tri-metilo de las cabezas polares de DMPC genera un espacio entre capas que facilita la entrada de agua, lo que resulta en un aumento en la separación de las bicapas<sup>142</sup>. Esta condición facilita la entrada de donepezil en el espacio interbicapa para inducir alteraciones estructurales. Se ha establecido que el donepezilo es un fármaco con una polaridad baja, compuesto principalmente por enlaces no polares C-H y C-C, que contienen solo unos pocos átomos electronegativos<sup>147,148</sup>. La molécula posee cuatro aceptadores

y cero donantes de enlaces de hidrógeno. Sin embargo, la molécula también posee un grupo amino básico terciario (cuyo pKa de ácido conjugado es 8.82) que está protonado a pH fisiológico<sup>149</sup>. El donepezilo en el estado protonado es considerablemente más polar y mucho menos capaz de difundir a través de las membranas, como la barrera hematoencefálica<sup>150</sup>. De acuerdo con los resultados de rayos X, la región neutra de donepezilo podría interactuar con las cadenas hidrófobas de DMPC, y su grupo amino protonado cargado positivamente podría interactuar con el fosfato cargado negativamente del grupo de la cabeza polar lipídica. Juntas, estas interacciones generarían un trastorno estructural y, como consecuencia, un debilitamiento de las intensidades de las reflexiones de ángulo bajo y gran angular de DMPC. Al contrario de DMPC, los grupos polares de DMPE son menos voluminosos y, por lo tanto, tienen una carga efectiva alta que genera un sistema mucho más estable a través de enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas. Esta característica especial de DMPE conduce a una entrada más difícil de agua en la zona de intercapa y, por lo tanto, a la difusión de la droga. Sin embargo, sus intensidades de reflexión disminuyeron considerablemente de una manera dependiente de la concentración (Fig. 1C). La explicación de este efecto radica en que el grupo amino protonado de donepezilo podría interactuar con la cabeza polar de DMPE interrumpiendo el enlace de hidrógeno y la red de interacciones electrostáticas que mantienen unidas las bicapas.

Los resultados de difracción de rayos X coinciden parcialmente con los resultados obtenidos mediante espectroscopia de fluorescencia. La molécula difenilhexatrieno (DPH) exhibe una naturaleza hidrófoba, con baja solubilidad y fluorescencia en agua<sup>151</sup>. Las variaciones de la anisotropía de fluorescencia en estado estacionario de DPH en función de la concentración de donepezilo muestran que el fármaco indujo cambios en las regiones hidrófobas de la membrana. Este efecto indica un empaquetado menos restringido tanto a nivel de la cadena acilo de las membranas de IUM como en LUV de DMPC, en que la variación de la anisotropía de DPH fue similar tanto en la fase cristalina como en la fase cristalina líquida fluida.

Estos resultados se complementan parcialmente con los resultados de DSC. De acuerdo con las mediciones calorimétricas de MLV compuestas por DMPC

presentadas en la Fig. 2A y la Tabla 1 (material complementario), a medida que la concentración de donepezilo aumentó se observó un ligero cambio en la temperatura de transición principal ( $T_m$ ) hacia valores más pequeños ( $\Delta T = 1.47\text{ }^\circ\text{C}$  y  $0,65\text{ }^\circ\text{C}$  en enfriamiento y calentamiento, respectivamente), mientras que la señal de pretransición desapareció completamente. Esto último es una indicación de que el fármaco es capaz de alterar la transformación de la fase de gel laminar a gel ondulado ( $L_{\beta'}$  a  $P_{\beta'}$ ) típica en DMPC. En el caso de DMPE, las concentraciones crecientes de donepezilo hicieron que la transición fuera menos cooperativa, evidenciada por el aumento en el ancho de la transición principal y un leve desplazamiento a temperaturas más bajas de  $T_m$  ( $\Delta T = 0.1^\circ\text{C}$ , Fig. 3A, Tabla 2). Considerando todos los resultados anteriores, parece plausible que donepezilo tenga la capacidad de insertarse en la monocapa externa o interna de la membrana de eritrocitos humanos. Esta hipótesis se confirma con los resultados de microscopía electrónica de barrido (Fig. 2). En condiciones fisiológicas normales, los glóbulos rojos humanos adoptan una morfología discoide<sup>152</sup>. Cuando los eritrocitos se exponen al donepezilo, se observa que la forma discocítica normal cambia a la forma de estomatocito (cavidad profunda en la superficie celular). La razón por la cual el fármaco se ubica preferentemente en la monocapa interna (siguiendo el modelo de Sheetz et al.<sup>134</sup>) podría explicarse por su interacción con la enzima AChE, de la cual los eritrocitos poseen cantidades abundantes<sup>153-157</sup>. Esta enzima está unida a la membrana de los eritrocitos por un anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI)<sup>158</sup>. Los resultados con respecto a las variaciones en la anisotropía de fluorescencia en estado estacionario de DPH en función de la concentración de donepezilo en IUM apoyan parcialmente esta hipótesis. Hay mucha evidencia científica de que el agua penetra en las bicapas lipídicas de manera profunda incluso entre los defectos de las cadenas acílicas<sup>159</sup>. Las interfaces lípido-proteína en la membrana de los eritrocitos humanos son sitios de defectos de la membrana, donde el agua puede penetrar. Teniendo en cuenta que el donepezilo es altamente soluble en agua, es posible que estas interfaces (lípido-proteína) sean las posibles ubicaciones de esta molécula dentro de la membrana. De manera similar, todas las moléculas de DPH también deben estar muy cerca de las interfaces de lípido-proteína<sup>29</sup>. Por lo tanto, los cambios de DPH inducidos por

donepezilo en IUM deben indicar la presencia de este medicamento en las interfaces de lípido-proteína.

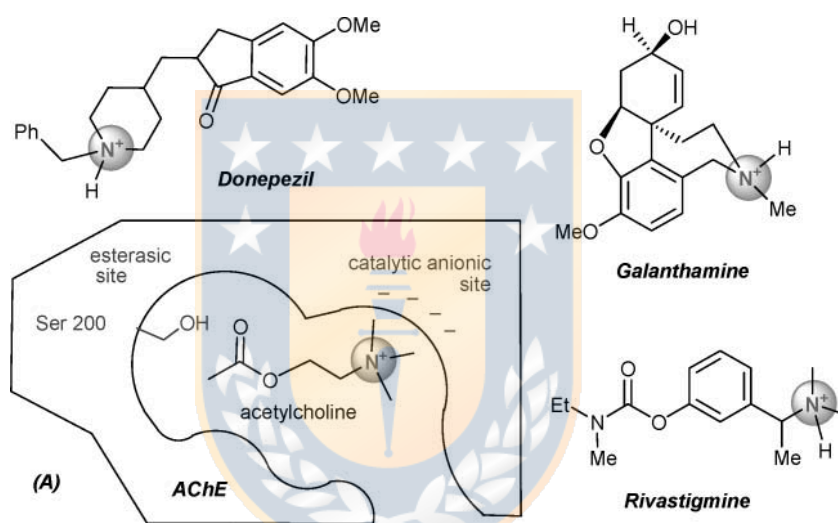
El sitio de unión del donepezilo está compuesto por los residuos aromáticos Trp84, Tyr 70, Tyr 121 y Trp 279 que interactúan electrostáticamente con el anillo de benceno del fármaco<sup>160-162</sup>. Además, se forma un fuerte puente de hidrógeno y un puente de agua entre Ser 286 y el grupo carbonilo del fármaco<sup>163</sup>. Por otro lado, el oxígeno de los dos grupos metoxi crea una interacción de tipo  $\pi$ - $\pi$  con el residuo Trp 279<sup>164</sup>.

Actualmente, no hay informes sobre el efecto que posee la inhibición de la AChE en la morfología de los eritrocitos, por lo que no está del todo claro si la inhibición de esta enzima ubicada en la membrana del eritrocito afecta las propiedades mecánicas y reológicas de estas células.

Todos estos resultados demuestran que donepezilo interactúa con la membrana de eritrocitos humanos lo cual afecta la forma de la célula, muy probablemente como consecuencia de su interacción con la enzima AChE. Estos hallazgos son de interés ya que el mecanismo de acción del donepezilo está relacionado con su capacidad para inhibir la actividad enzimática de la AChE. Además, podría contribuir a comprender el mecanismo de acción molecular de los inhibidores de la enzima AChE y, como consecuencia, el desarrollo de fármacos más eficaces para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

En cuanto a rivastigmina, el cual corresponde a un inhibidor de la AChE<sup>165</sup> su estructura tiene un carbamato como eje central y tiene una similitud con la fisostigmina<sup>166,167</sup>. Su mecanismo de acción es inhibiendo a la enzima AChE e impidiendo la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina con el consecuente aumento de la concentración de acetilcolina en el espacio sináptico<sup>168</sup>. Al igual que en el caso de donepezil, el principal blanco de acción de rivastigmina es la enzima AChE la cual puede encontrarse tanto en la membrana de las neuronas, músculo y eritrocitos humanos<sup>82,156,157,169-171</sup>. Es por esta razón que fue de interés examinar los efectos de esta droga sobre modelos moleculares sintéticos de membrana compuestos por fosfolípidos representativos (DMPC y DMPE) y eritrocitos humanos los cuales corresponden a un modelo natural de membrana celular ampliamente utilizado para

ensayos de screening<sup>172,173</sup> y estudios de interacción con drogas<sup>174-177</sup>. Si embargo, es necesario aclarar, que estos ensayos corresponden a estudios *in vitro*, en los cuales se han utilizado concentraciones mayores a las que se alcanzan en condiciones terapéuticas con el fin de observar claramente los efectos de las moléculas sobre estos modelos. Los resultados de difracción de rayos X muestran que rivastigmina tuvo un efecto tanto sobre la estructura de DMPC como DMPE, con diferente intensidad. Al igual que memantina y donepezilo, rivastigmina posee un grupo amino el cual se encuentra protonado a pH 7<sup>178</sup> (Fig. 68). Este grupo amino, presente en estos tres fármacos, tiene una importancia relevante en la inhibición de la enzima AChE.



**Figura 68: Inhibidores de la AChE utilizados clínicamente para el tratamiento sintomático de la EA. (A) Representación esquemática del sitio activo de AChE que muestra los sitios "aniónicos" y "esterasicos" de la enzima. (Tomado de Bohn, P. et al.<sup>178</sup>)**

A pH fisiológico, la protonación de esta amina da como resultado la formación de una carga positiva que se une al sitio aniónico catalítico de la enzima (Fig. 68). Esta característica también sería la responsable de la interacción de rivastigmina con ambos fosfolípidos. Los resultados de los experimentos de espectroscopía de fluorescencia en LUV de DMPC y IUM a 37 °C indicaron que rivastigmina indujo un leve incremento de la polarización generalizada (GP) de lauridan. Un aumento en el valor de GP representa una disminución en la polaridad de la bicapa y generalmente corresponde a un aumento en el orden y la microviscosidad<sup>179-182</sup>, lo que probablemente se deba a la ubicación de rivastigmina en la zona de las cabezas

polares. Esto produciría un desplazamiento de las moléculas de agua o una menor movilidad de la sonda fluorescente.

Por otro lado, los datos obtenidos mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de eritrocitos incubados con rivastigmina muestran que indujo la formación de estomatocitos de manera concentración-dependiente. Si los resultados de rayos X y SEM se examinan desde la perspectiva de la hipótesis del par bicapa de Sheetz & Sanger<sup>134</sup> se puede verificar que existe concordancia entre estos resultados. Esta hipótesis indica que los estomatocitos podrían formarse cuando las moléculas de la droga se insertan en la monocapa interna de las células, mientras que los equinocitos (células con forma espiculada) se formarían cuando la molécula se inserta en la monocapa externa. La interacción preferencial de rivastigmina con DMPE por sobre DMPC llevaría a que esta molécula se sitúe mayoritariamente en la monocapa interna de la membrana de los eritrocitos humanos alterando su morfología normal e induciendo la formación estomatocitos.

Donepezil y rivastigmina comparten el mismo sitio de acción: la enzima acetilcolinesterasa. Por su parte, el sitio de unión de rivastigmina ha sido determinado mediante diferentes técnicas, principalmente cristalografía de rayos X<sup>183-188</sup>. Rivastigmina se metaboliza rápidamente en dos componentes principales (carbamilo y NAP) que son inhibidores potentes de la acetilcolina<sup>189-191</sup>. Estos componentes interactúan principalmente con los residuos Gly 117, Gly 118, Gly 119, Ala 201, Trp 233, Phe 290, Trp 84, Phe 330, His 440 y Phe 288 enlazándose muy estrechamente mediante interacciones  $\pi$ - $\pi$  y enlaces de hidrógeno<sup>183</sup>. No se ha determinado con precisión si la activación de la enzima acetilcolinesterasa eritrocitaria tiene efectos en la morfología de las células. Según los resultados experimentales obtenidos, bajas concentraciones de la droga inducirían la inactivación de la enzima AChE por parte de rivastigmina y su unión a glicosilfosfatidilinositol (GPI) podría inducir este tipo de morfología en glóbulos rojos.

En conclusión, el estudio de la interacción de moléculas terapéuticas utilizadas en la EA con membranas celulares y modelos moleculares entrega una orientación acerca de la afinidad de estas drogas hacia clases de fosfolípidos, presentes en las

membranas celulares humanas. Todos los resultados obtenidos podrían ser de utilidad para orientar el desarrollo de nuevas drogas más eficaces y con mayor afinidad a los sitios de acción. Actualmente aún está abierta la pregunta acerca de cual es la causa de la poca eficacia de estos medicamentos en la EA. Las futuras investigaciones referentes a la interacción droga-membrana podrían generar nuevas ideas para mejorar químicamente los tratamientos existentes y así detener (o desacelerar) la evolución de esta enfermedad.

## 8.2 Péptido A $\beta$ e híbridos de huprina.

El péptido beta-amiloide (A $\beta$ ) se ha asociado con daño a la membrana celular, neuroinflamación, muerte neuronal, deterioro sináptico (en este campo destacan los trabajos de Aguayo et al.<sup>48</sup>, Sepúlveda et. al<sup>49,192</sup>, Peters et al.<sup>43,45-47,54</sup> y Fernandez-Perez et al.<sup>44,193,194</sup>) y disminución de la memoria. Existe una gran cantidad de estudios y bibliografía referente al estudio estructural de A $\beta$ , específicamente del péptido A $\beta$ (1-40) y A $\beta$  (1-42). Este péptido sigue siendo un foco de atención principal en el estudio de la etiología de la EA y su evolución<sup>195,196</sup>. Con el fin de frenar el desarrollo de placas seniles y de evitar la agregación del péptido A $\beta$  se ha desarrollado una nueva familia de híbridos reína-huprina los cuales exhiben potentes efectos inhibidores contra la actividad de acetilcolinesterasa humana (AChE), butirilcolinesterasa (BuChE) y también sobre la agregación *in vitro* de péptidos A $\beta$  y proteína tau<sup>85-87</sup>. Frente a estos datos pareció interesante ahondar en esta familia de híbridos y verificar su posible aplicación en la protección de las membranas celulares. Para conocer en detalle los mecanismos moleculares de la interacción entre los híbridos de huprina y membranas celulares y estudiar el posible efecto protector de éstos frente al efecto tóxico del péptido A $\beta$  se utilizaron eritrocitos humanos y modelos moleculares de su membrana consistente en los fosfolípidos dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE), clases de fosfolípidos representativos situados en la monocapas externa e interna de la membrana eritrocitaria, respectivamente. Los efectos de estas moléculas se estudiaron, de manera individual, mediante difracción de rayos X, espectroscopía de



fluorescencia y DSC en modelos de membrana compuestos por DMPC y DMPE. Mediante el estudio por difracción de rayos X se ha reportado que los péptidos A $\beta$ (1-40) y A $\beta$  (1-42) producen alteraciones estructurales en multibicapas de DMPC y un muy moderado efecto sobre DMPE<sup>197,198</sup>. Estos resultados concuerdan plenamente con los obtenidos en esta tesis. En efecto, las estructuras de DMPC y DMPE se ven alteradas por la acción de ambos péptidos. En el caso de DMPC, a medida que aumenta la concentración del péptido A $\beta$ , se observa un desorden en la totalidad de la bicapa pero especialmente en la zona de las colas hidrofóbicas. El efecto es mucho más pronunciado en el caso de A $\beta$  (1-42), el cual es considerablemente más hidrofóbico que el péptido A $\beta$  (1-40). Las interacciones de DMPE con los péptidos fueron, en general, muy débiles, y en ambos casos no hubo un efecto marcado sobre a estructura de los fosfolípidos.

Por otro lado, los híbridos (H1, H2 y H3) presentaron diferente capacidad para alterar las intensidades de reflexión tanto en la zona SA y WA. De los resultados de difracción de rayos X se aprecia que H3 fue capaz de disminuir la intensidad de difracción de manera concentración-dependiente y producir perturbaciones estructurales tanto en DMPC como en DMPE. Por el contrario, H1 tuvo un efecto moderado sobre la estructura de DMPC. A la máxima concentración estudiada de este híbrido (50  $\mu$ M) se observó solamente una reducción en la intensidad de reflexión de un 8.2% en la zona de las colas hidrofóbicas (WA). Sin embargo, a esa misma concentración su efecto fue mucho mayor en DMPE, disminuyendo la intensidad de reflexión en un 41.3% y 43.6% en las zonas SA y WA respectivamente. Los resultados de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de los tres híbridos muestran la débil interacción de estas moléculas con los modelos de membrana utilizados en esta técnica. En general, no se observaron grandes cambios en el comportamiento termotrópico de los MLV (de DMPC y de DMPE) en contacto con soluciones de híbridos en diferentes concentraciones. Mediante las pruebas de efecto protector de los híbridos frente al efecto de los péptidos A $\beta$  fue posible determinar un proceso de recuperación de las intensidades de reflexión mediante la pre-incubación de los híbridos, en las que los tres compuestos estudiados (H1, H2 y H3) muestran este efecto en diferente grado. Cuando se pre-incubaban los fosfolípidos con los híbridos el

efecto perturbador del péptido A $\beta$  ya no es tan marcado. Este fenómeno ocurre tanto con el péptido A $\beta$ (1-40) como con A $\beta$  (1-42). El mismo fenómeno se aprecia mediante los estudios de SEM, más específicamente en el caso del péptido A $\beta$  (1-42) el cual a una concentración de 20  $\mu$ M produce un marcado efecto sobre la morfología de los eritrocitos humanos, produciendo lisis y destrucción celular.

La pre-incubación de las células con los híbridos generó una recuperación (a medida que se aumentó la concentración del híbrido) de la morfología normal discocítica en presencia del péptido A $\beta$  (1-42). En el caso del efecto protector de los híbridos frente al péptido A $\beta$  (1-40) la tendencia fue menos notoria e incluso predominó el efecto del híbrido (en el caso del H3) por sobre el efecto del péptido A $\beta$  (1-40).

Estos resultados son muy interesantes desde el punto de vista biofísico. Es necesario ahondar en el fundamento de este proceso de recuperación. Sin embargo, no es fácil conocer el mecanismo de protección que poseen los híbridos en este medio, ya que existen muchos posibles mecanismos que podrían ocurrir:

- (a) Las moléculas de híbrido se insertan en la membrana de los eritrocitos y actúan protegiendo la membrana desde esa zona.
- (b) Las moléculas de híbrido actúan extracelularmente, inhibiendo la acción del péptido antes de que este interactúe con la membrana del glóbulo rojo.

A pesar de que estos experimentos se realizaron *in vitro* es posible extrapolarlos a sistemas *in vivo* que permitan mejorar el diseño de drogas y comprender más cabalmente los mecanismos moleculares de la enfermedad de Alzheimer.

## 9. CONCLUSIONES GENERALES.

- I. Mediante la técnica de difracción de rayos X, se determinaron los efectos de los híbridos de huprina y las drogas memantina, donepezilo y rivastigmina sobre la estructura de los modelos moleculares de membrana constituidos por multibicapas lipídicas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE). Estas moléculas tienen la capacidad de alterar (en diferente grado) el empaquetamiento estructural de los fosfolípidos mediante su acción en diferentes zonas de su estructura.
- II. Los resultados de difracción de rayos X referentes al efecto protector de los híbridos arrojaron que la preincubación de los lípidos con híbridos de huprina induce una recuperación de las intensidades de las reflexiones tanto de las cabezas polares y cadenas acílicas cuando se someten al ataque de los péptidos amiloides A $\beta$  (1-40) y A $\beta$ (1-42).
- III. Los resultados de espectroscopía de fluorescencia evidenciaron los efectos de memantina, donepezilo, rivastigmina y los péptidos amiloides sobre la polarización generalizada de lauridán y anisotropía de DPH en vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC y en membranas no selladas de eritrocitos humanos (IUM). En general, ambas sondas detectaron las perturbaciones estructurales inducidas por las moléculas en estudio en diferentes zonas del fosfolípido (cadenas acílicas y cabezas polares).
- IV. El comportamiento termotrópico de vesículas multilamelares (MLV) constituidos por multibicapas lipídicas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE) se vio alterado principalmente por las drogas terapéuticas, en especial por memantina.

Esta droga fue capaz de inducir cambios en las transiciones de fase de DMPC.

- V. Los análisis de la observación de eritrocitos humanos mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) en presencia de las moléculas en estudio indicaron que la totalidad de las moléculas inducen cambios morfológicos en los glóbulos rojos.
- VI. Mediante microscopía electrónica de barrido se observó que los algunos híbridos de huprina (H1 y H2 principalmente) tienen la capacidad de proteger a los glóbulos rojos del efecto hemolítico de los péptidos  $A\beta$  (1-40) y  $A\beta$ (1-42) e inducen una recuperación de su morfología discocítica.



## 10. REFERENCIAS.

1. Darwin, C. *On the origin of species by means of natural selection, or, The preservation of favoured races in the struggle for life* /. (London :John Murray, 1859).
2. Selkoe, D. J. Alzheimer's disease: A central role for amyloid. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **53**, 438–447 (1994).
3. Bignami, A., Selkoe, D. J. & Dahl, D. Amyloid-like (Congophilic) neurofibrillary tangles do not react with neurofilament antisera in Alzheimer's cerebral cortex. *Acta Neuropathol.* **64**, 243–250 (1984).
4. Gravina, S. A. *et al.* Amyloid  $\beta$  protein (A $\beta$ ) in Alzheimer's disease brain. *J. Biol. Chem.* **270**, 7013–7016 (1995).
5. Jellinger, K. A. Structural basis of dementia in neurodegenerative disorders. *J. Neural Transm. Suppl.* **47**, 1–29 (1996).
6. Xiaoning, B. Alzheimer Disease: Update on Basic Mechanisms. *JAOA* **110**, 15–30 (2010).
7. Carmona, S., Hardy, J. & Guerreiro, R. The genetic landscape of Alzheimer disease. in *Handbook of Clinical Neurology* **148**, 395–408 (2018).
8. Makin, O. S., Sikorski, P. & Serpell, L. C. Diffraction to study protein and peptide assemblies. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10**, 417–422 (2006).
9. Welander, H. *et al.* A $\beta$ 43 is more frequent than A $\beta$ 40 in amyloid plaque cores from Alzheimer disease brains. *J. Neurochem.* **110**, 697–706 (2009).
10. Gertsik, N., Chiu, D. & Li, Y. M. Complex regulation of  $\gamma$ -secretase: From obligatory to modulatory subunits. *Frontiers in Aging Neuroscience* **7**, 342 (2015).
11. Hussain, I. *et al.* The role of  $\gamma$ -secretase activating protein (GSAP) and imatinib in the regulation of  $\gamma$ -secretase activity and amyloid- $\beta$  generation. *J. Biol. Chem.* **288**, 2521–2531 (2013).
12. Xia, W. Amyloid metabolism and secretases in Alzheimer's disease. *Current neurology and neuroscience reports* **1**, 422–427 (2001).
13. Vassar, R. *et al.*  $\beta$ -Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor

- protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science (80-. )*. **286**, 735–741 (1999).
14. Coburger, I., Hoefgen, S. & Than, M. E. The structural biology of the amyloid precursor protein APP - A complex puzzle reveals its multi-domain architecture. *Biological Chemistry* **395**, 485–498 (2014).
  15. Tyran, S. H. *et al.* Amyloid precursor protein (APP) regulates synaptic structure and function. *Mol. Cell. Neurosci.* **51**, 43–52 (2012).
  16. Reinhard, C., Hébert, S. S. & De Strooper, B. The amyloid-?? precursor protein: Integrating structure with biological function. *EMBO Journal* **24**, 3996–4006 (2005).
  17. Dulubova, I., Ho, A., Huryeva, I., Südhof, T. C. & Rizo, J. Three-dimensional structure of an independently folded extracellular domain of human amyloid- $\beta$  precursor protein. *Biochemistry* **43**, 9583–9588 (2004).
  18. Qiu, T., Liu, Q., Chen, Y. X., Zhao, Y. F. & Li, Y. M. A $\beta$ 42 and A $\beta$ 40: similarities and differences. *J. Pept. Sci.* **21**, 522–529 (2015).
  19. Schmidt, M. *et al.* Comparison of Alzheimer A (1-40) and A (1-42) amyloid fibrils reveals similar protofilament structures. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 19813–19818 (2009).
  20. Gu, L. & Guo, Z. Alzheimer's A $\beta$ 42 and A $\beta$ 40 peptides form interlaced amyloid fibrils. *J. Neurochem.* **126**, 305–311 (2013).
  21. Iwatsubo, T. *et al.* Visualization of A $\beta$ 42(43) and A $\beta$ 40 in senile plaques with end-specific A $\beta$  monoclonals: Evidence that an initially deposited species is A $\beta$ 42(43). *Neuron* **13**, 45–53 (1994).
  22. Zheng, L. *et al.* Intracellular distribution of amyloid beta peptide and its relationship to the lysosomal system. *Transl. Neurodegener.* **1**, (2012).
  23. Liu, R. Q. *et al.* Membrane localization of  $\beta$ -amyloid 1-42 in lysosomes: A possible mechanism for lysosome labilization. *J. Biol. Chem.* **285**, 19986–19996 (2010).
  24. Mazumdar, M. *et al.* Prenatal lead levels, plasma amyloid  $\beta$  levels, and gene expression in young adulthood. *Environ. Health Perspect.* **120**, 702–707 (2012).

25. Ibrahim-Verbaas, C. A. *et al.* Linkage analysis for plasma amyloid beta levels in persons with hypertension implicates A $\beta$ -40 levels to presenilin 2. *Hum. Genet.* **131**, 1869–1876 (2012).
26. Janelidze, S. *et al.* Plasma  $\beta$ -amyloid in Alzheimer's disease and vascular disease. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
27. Song, F. *et al.* Meta-analysis of plasma amyloid- $\beta$  levels in alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* **26**, 365–375 (2011).
28. Sengupta, U., Nilson, A. N. & Kaye, R. The Role of Amyloid- $\beta$  Oligomers in Toxicity, Propagation, and Immunotherapy. *EBioMedicine* **6**, 42–49 (2016).
29. Zhao, H. & Lappalainen, P. A simple guide to biochemical approaches for analyzing protein-lipid interactions. *Mol. Biol. Cell* **23**, 2823–2830 (2012).
30. Kametani, F. & Hasegawa, M. Reconsideration of amyloid hypothesis and tau hypothesis in Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience* **12**, (2018).
31. Hardy, J. & Selkoe, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**, 353–356 (2002).
32. Hardy, J. A. & Higgins, G. A. Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. *Science* **256**, 184–185 (1992).
33. Korczyn, A. D. The amyloid cascade hypothesis. *Alzheimer's Dement.* **4**, 176–178 (2008).
34. Bieler, S. & Soto, C.  $\beta$ -sheet breakers for Alzheimer's disease therapy. *Curr Drug Targets* **5**, 553–558 (2004).
35. Gremer, L. *et al.* Fibril structure of amyloid- $\beta$ (1–42) by cryo-electron microscopy. *Science (80-. )*. **358**, 116–119 (2017).
36. Li, Y. *et al.* Amyloid fibril structure of  $\alpha$ -synuclein determined by cryo-electron microscopy. *Cell Res.* **28**, 897–903 (2018).
37. Fitzpatrick, A. W. P. *et al.* Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease. *Nature* **547**, 185–190 (2017).
38. Morimoto, A. *et al.* Analysis of the secondary structure of  $\beta$ -amyloid (A $\beta$ 42) fibrils by systematic proline replacement. *J. Biol. Chem.* **279**, 52781–52788 (2004).

39. McLaurin, J., Yang, D. S., Yip, C. M. & Fraser, P. E. Review: Modulating factors in amyloid- $\beta$  fibril formation. *Journal of Structural Biology* **130**, 259–270 (2000).
40. Walsh, D. M., Lomakin, A., Benedek, G. B., Condron, M. M. & Teplow, D. B. Amyloid  $\beta$ -protein fibrillogenesis: Detection of a protofibrillar intermediate. *J. Biol. Chem.* **272**, 22364–22372 (1997).
41. Novo, M., Freire, S. & Al-Soufi, W. Critical aggregation concentration for the formation of early Amyloid- $\beta$  (1-42) oligomers. *Sci. Rep.* **8**, (2018).
42. Castello, F. *et al.* Two-Step Amyloid Aggregation: Sequential Lag Phase Intermediates. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
43. Peters, C. *et al.* Inhibition of amyloid beta-induced synaptotoxicity by a pentapeptide derived from the glycine zipper region of the neurotoxic peptide. *Neurobiol. Aging* **34**, 2805–2814 (2013).
44. Fernández-pérez, E. J., Peters, C. & Aguayo, L. G. Membrane Damage Induced by Amyloid Beta and a Potential Link with Neuro- inflammation. *Curr. Pharm. Des.* **22**, 1295–1304 (2016).
45. Peters, C., Espinoza, M. P., Gallegos, S., Opazo, C. & Aguayo, L. G. Alzheimer's A $\beta$  interacts with cellular prion protein inducing neuronal membrane damage and synaptotoxicity. *Neurobiol. Aging* **36**, 1369–1377 (2015).
46. Peters, C., Sepúlveda, F. J., Fernández-Pérez, E. J., Peoples, R. W. & Aguayo, L. G. The Level of NMDA Receptor in the Membrane Modulates Amyloid- $\beta$  Association and Perforation. *J. Alzheimer's Dis.* **53**, 197–207 (2016).
47. Peters, C., Bascuñán, D., Opazo, C. & Aguayo, L. G. Differential Membrane Toxicity of amyloid- $\beta$  Fragments by Pore Forming Mechanisms. *J. Alzheimer's Dis.* **51**, 689–699 (2016).
48. Aguayo, L. G., Parodi, J., Sepúlveda, F. J. & Opazo, C. Pore-forming neurotoxin-like mechanism for A $\beta$  oligomer-induced synaptic failure. in *Current Hypotheses and Research Milestones in Alzheimer's Disease* 13–21 (2009). doi:10.1007/978-0-387-87995-6\_2
49. Sepúlveda, F. J. *et al.* Nature of the neurotoxic membrane actions of amyloid- $\beta$



- on hippocampal neurons in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **35**, 472–481 (2014).
50. Müller, W. E., Koch, S., Eckert, A., Hartmann, H. & Scheuer, K.  $\beta$ -amyloid peptide decreases membrane fluidity. *Brain Res.* **674**, 133–136 (1995).
  51. Müller, W. E. *et al.* Effects of  $\beta$ -amyloid peptides on the fluidity of membranes from frontal and parietal lobes of human brain. High potencies of A $\beta$ 1-42 and A $\beta$ 1-43. *Amyloid* **5**, 10–15 (1998).
  52. Yang, X., Sun, G. Y., Eckert, G. P. & Lee, J. C. M. Cellular Membrane Fluidity in Amyloid Precursor Protein Processing. *Molecular Neurobiology* **50**, 119–129 (2014).
  53. Retz, W., Gsell, W., Münch, G., Rösler, M. & Riederer, P. Free radicals in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm. Suppl.* **54**, 221–36 (1998).
  54. Peters, C., Fernandez-Perez, E., Fuentealba, J. & Aguayo, L. G. *Neurotoxicity of  $a\beta$  explained by its association to plasma membranes. Synaptic Fundamentals of Memory Performance* (2015). doi:10.1155/2018/2179571
  55. Notarachille, G., Gallucci, E., Micelli, S. & Meleleo, D. Effect of cadmium ions on amyloid beta peptide 1-42 channel activity. *J. Environ. Chem. Ecotoxicol.* **3**, 309–319 (2011).
  56. Kagan, B. L. Membrane pores in the pathogenesis of neurodegenerative disease. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **107**, 295–325 (2012).
  57. Kagan, B. L., Azimov, R. & Azimov, R. Channels Formed in Planar Lipid Bilayers by Amyloid Peptides. *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes* **1**, 207–220 (2005).
  58. Oliveira, T. G. & Di Paolo, G. Phospholipase D in brain function and Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1801**, 799–805 (2010).
  59. Lehtonen, J. Y. A., Holopainen, J. M. & Kinnunen, P. K. J. Activation of phospholipase A2 by amyloid  $\beta$ -peptides in vitro. *Biochemistry* **35**, 9407–9414 (1996).
  60. Kremer, J. J., Pallitto, M. M., Sklansky, D. J. & Murphy, R. M. Correlation of  $\beta$ -amyloid aggregate size and hydrophobicity with decreased bilayer fluidity of

- model membranes. *Biochemistry* **39**, 10309–10318 (2000).
61. Kremer, J. J., Sklansky, D. J. & Murphy, R. M. Profile of changes in lipid bilayer structure caused by A $\beta$ -amyloid peptide. *Biochemistry* **40**, 8563–8571 (2001).
  62. Hensley, K. *et al.* A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 3270–3274 (1994).
  63. Dikalov, S. I., Vitek, M. P., Maples, K. R. & Mason, R. P. Amyloid  $\beta$  peptides do not form peptide-derived free radicals spontaneously, but can enhance metal-catalyzed oxidation of hydroxylamines to nitroxides. *J. Biol. Chem.* **274**, 9392–9399 (1999).
  64. Cohen, G. The fenton reaction. in *Handbook Methods for Oxygen Radical Research* 55–64 (2018). doi:10.1201/9781351072922
  65. Luehrs, D. C., Roher, A. E. & Stephen W. Wright. Demonstration of the Fenton Reaction. *J. Chem. Educ.* **84**, 1290 (2007).
  66. Prousek, J. Fenton Reaction after a century. *Chem. List.* **89**, 11–21 (1995).
  67. Rolston, R. K. *et al.* Iron A pathological mediator of Alzheimer disease? *Agro Food Ind. Hi. Tech.* **19**, 33–36 (2008).
  68. Wood, H. Alzheimer disease: Iron—the missing link between ApoE and Alzheimer disease? *Nat. Rev. Neurol.* **11**, 369–369 (2015).
  69. Perry, G., Cash, A. D. & Smith, M. A. Alzheimer disease and oxidative stress. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2002**, 120–123 (2002).
  70. Smith, M. A., Harris, P. L. R., Sayre, L. M. & Perry, G. Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 9866–9868 (1997).
  71. Smith, M. A. *et al.* Abnormal localization of iron regulatory protein in Alzheimer's disease. *Brain Res.* **788**, 232–236 (1998).
  72. Smith, M. A. *et al.* Increased iron and free radical generation in preclinical Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *J. Alzheimer's Dis.* **19**, 353–372 (2010).
  73. Nasica-Labouze, J. *et al.* Amyloid  $\beta$  Protein and Alzheimer's Disease: When

- Computer Simulations Complement Experimental Studies. *Chemical Reviews* **115**, 3518–3563 (2015).
74. 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* **16**, 881–891 (1996).
75. Inestrosa, N. C., Alvarez, A., Dinamarca, M. C., Pérez-acle, T. & Colombres, M. Acetylcholinesterase-Amyloid- $\beta$ -peptide Interaction: Effect of Congo Red and the Role of the Wnt Pathway. *Curr. Alzheimer Res.* **2**, 301–306 (2005).
76. Carvajal, F. J. & Inestrosa, N. C. Interactions of AChE with A $\beta$  Aggregates in Alzheimer's Brain: Therapeutic Relevance of IDN 5706. *Front. Mol. Neurosci.* **4**, (2011).
77. Perry, E. K. THE CHOLINERGIC HYPOTHESIS—TEN YEARS ON. *Br. Med. Bull.* **42**, 63–69 (1986).
78. Davies, P. Challenging the cholinergic hypothesis in Alzheimer disease. *Journal of the American Medical Association* **281**, 1433–1434 (1999).
79. Osborn, G. G. & Saunders, A. V. Current treatments for patients with Alzheimer disease. *J. Am. Osteopath. Assoc.* **110**, S16-26 (2010).
80. Downey, D. Pharmacologic Management of Alzheimer Disease. *J. Neurosci. Nurs.* **40**, 55–59 (2008).
81. Waldemar, G. 100 years with Alzheimer disease. *Ugeskrift For Laeger* (2006).
82. Gupta, V. K., Pal, R., Siddiqi, N. J. & Sharma, B. Acetylcholinesterase from human erythrocytes as a surrogate biomarker of lead induced neurotoxicity. *Enzyme Res.* **2015**, (2015).
83. Summers, W. K., Koehler, A. L., Marsh, G. M., Tachiki, K. & Kling, A. LONG-TERM HEPATOTOXICITY OF TACRINE. *The Lancet* **333**, 729 (1989).
84. Blackard, W. G., Sood, G. K., Ralph Crowe, D. & Fallon, M. B. Tacrine a cause of fatal hepatotoxicity? *J. Clin. Gastroenterol.* **26**, 57–59 (1998).
85. Pérez-Areales, F. J. *et al.* Design, synthesis and multitarget biological profiling of second-generation anti-Alzheimer rhin-huprine hybrids. *Future Med. Chem.* **9**, 965–981 (2017).

86. Serrano, F. G. *et al.* Rhein-Huprine Derivatives Reduce Cognitive Impairment, Synaptic Failure and Amyloid Pathology in A $\beta$ PPswe/PS-1 Mice of Different Ages. *Curr. Alzheimer Res.* **13**, 1017–29 (2016).
87. Viayna, E. *et al.* Synthesis and multitarget biological profiling of a novel family of rehin derivatives as disease-modifying anti-Alzheimer agents. *J. Med. Chem.* **57**, 2549–2567 (2014).
88. Román Mejías, S. Caracterización colinérgica de la (+)-huprina X, un anticolinesterásico híbrido tacrina-huperzina A, con potencial interés para el tratamiento sintomatológico de la enfermedad de Alzheimer. (2008).
89. Relat, J. *et al.* Neuroprotective effects of the multitarget agent AVCRI104P3 in brain of middle-aged mice. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
90. Chan, Y. H. M. & Boxer, S. G. Model membrane systems and their applications. *Current Opinion in Chemical Biology* **11**, 581–587 (2007).
91. Papahadjopoulos, D. & Kimelberg, H. K. Phospholipid vesicles (liposomes) as models for biological membranes: Their properties and interactions with cholesterol and proteins. *Progress in Surface Science* **4**, (1974).
92. Regina Bailey. Cell Membrane Function and Structure. *thoughtco.com* 1 (2017). doi:10.1111/acer.13391
93. Cooper, G. & Sunderland, M. Structure of the Plasma Membrane. *Cell A Mol. Approach* 1–6 (2000). doi:10.1007/978-1-4615-6484-3\_4
94. Gorter, E. & Grendel, F. On bimolecular layers of lipid on the chromocytes of the blood. *J. Exp. Med.* **41**, 439–443 (1925).
95. Danielli, J. F. & Davson, H. A contribution to the theory of permeability of thin films. *J. Cell. Comp. Physiol.* **5**, 495–508 (1935).
96. Singer, S. J. & Nicolson, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science (80-. )*. **175**, 720–731 (1972).
97. Lipowsky, R. & Sackmann, E. Structure and dynamics of membranes: Generic and specific interactions. *Handbook of biological physics* **1B**, 901 (1995).
98. Copyright © 2019 - TutorVista.com. Salient Features of Plasma Membrane. (2019). Available at: <https://www.tutorvista.com/biology/salient-features-of-plasma-membrane>. (Accessed: 10th December 2018)

99. Garavito, Rm. & Karlin, A. Membrane proteins. *Current Opinion in Structural Biology* **5**, 489–490 (1995).
100. Guidotti, G. Membrane Proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **41**, 731–752 (1972).
101. Kühlbrandt, W. & Goaux, E. Membrane proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 445–447 (1999).
102. Flores, D. L. Movilidad de los componentes de la membrana. Available at: <http://lisdiane.blogspot.com/2010/11/v-movilidad-de-los-componentes-de-la.html>. (Accessed: 10th December 2018)
103. B, Alberts, Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and P, W. *Molecular biology of cell 4th Edition. Biochemistry and Molecular Biology Education* **31**, (2003).
104. Gamboa Gaitán, M. Á. Bicapa lipídica. Membrana plasmática. Available at: [http://168.176.239.58/cursos/ciencias/2015877/html/conten\\_uni\\_2\\_2\\_5.html](http://168.176.239.58/cursos/ciencias/2015877/html/conten_uni_2_2_5.html). (Accessed: 10th December 2018)
105. Berg, J., Tymoczko, J. & Stryer, L. *Biochemistry. 5th Edition, New York: W H Freeman. New York: W H Freeman* (2002).
106. Merino Montero, S., Montero Barrientos, M. T., Hernández Borrell, J. & Universitat de Barcelona. Departament de Físicoquímica. *Aplicación de técnicas de fluorescencia y microscopía de fuerza atómica al estudio de la interacción lípido-proteína en modelos de membrana. TDX (Tesis Doctorals en Xarxa)* (Universitat de Barcelona, 2005).
107. Zambrano Lobos, P. A. *Estudio de la interacción del fármaco propranolol con membranas celulares in vitro y modelos moleculares.* (Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción., 2013).
108. Elgsaeter, A., Stokke, B. T., Mikkelsen, A. & Branton, D. The molecular basis of erythrocyte shape. *Science (80-. )*. **234**, 1217–1223 (1986).
109. Suwalsky, M. *et al.* Biophysical Chemistry Interactions of the antiviral and antiparkinson agent amantadine with lipid membranes and human erythrocytes. *Biophys. Chem.* **202**, 13–20 (2015).
110. Suwalsky, M., Manrique, M., Villena, F. & Sotomayor, C. P. Structural effects in vitro of the anti-inflammatory drug diclofenac on human erythrocytes and

- molecular models of cell membranes. *Biophys. Chem.* **141**, 34–40 (2009).
111. Jemiola-Rzeminska, M., Rivera, C., Suwalsky, M. & Strzalka, K. Interaction of arsenic compounds with model phospholipid membranes. *Thermochim. Acta* **458**, 132–137 (2007).
112. Zambrano, P., Suwalsky, M., Villena, F., Jemiola-Rzeminska, M. & Strzalka, K. In vitro effects of the anti-Alzheimer drug memantine on the human erythrocyte membrane and molecular models. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **483**, 528–533 (2017).
113. Suwalsky, M. *et al.* Morphological Effects Induced In Vitro by Propranolol on Human Erythrocytes. *J. Membr. Biol.* **248**, 683–693 (2015).
114. Manrique-Moreno, M., Suwalsky, M., Villena, F. & Garidel, P. Effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drug naproxen on human erythrocytes and on cell membrane molecular models. *Biophys. Chem.* **147**, 53–58 (2010).
115. Suwalsky, M. *et al.* Effects of phenylpropanolamine (PPA) on in vitro human erythrocyte membranes and molecular models. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **406**, 320–325 (2011).
116. Dodge, J. T., Mitchell, C. & Hanahan, D. J. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **100**, 119–130 (1963).
117. Suwalsky, M., Mennickent, S., Villena, F. & Sotomayor, C. P. Phospholipids bilayers as molecular models for drug-membrane interactions. the case of the antiepileptics phenytoin and carbamazepine. in *Macromolecular Symposia* **269**, 119–127 (2008).
118. Kusube, M., Matsuki, H. & Kaneshina, S. Thermotropic and barotropic phase transitions of N-methylated dipalmitoylphosphatidylethanolamine bilayers. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1668**, 25–32 (2005).
119. Pentak, D., Sułkowski, W. W. & Sułkowska, A. Calorimetric and EPR studies of the thermotropic phase behavior of phospholipid membranes. *J. Therm. Anal. Calorim.* **93**, 471–477 (2008).
120. Tse, W. T. & Lux, S. E. Red blood cell membrane disorders. *British Journal of Haematology* **104**, 2–13 (1999).

121. Iolascon, A., Perrotta, S. & Stewart, G. W. Red blood cell membrane defects. *Reviews in Clinical and Experimental Hematology* **7**, 22–56 (2003).
122. Lim H. W., G., Wortis, M. & Mukhopadhyay, R. Stomatocyte-discocyte-echinocyte sequence of the human red blood cell: Evidence for the bilayer-couple hypothesis from membrane mechanics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 16766–16769 (2002).
123. Reinhart, W. H. & Chien, S. Echinocyte-stomatocyte transformation and shape control of human red blood cells: Morphological aspects. *Am. J. Hematol.* **24**, 1–14 (1987).
124. Veitch, D. P. *et al.* Understanding disease progression and improving Alzheimer's disease clinical trials: Recent highlights from the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. *Alzheimer's Dement.* (2018).  
doi:10.1016/j.jalz.2018.08.005
125. Jerath, R. & Beveridge, C. Top Mysteries of the Mind: Insights From the Default Space Model of Consciousness. *Front. Hum. Neurosci.* **12**, (2018).
126. Alzheimer, A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Zeitschrift für Psychiatr. und Psych. Medizin* **64**, 146–8 (1907).
127. Karakas, E. & Furukawa, H. Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel. *Science (80-. )*. **344**, 992–997 (2014).
128. Lipton, S. A. Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: Memantine and beyond. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 160–170 (2006).
129. Kashiwagi, K. Channel Blockers Acting at N-Methyl-D-aspartate Receptors: Differential Effects of Mutations in the Vestibule and Ion Channel Pore. *Mol. Pharmacol.* **61**, 533–545 (2002).
130. Tai, K. K., Blondelle, S. E., Ostresh, J. M., Houghten, R. A. & Montal, M. An N-methyl-D-aspartate receptor channel blocker with neuroprotective activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 3519–24 (2001).
131. Limapichat, W., Yu, W. Y., Branigan, E., Lester, H. A. & Dougherty, D. A. Key binding interactions for memantine in the NMDA receptor. *ACS Chem. Neurosci.* **4**, 255–260 (2013).
132. Reinhart, W. H., Geissmann-Ott, C. & Bogdanova, A. Activation of N-methyl

- D-aspartate (NMDA) receptors has no influence on rheological properties of erythrocytes. in *Clinical Hemorheology and Microcirculation* **49**, 307–313 (2011).
133. Kuskonmaz, S., Cicek, E., Comu, F. M., Aslan, M. & Kurtipek, O. Effect of propofol and memantine on erythrocyte deformability in diabetic rat model. *Med. Sci. Discov.* **2**, 221–224 (2015).
  134. Sheetz, M. P. & Singer, S. J. Biological Membranes as Bilayer Couples. A Molecular Mechanism of Drug-Erythrocyte Interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **71**, 4457–4461 (1974).
  135. Gummadi, S. N. & Kumar, K. S. The mystery of phospholipid flip-flop in biogenic membranes. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **10**, 101–121 (2005).
  136. Schrier, S. L., Zachowski, A. & Devaux, P. F. Mechanisms of Amphipath-Induced Stomatocytosis in Human Erythrocytes. *Blood* **79**, 782–786 (1992).
  137. Enomoto, A., Takakuwa, Y., Manno, S., Tanaka, A. & Mohandas, N. Regulation of erythrocyte ghost membrane mechanical stability by chlorpromazine. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1512**, 285–290 (2001).
  138. Chen, J. Y. *et al.* Selective amphipathic nature of chlorpromazine binding to plasma membrane bilayers. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1616**, 95–105 (2003).
  139. Ferrell, J. E. & Huestis, W. H. Phosphoinositide metabolism and the morphology of human erythrocytes. *J. Cell Biol.* **98**, 1992–1998 (1984).
  140. Li, B. *et al.* Qualitative and Quantitative Analyses of the Molecular-Level Interaction between Memantine and Model Cell Membranes. *J. Phys. Chem. C* **119**, 17074–17083 (2015).
  141. Devaux, P. F. Static and Dynamic Lipid Asymmetry in Cell Membranes. *Biochemistry* **30**, 1163–1173 (1991).
  142. Salamone, J. C. *Polymeric Materials Encyclopedia, Twelve Volume Set. Polymeric materials encyclopedia* (1996).
  143. Katsaras, J. *et al.* Clarification of the ripple phase of lecithin bilayers using fully hydrated, aligned samples. *Phys. Rev. E. Stat. Phys. Plasmas. Fluids. Relat. Interdiscip. Topics* **61**, 5668–5677 (2000).



144. Mason, P., Nagle, J., Epand, R. & Katsaras, J. Anomalous swelling in phospholipid bilayers is not coupled to the formation of a ripple phase. *Phys. Rev. E* **63**, 030902 (2001).
145. Chew, C. F., Guy, A. & Biggin, P. C. Distribution and Dynamics of Adamantanes in a Lipid Bilayer. **95**, (2008).
146. Parsons, C., Rammes, G. & Danysz, W. Pharmacodynamics of Memantine: An Update. *Curr. Neuropharmacol.* **6**, 55–78 (2008).
147. Solntseva, E. I., Bukanova, J. V. & Skrebitsky, V. G. Donepezil in low micromolar concentrations modulates voltage-gated potassium currents in pyramidal neurons of rat hippocampus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **430**, 1066–1071 (2013).
148. Li, K., Cheng, N. & Li, X. T. Inhibitory effects of cholinesterase inhibitor donepezil on the Kv1.5 potassium channel. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
149. Di Angelantonio, S., Bernardi, G. & Mercuri, N. B. Donepezil modulates nicotinic receptors of substantia nigra dopaminergic neurones. *Br. J. Pharmacol.* **141**, 644–652 (2004).
150. Francis, S. A., Smith, F. & Malkinson, J. *Integrated Pharmacy: Case Studies*. (Pharmaceutical Press, 2015).
151. Raja, N. S., Sankaranarayanan, K., Dhathathreyan, A. & Nair, B. U. Interaction of chromium(III) complexes with model lipid bilayers: Implications on cellular uptake. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1808**, 332–340 (2011).
152. Diez-Silva, M., Dao, M., Han, J., Lim, C.-T. & Suresh, S. Shape and Biomechanical Characteristics of Human Red Blood Cells in Health and Disease. *MRS Bull.* **35**, 382–388 (2010).
153. Wright, D. L. & Plummer, D. T. Multiple forms of acetylcholinesterase from human erythrocytes. *Biochem. J.* **133**, 521–7 (1973).
154. Heller, M. & Hanahan, D. J. Human erythrocyte membrane bound enzyme acetylcholinesterase. *BBA - Biomembr.* **255**, 251–272 (1972).
155. Saldanha, C. Human erythrocyte acetylcholinesterase in health and disease. *Molecules* **22**, (2017).
156. Ott, P., Ariano, B. H., Binggeli, Y. & Brodbeck, U. A monomeric form of

- human erythrocyte membrane acetylcholinesterase. *Biochim Biophys Acta* **729**, 193–199 (1983).
157. Biagioni, S., Scarsella, G., Settini, L. & Traina, M. E. Acetylcholinesterase molecular forms from rat and human erythrocyte membrane. *Mol. Cell. Biochem.* **47**, 183–90 (1982).
158. Paulick, M. G. & Bertozzi, C. R. The glycosylphosphatidylinositol anchor: A complex membrane-anchoring structure for proteins. *Biochemistry* **47**, 6991–7000 (2008).
159. Ho, C. & Stubbs, C. D. Hydration at the membrane protein-lipid interface. *Biophys. J.* **63**, 897–902 (1992).
160. Kryger, G., Silman, I. & Sussman, J. L. Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept): Implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Structure* **7**, 297–307 (1999).
161. Kryger, G., Silman, I. & Sussman, J. L. Three-dimensional structure of a complex of E2020 with acetylcholinesterase from *Torpedo californica*. in *Journal of Physiology Paris* **92**, 191–194 (1998).
162. Niu, C. *et al.* Dynamic mechanism of E2020 binding to acetylcholinesterase: A steered molecular dynamics simulation. *J. Phys. Chem. B* **109**, 23730–23738 (2005).
163. Dvir, H., Silman, I., Harel, M., Rosenberry, T. L. & Sussman, J. L. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. *Chem. Biol. Interact.* **187**, 10–22 (2010).
164. Rahman, A. *et al.* Halogen-directed drug design for Alzheimer's disease: a combined density functional and molecular docking study. *Springerplus* **5**, (2016).
165. Birks, J. S., Chong, L. Y. & Grimley Evans, J. Rivastigmine for Alzheimer's disease. *Cochrane database Syst. Rev.* **9**, CD001191 (2015).
166. Pohanka, M. Inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase meet immunity. *International Journal of Molecular Sciences* **15**, 9809–9825 (2014).
167. Kaduk, J. A., Zhong, K., Gindhart, A. M. & Blanton, T. N. Crystal structure of rivastigmine hydrogen tartrate Form I (Exelon®), C<sub>14</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>O<sub>6</sub>).

- Powder Diffr.* **31**, 97–103 (2016).
168. Kumar, A., Singh, A. & Ekavali. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: An update. *Pharmacological Reports* **67**, 195–203 (2015).
169. Chatel, J. M., Vallette, F. M., Massoulié, J. & Grassi, J. A conformation-dependent monoclonal antibody against active chicken acetylcholinesterase. *FEBS Lett.* **319**, 12–15 (1993).
170. OTT, P., JENNY, B. & BRODBECK, U. Multiple Molecular Forms of Purified Human Erythrocyte Acetylcholinesterase. *Eur. J. Biochem.* **57**, 469–480 (1975).
171. Massoulié, J., Bon, S. & Vigny, M. The polymorphism of cholinesterase in vertebrates. *Neurochem. Int.* **2**, 161–184 (1980).
172. Pagano, M. & Faggio, C. The use of erythrocyte fragility to assess xenobiotic cytotoxicity. *Cell Biochem. Funct.* **33**, 351–355 (2015).
173. Farag, M. R. & Alagawany, M. Erythrocytes as a biological model for screening of xenobiotics toxicity. *Chemico-Biological Interactions* **279**, 73–83 (2018).
174. Yan, J., Yu, J., Wang, C. & Gu, Z. Red Blood Cells for Drug Delivery. *Small Methods* 1700270 (2017). doi:10.1002/smt.201700270
175. Mohandas, N. & Gallagher, P. G. Red cell membrane: Past, present, and future. *Blood* **112**, 3939–3948 (2008).
176. Akanji, M. A. Assessment of Erythrocytes as a Model for In Vitro Drug Toxicity. *Fountain J. Nat. Appl. Sci.* **2**, (2013).
177. Nachury, M. V. Tandem Affinity Purification of the BBSome, a Critical Regulator of Rab8 in Ciliogenesis. *Methods in Enzymology* **439**, 501–513 (2008).
178. Bohn, P. *et al.* Rational design of central selective acetylcholinesterase inhibitors by means of a 'bio-oxidisable prodrug' strategy. *Org. Biomol. Chem.* **7**, 2612–2618 (2009).
179. Parasassi, T., De Stasio, G., Ravagnan, G., Rusch, R. M. & Gratton, E. Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized

- polarization of Laurdan fluorescence. *Biophys. J.* **60**, 179–189 (1991).
180. Parasassi, T., Krasnowska, E. K., Bagatolli, L. & Gratton, E. Laurdan and Prodan as Polarity-Sensitive Fluorescent Membrane Probes. *J. Fluoresc.* **8**, 365–373 (1998).
181. Parasassi, T. & Gratton, E. Membrane lipid domains and dynamics as detected by Laurdan fluorescence. *J. Fluoresc.* **5**, 59–69 (1995).
182. Parasassi, T., Di Stefano, M., Loiero, M., Ravagnan, G. & Gratton, E. Influence of cholesterol on phospholipid bilayers phase domains as detected by Laurdan fluorescence. *Biophys. J.* **66**, 120–132 (1994).
183. P. Bar-On, §, ¶ *et al.* Kinetic and Structural Studies on the Interaction of Cholinesterases with the Anti-Alzheimer Drug Rivastigmine†,‡. *Biochemistry* **41**, 3555–3564 (2002).
184. Bartolucci, C. *et al.* Structural determinants of *Torpedo californica* acetylcholinesterase inhibition by the novel and orally active carbamate based anti-alzheimer drug ganstigmine (CHF-2819). *J. Med. Chem.* **49**, 5051–5058 (2006).
185. Bolognesi, M. L. *et al.* Design, synthesis, and biological evaluation of conformationally restricted rivastigmine analogues. *J. Med. Chem.* **47**, 5945–5952 (2004).
186. R., B. The clinical benefits of rivastigmine may reflect its dual inhibitory mode of action: An hypothesis. *Int. J. Clin. Pract.* **56**, 206–214 (2002).
187. Castro, A. & Martinez, A. Peripheral and Dual Binding Site Acetylcholinesterase Inhibitors: Implications in treatment of Alzheimers Disease. *Mini-Reviews Med. Chem.* **1**, 267–272 (2001).
188. Babitha, P. P., Sahila, M. M., Bandaru, S., Nayarisseri, A. & Sureshkumar, S. Molecular Docking and Pharmacological Investigations of Rivastigmine-Fluoxetine and Coumarin-Tacrine hybrids against Acetyl Choline Esterase. *Bioinformation* **11**, 378–386 (2015).
189. Frankfort, S. V. *et al.* Treatment effects of rivastigmine on cognition, performance of daily living activities and behaviour in Alzheimer's disease in an outpatient geriatric setting. *Int. J. Clin. Pract.* **60**, 646–654 (2006).

190. Jann, M. W., Shirley, K. L. & Small, G. W. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of cholinesterase inhibitors. *Clinical Pharmacokinetics* **41**, 719–739 (2002).
191. Rösler, M. *et al.* Efficacy and safety of rivastigmine in patients with Alzheimer's disease : international randomised controlled trial. *BMJ* **318**, 633–640 (1999).
192. Sepulveda, F. J., Parodi, J., Peoples, R. W., Opazo, C. & Aguayo, L. G. Synaptotoxicity of Alzheimer beta amyloid can be explained by its membrane perforating property. *PLoS One* **5**, (2010).
193. Fernández-Pérez, E. J., Sepúlveda, F. J., Peoples, R. & Aguayo, L. G. Role of membrane GM1 on early neuronal membrane actions of A $\beta$  during onset of Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1863**, 3105–3116 (2017).
194. Fernández-Pérez, E. J. *et al.* Effect of cholesterol on membrane fluidity and association of A $\beta$  oligomers and subsequent neuronal damage: A Double-Edged Sword. *Front. Aging Neurosci.* **10**, (2018).
195. Selkoe, D. J. & Hardy, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol. Med.* **8**, 595–608 (2016).
196. Harrison, J. R. & Owen, M. J. Alzheimer's disease: The amyloid hypothesis on trial. *British Journal of Psychiatry* **208**, 1–3 (2016).
197. Suwalsky, M. & Hernández, P. Aluminum enhances the toxic effects of amyloid  $\beta$ -peptide on cell membranes and a molecular model. *Monatshefte für Chemie* **142**, 431–437 (2011).
198. Hernandez, P. L. Interacciones moleculares de péptidos B-amiloide y Aluminio con membranas celulares y modelos y su relación con la Enfermedad de Alzheimer (Ph.D. Thesis). (Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, 2006).

## 11. ANEXOS

### 11.1 TABLAS DE ÁREAS BAJO LA CURVA OBTENIDAS DESDE LOS PATRONES DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X.

Tabla 7. 1: Porcentaje de desorden estructural en las regiones SA y WA de DMPC por efecto de memantina. (Fuente: Elaboración propia)

MEMANTINA Concentración [ $\mu$ M]	Reducción del área bajo la curva (%)			
	DMPC		DMPE	
	SA	WA	SA	WA
20	11.6 $\pm$ 0.1	6.90 $\pm$ 0.6	8.11 $\pm$ 0.3	13.5 $\pm$ 0.4
40	45.9 $\pm$ 0.3	67.6 $\pm$ 1.1	22.4 $\pm$ 0.4	22.2 $\pm$ 0.1
60	49.6 $\pm$ 0.1	72.2 $\pm$ 0.7	39.0 $\pm$ 0.2	26.7 $\pm$ 0.1
80	91.3 $\pm$ 0.9	98.4 $\pm$ 0.2	41.8 $\pm$ 0.1	33.4 $\pm$ 0.5
100	96.8 $\pm$ 0.7	99.6 $\pm$ 0.4	45.6 $\pm$ 0.2	43.7 $\pm$ 0.3

Tabla 7. 2: Porcentaje de desorden estructural en las regiones SA y WA de DMPC por efecto de donepezilo. (Fuente: Elaboración propia)

DONEPEZILO Concentración [ $\mu$ M]	Reducción del área bajo la curva (%)			
	DMPC		DMPE	
	SA	WA	SA	WA
20	17.2 $\pm$ 0.5	21.0 $\pm$ 0.4	18.8 $\pm$ 1.3	32.1 $\pm$ 0.3
40	35.2 $\pm$ 0.3	37.8 $\pm$ 0.1	34.8 $\pm$ 1.6	41.7 $\pm$ 0.1
60	54.1 $\pm$ 1.1	58.0 $\pm$ 0.7	49.9 $\pm$ 0.3	53.9 $\pm$ 0.4
80	70.2 $\pm$ 0.3	74.4 $\pm$ 0.6	69.0 $\pm$ 0.1	71.4 $\pm$ 0.1
100	74.4 $\pm$ 0.9	90.3 $\pm$ 0.1	84.4 $\pm$ 0.3	87.0 $\pm$ 1.1

Tabla 7. 3: Porcentaje de desorden estructural en las regiones SA y WA de DMPC por efecto de rivastigmina. (Fuente: Elaboración propia)

RIVASTIGMINA Concentración [ $\mu$ M]	Reducción del área bajo la curva (%)			
	DMPC		DMPE	
	SA	WA	SA	WA
20	14.2 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.1	3.33 $\pm$ 0.8
40	11.5 $\pm$ 1.0	3.2 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.1	16.5 $\pm$ 1.1
60	30.5 $\pm$ 0.7	22.5 $\pm$ 0.4	8.3 $\pm$ 0.4	23.0 $\pm$ 0.2
80	32.3 $\pm$ 0.7	46.5 $\pm$ 0.4	50.7 $\pm$ 0.2	30.5 $\pm$ 0.4
100	32.2 $\pm$ 0.4	48.1 $\pm$ 0.1	53.5 $\pm$ 0.6	42.1 $\pm$ 0.1

**Tabla 7. 4: Porcentaje de desorden estructural en las regiones SA y WA de DMPC por efecto del híbrido 1 (H1). (Fuente: Elaboración propia)**

<b>HÍBRIDO 1</b>	<b>Reducción del área bajo la curva (%)</b>			
<b>Concentración [<math>\mu</math>M]</b>	<b>DMPC</b>		<b>DMPE</b>	
	<b>SA</b>	<b>WA</b>	<b>SA</b>	<b>WA</b>
5	9.5 $\pm$ 0.4	4.6 $\pm$ 0.2	4.2 $\pm$ 0.1	15.7 $\pm$ 0.7
10	10.0 $\pm$ 0.5	4.7 $\pm$ 0.8	11.7 $\pm$ 0.3	21.4 $\pm$ 0.3
20	11.1 $\pm$ 0.7	5.2 $\pm$ 0.9	26.7 $\pm$ 0.8	34.5 $\pm$ 0.7
50	13.4 $\pm$ 0.7	8.2 $\pm$ 0.3	41.3 $\pm$ 1.1	43.6 $\pm$ 0.9

**Tabla 7. 5: Porcentaje de desorden estructural en las regiones SA y WA de DMPC por efecto del híbrido 2 (H2). (Fuente: Elaboración propia)**

<b>HÍBRIDO 2</b>	<b>Reducción del área bajo la curva (%)</b>			
<b>Concentración [<math>\mu</math>M]</b>	<b>DMPC</b>		<b>DMPE</b>	
	<b>SA</b>	<b>WA</b>	<b>SA</b>	<b>WA</b>
5	12.3 $\pm$ 0.2	16.1 $\pm$ 1.4	2.1 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.7
10	35.2 $\pm$ 0.4	21.4 $\pm$ 0.5	2.3 $\pm$ 1.3	1.2 $\pm$ 1.5
20	43.7 $\pm$ 0.1	36.9 $\pm$ 1.2	2.3 $\pm$ 1.7	1.3 $\pm$ 0.4
30	64.6 $\pm$ 0.7	52.2 $\pm$ 1.3	2.6 $\pm$ 0.5	1.3 $\pm$ 1.5

**Tabla 7. 6: Porcentaje de desorden estructural en las regiones SA y WA de DMPC por efecto del híbrido 3 (H3). (Fuente: Elaboración propia)**

<b>HÍBRIDO 3</b>	<b>Reducción del área bajo la curva (%)</b>			
<b>Concentración [<math>\mu</math>M]</b>	<b>DMPC</b>		<b>DMPE</b>	
	<b>SA</b>	<b>WA</b>	<b>SA</b>	<b>WA</b>
5	16.3 $\pm$ 0.3	35.3 $\pm$ 0.4	21.5 $\pm$ 1.5	34.6 $\pm$ 1.2
10	47.2 $\pm$ 1.3	56.2 $\pm$ 0.6	34.2 $\pm$ 1.3	46.5 $\pm$ 1.6
20	69.2 $\pm$ 0.9	68.8 $\pm$ 0.2	43.6 $\pm$ 0.4	58.4 $\pm$ 4.3
50	84.7 $\pm$ 1.3	89.3 $\pm$ 0.4	56.3 $\pm$ 0.8	63.2 $\pm$ 1.5

**Tabla 7. 7: Porcentaje de desorden estructural en las regiones SA y WA de DMPC por efecto del péptido A $\beta$  (1-40). (Fuente: Elaboración propia)**

A $\beta$ (1-40) Concentración [ $\mu$ M]	Reducción del área bajo la curva (%)			
	DMPC		DMPE	
	SA	WA	SA	WA
5	42.4 $\pm$ 0.2	21.8 $\pm$ 0.1	5.8 $\pm$ 0.7	1.5 $\pm$ 0.1
10	47.8 $\pm$ 0.5	41.3 $\pm$ 0.2	6.1 $\pm$ 0.2	2.2 $\pm$ 0.3
20	73.6 $\pm$ 0.2	46.2 $\pm$ 0.1	6.3 $\pm$ 0.3	2.3 $\pm$ 0.3
30	99.8 $\pm$ 0.3	99.4 $\pm$ 0.2	6.3 $\pm$ 0.1	3.1 $\pm$ 0.1

**Tabla 7. 8: Porcentaje de desorden estructural en las regiones SA y WA de DMPC por efecto del péptido A $\beta$  (1-42). (Fuente: Elaboración propia)**

A $\beta$ (1-42) Concentración [ $\mu$ M]	Reducción del área bajo la curva (%)			
	DMPC		DMPE	
	SA	WA	SA	WA
5	83.1 $\pm$ 0.4	83.6 $\pm$ 0.9	2.1 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 0.1
10	92.1 $\pm$ 1.5	99.9 $\pm$ 0.1	2.9 $\pm$ 0.1	3.1 $\pm$ 0.1
20	94.5 $\pm$ 1.6	99.9 $\pm$ 0.6	2.8 $\pm$ 0.4	3.2 $\pm$ 0.4
30	99.9 $\pm$ 0.9	99.9 $\pm$ 0.3	3.0 $\pm$ 0.2	3.3 $\pm$ 0.2

**Tabla 7. 9: Porcentaje de desorden estructural en las regiones SA y WA de DMPC por efecto del péptido A $\beta$  (1-40) y en solución con diferentes concentraciones de híbrido 1 (H1). (Fuente: Elaboración propia)**

EFECTO PROTECTOR H1 Concentración [ $\mu$ M]	Reducción del área bajo la curva (%)	
	DMPC	
	SA	WA
A $\beta$ (1-40) 30 $\mu$ M + HIBRIDO 1	99.3 $\pm$ 0.3	99.1 $\pm$ 0.4
5 $\mu$ M	86.4 $\pm$ 0.6	84.2 $\pm$ 1.5
10 $\mu$ M	81.8 $\pm$ 1.4	73.5 $\pm$ 0.4
20 $\mu$ M	63.2 $\pm$ 0.7	43.1 $\pm$ 0.6
50 $\mu$ M	21.4 $\pm$ 0.6	36.7 $\pm$ 0.2



**Tabla 7. 10: Porcentaje de desorden estructural en las regiones SA y WA de DMPC por efecto del péptido A $\beta$  (1-40) y en solución con diferentes concentraciones de híbrido 2 (H2). (Fuente: Elaboración propia)**

<b>EFEECTO PROTECTOR H2</b>	<b>Reducción del área bajo la curva (%)</b>	
<b>Concentración [μM]</b>	<b>DMPC</b>	
	<b>SA</b>	<b>WA</b>
A $\beta$ (1-40) 30 μM	99.3 ± 0.3	99.1 ± 0.4
+ <u>HIBRIDO 2</u>		
10 μM	73.6 ± 1.1	3.6 ± 0.7
20 μM	62.5 ± 0.5	28.3 ± 0.9
50 μM	54.2 ± 0.6	42.5 ± 1.2
80 μM	48.7 ± 0.6	55.3 ± 2.4

**Tabla 7. 11: Porcentaje de desorden estructural en las regiones SA y WA de DMPC por efecto del péptido A $\beta$  (1-40) y en solución con diferentes concentraciones de híbrido 3 (H3). (Fuente: Elaboración propia)**

<b>EFEECTO PROTECTOR H3</b>	<b>Reducción del área bajo la curva (%)</b>	
<b>Concentración [μM]</b>	<b>DMPC</b>	
	<b>SA</b>	<b>WA</b>
A $\beta$ (1-40) 30 μM	99.3 ± 0.3	99.1 ± 0.4
+ <u>HIBRIDO 3</u>		
1 μM	93.1 ± 0.6	95.3 ± 0.5
5 μM	89.1 ± 0.3	94.5 ± 0.1
20 μM	58.8 ± 0.1	93.8 ± 0.6
50 μM	56.3 ± 0.5	92.3 ± 0.3

**Tabla 7. 12: Porcentaje de desorden estructural en las regiones SA y WA de DMPC por efecto del péptido A $\beta$  (1-42) y en solución con diferentes concentraciones de híbrido 1 (H1). (Fuente: Elaboración propia)**

<b>EFEECTO PROTECTOR H1</b>	<b>Reducción del área bajo la curva (%)</b>	
<b>Concentración [μM]</b>	<b>DMPC</b>	
	<b>SA</b>	<b>WA</b>
A $\beta$ (1-42) 20 μM	99.3 ± 0.3	99.1 ± 0.4
+ <u>HIBRIDO 1</u>		
10 μM	81.4 ± 0.9	95.2 ± 0.1
20 μM	73.6 ± 0.3	94.6 ± 0.5
50 μM	64.2 ± 0.7	92.1 ± 0.1
80 μM	61.7 ± 0.5	89.5 ± 0.7

**Tabla 7. 13: Porcentaje de desorden estructural en las regiones SA y WA de DMPC por efecto del péptido A $\beta$  (1-42) y en solución con diferentes concentraciones de híbrido 2 (H2). (Fuente: Elaboración propia)**

<b>EFEECTO PROTECTOR H2</b>	<b>Reducción del área bajo la curva (%)</b>	
<b>Concentración [μM]</b>	<b>DMPC</b>	
	<b>SA</b>	<b>WA</b>
A $\beta$ (1-42) 20 μM	99.3 ± 0.3	99.1 ± 0.4
+ <u>HIBRIDO 2</u>		
5 μM	89.2 ± 0.6	91.3 ± 1.2
15 μM	73.5 ± 0.3	83.6 ± 0.2
30 μM	65.1 ± 1.2	65.1 ± 0.5
50 μM	18.3 ± 1.1	26.1 ± 2.1

**Tabla 7. 14: Porcentaje de desorden estructural en las regiones SA y WA de DMPC por efecto del péptido A $\beta$  (1-42) y en solución con diferentes concentraciones de híbrido 3 (H3). (Fuente: Elaboración propia)**

<b>EFEECTO PROTECTOR H3</b>	<b>Reducción del área bajo la curva (%)</b>	
<b>Concentración [μM]</b>	<b>DMPC</b>	
	<b>SA</b>	<b>WA</b>
A $\beta$ (1-42) 20 μM	99.3 ± 0.3	99.1 ± 0.4
+ <u>HIBRIDO 3</u>		
5 μM	97.6 ± 0.4	97.4 ± 0.1
10 μM	78.2 ± 0.7	96.7 ± 0.5
20 μM	69.8 ± 0.5	92.1 ± 0.6
50 μM	61.3 ± 0.1	87.3 ± 0.2

## 11.2 TABLAS EXPERIMENTALES DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.

Tabla 7. 15: Valores de polarización generalizada (GP) de lauridan incubado en vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC en presencia de memantina, rivastigmina y donepezilo a 18 °C. (Fuente: Elaboración propia)

Concentración (μM)	Polarización generalizada (PG) de lauridan		
	Memantina	Donepezilo	Rivastigmina
0	0,5465 ± 0,0011	0,5228 ± 0,0015	0,5415 ± 0,0012
20	0,5123 ± 0,0015	0,5011 ± 0,0013	0,5321 ± 0,0012
40	0,4815 ± 0,0014	0,5015 ± 0,0067	0,5361 ± 0,0019
60	0,4954 ± 0,0012	0,4889 ± 0,0024	0,5123 ± 0,0043
80	0,4742 ± 0,0018	0,4957 ± 0,0096	0,5115 ± 0,0019
100	0,4012 ± 0,0011	0,4792 ± 0,0012	0,5199 ± 0,0062

Tabla 7. 16: Valores de polarización generalizada (GP) de lauridan incubado en vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC en presencia de memantina, rivastigmina y donepezilo a 37 °C. (Fuente: Elaboración propia)

Concentración (μM)	Polarización generalizada (PG) de lauridan		
	Memantina	Donepezilo	Rivastigmina
0	0,0913 ± 0,0017	0,0826 ± 0,0021	0,0795 ± 0,0016
20	0,0623 ± 0,0013	0,0790 ± 0,0018	0,0701 ± 0,0013
40	0,0561 ± 0,0019	0,0793 ± 0,0053	0,0847 ± 0,0012
60	0,0598 ± 0,0021	0,0792 ± 0,0012	0,0856 ± 0,0019
80	0,0543 ± 0,0017	0,0792 ± 0,0065	0,0995 ± 0,0015
100	0,0365 ± 0,0023	0,0791 ± 0,0032	0,1283 ± 0,0013

Tabla 7. 17: Valores de anisotropía (r) de DPH incubado en vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC en presencia de memantina, rivastigmina y donepezilo a 18 °C. (Fuente: Elaboración propia)

Concentración (μM)	Anisotropía (r) de DPH		
	Memantina	Donepezilo	Rivastigmina
0	0,2996 ± 0,0094	0,2310 ± 0,0098	0,3012 ± 0,0098
20	0,2963 ± 0,0037	0,2202 ± 0,0070	0,2923 ± 0,0021
40	0,2634 ± 0,0055	0,2185 ± 0,0055	0,2835 ± 0,0055
60	0,2516 ± 0,0061	0,2129 ± 0,0012	0,2829 ± 0,0012
80	0,2498 ± 0,0076	0,2157 ± 0,0032	0,2816 ± 0,0073
100	0,2396 ± 0,0021	0,1998 ± 0,0070	0,2777 ± 0,0070

**Tabla 7. 18: Valores de anisotropía (r) de DPH incubado en vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC en presencia de memantina, rivastigmina y donepezilo a 37 °C. (Fuente: Elaboración propia)**

Concentración (μM)	Anisotropía (r) de DPH		
	Memantina	Donepezilo	Rivastigmina
0	0,1247 ± 0,0066	0,1117 ± 0,0021	0,1094 ± 0,0011
20	0,1204 ± 0,0061	0,1014 ± 0,0067	0,0974 ± 0,0013
40	0,1190 ± 0,0033	0,1020 ± 0,0065	0,0898 ± 0,0017
60	0,1070 ± 0,0076	0,0924 ± 0,0043	0,0854 ± 0,0021
80	0,1022 ± 0,0056	0,0924 ± 0,0083	0,0834 ± 0,0064
100	0,0918 ± 0,0021	0,0833 ± 0,0037	0,0851 ± 0,0067

**Tabla 7. 19: Valores de polarización generalizada (GP) de laurdan incubado en membranas aisladas no selladas de eritrocitos humanos (IUM) en presencia de memantina, rivastigmina y donepezilo a 37 °C. (Fuente: Elaboración propia)**

Concentración (μM)	Polarización generalizada (PG) de laurdan		
	Memantina	Donepezilo	Rivastigmina
0	0,3124 ± 0,0013	0,3533 ± 0,0012	0,3634 ± 0,0014
20	0,2324 ± 0,0021	0,3490 ± 0,0024	0,3839 ± 0,0011
40	0,2316 ± 0,0013	0,3454 ± 0,0015	0,3894 ± 0,0014
60	0,1833 ± 0,0017	0,3380 ± 0,0017	0,4000 ± 0,0016
80	0,1744 ± 0,0011	0,3368 ± 0,0014	0,4368 ± 0,0017
100	0,1078 ± 0,0016	0,3384 ± 0,0014	0,4714 ± 0,0011

**Tabla 7. 20: Valores de anisotropía (r) de DPH incubado en membranas aisladas no selladas de eritrocitos humanos (IUM) en presencia de memantina, rivastigmina y donepezilo a 37 °C. (Fuente: Elaboración propia)**

Concentración (μM)	Anisotropía (r) de DPH		
	Memantina	Donepezilo	Rivastigmina
0	0,2296 ± 0,0023	0,2153 ± 0,0021	0,2352 ± 0,0042
20	0,2136 ± 0,0045	0,2131 ± 0,0032	0,2244 ± 0,0021
40	0,1957 ± 0,0067	0,2119 ± 0,0061	0,2109 ± 0,0026
60	0,1876 ± 0,0035	0,2102 ± 0,0056	0,2007 ± 0,0017
80	0,1436 ± 0,0079	0,2082 ± 0,0019	0,1843 ± 0,0014
100	0,1327 ± 0,0061	0,1912 ± 0,0026	0,1874 ± 0,0032

**Tabla 7. 21: Valores de polarización generalizada (GP) de lauridan incubado en vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC en presencia de los péptidos amiloides A $\beta$  (1-40) y A $\beta$  (1-42) a 18 °C. (Fuente: Elaboración propia)**

Concentración ( $\mu$ M)	Polarización generalizada (PG) de lauridan	
	A $\beta$ (1-40)	A $\beta$ (1-42)
0	0,5328 $\pm$ 0,0025	0,5124 $\pm$ 0,0015
10	0,5411 $\pm$ 0,0033	0,5251 $\pm$ 0,0013
20	0,5202 $\pm$ 0,0050	0,5515 $\pm$ 0,0020
30	0,5279 $\pm$ 0,0035	0,5789 $\pm$ 0,0025
40	0,5306 $\pm$ 0,0034	0,5758 $\pm$ 0,0014
50	0,5313 $\pm$ 0,0033	0,5792 $\pm$ 0,0013

**Tabla 7. 22: Valores de polarización generalizada (GP) de lauridan incubado en vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC en presencia de los péptidos amiloides A $\beta$  (1-40) y A $\beta$  (1-42) a 37 °C. (Fuente: Elaboración propia)**

Concentración ( $\mu$ M)	Polarización generalizada (PG) de lauridan	
	A $\beta$ (1-40)	A $\beta$ (1-42)
0	0,0861 $\pm$ 0,0024	0,0843 $\pm$ 0,0019
10	0,0856 $\pm$ 0,0026	0,0851 $\pm$ 0,0016
20	0,0851 $\pm$ 0,0015	0,0854 $\pm$ 0,0015
30	0,0846 $\pm$ 0,0027	0,0862 $\pm$ 0,0017
40	0,0851 $\pm$ 0,0014	0,0879 $\pm$ 0,0014
50	0,0861 $\pm$ 0,0024	0,0843 $\pm$ 0,0019

**Tabla 7. 23: Valores de anisotropía (r) de DPH incubado en vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC en presencia de los péptidos amiloides A $\beta$  (1-40) y A $\beta$  (1-42) a 18 °C. (Fuente: Elaboración propia)**

Concentración ( $\mu$ M)	Anisotropía (r) de DPH	
	A $\beta$ (1-40)	A $\beta$ (1-42)
0	0,2400 $\pm$ 0,0065	0,2467 $\pm$ 0,0098
10	0,2480 $\pm$ 0,0064	0,2767 $\pm$ 0,0070
20	0,2494 $\pm$ 0,0087	0,2799 $\pm$ 0,0055
30	0,2533 $\pm$ 0,0051	0,2946 $\pm$ 0,0078
40	0,2596 $\pm$ 0,0073	0,2857 $\pm$ 0,0073
50	0,2641 $\pm$ 0,0089	0,2879 $\pm$ 0,0070

**Tabla 7. 24: Valores de anisotropía (r) de DPH incubado en vesículas unilamelares grandes (LUV) de DMPC en presencia de los péptidos amiloides A $\beta$  (1-40) y A $\beta$  (1-42) a 37 °C. (Fuente: Elaboración propia)**

Concentración ( $\mu$ M)	Anisotropía (r) de DPH	
	A $\beta$ (1-40)	A $\beta$ (1-42)
0	0,1217 $\pm$ 0,0075	0,1232 $\pm$ 0,0077
10	0,1114 $\pm$ 0,0077	0,1514 $\pm$ 0,0069
20	0,1192 $\pm$ 0,0064	0,1520 $\pm$ 0,0051
30	0,1124 $\pm$ 0,0083	0,1692 $\pm$ 0,0082
40	0,1224 $\pm$ 0,0058	0,1725 $\pm$ 0,0083
50	0,1233 $\pm$ 0,0076	0,1832 $\pm$ 0,0057

**Tabla 7. 25: Valores de polarización generalizada (GP) de laurdan incubado en membranas aisladas no selladas de eritrocitos humanos (IUM) en presencia de los péptidos amiloides A $\beta$  (1-40) y A $\beta$  (1-42) a 37 °C. (Fuente: Elaboración propia)**

Concentración ( $\mu$ M)	Polarización generalizada (PG) de laurdan	
	A $\beta$ (1-40)	A $\beta$ (1-42)
0	0,3393 $\pm$ 0,0032	0,3341 $\pm$ 0,0012
10	0,3430 $\pm$ 0,0032	0,3349 $\pm$ 0,0024
20	0,3447 $\pm$ 0,0025	0,3295 $\pm$ 0,0015
30	0,3438 $\pm$ 0,0022	0,3358 $\pm$ 0,0017
40	0,3450 $\pm$ 0,0024	0,3337 $\pm$ 0,0014
50	0,3452 $\pm$ 0,0034	0,3414 $\pm$ 0,0014

**Tabla 7. 26: Valores de anisotropía (r) de DPH incubado en membranas aisladas no selladas de eritrocitos humanos (IUM) en presencia de los péptidos A $\beta$  (1-40) y A $\beta$  (1-42) a 37 °C. (Fuente: Elaboración propia)**

Concentración ( $\mu$ M)	Anisotropía (r) de DPH	
	A $\beta$ (1-40)	A $\beta$ (1-42)
0	0,2113 $\pm$ 0,0027	0,2215 $\pm$ 0,0067
10	0,2467 $\pm$ 0,0046	0,2431 $\pm$ 0,0036
20	0,2579 $\pm$ 0,0040	0,2561 $\pm$ 0,0060
30	0,2782 $\pm$ 0,0034	0,2780 $\pm$ 0,0074
40	0,2799 $\pm$ 0,0033	0,2882 $\pm$ 0,0074
50	0,2891 $\pm$ 0,0039	0,2917 $\pm$ 0,0069

### 11.3 TABLAS DE PARÁMETROS TERMODINÁMICOS OBTENIDOS MEDIANTE CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC).

**Tabla 7. 27: Parámetros termodinámicos de pretransición y transición de fase principal de liposomas multilamelares de DMPC puros, completamente hidratados y mezclas de DMPC/memantina obtenidos a partir de barridos de calentamiento y enfriamiento recolectadas a una velocidad de 1 °C min<sup>-1</sup> para ambos procesos. La precisión de la temperatura de transición de fase principal y la entalpía fue de ± 0.01 °C y ± 0.8 kJ/mol, respectivamente. (Fuente: Elaboración propia)**

Concentración compuesto [μM]	Pretransición (calentamiento)			Transición principal (calentamiento)		
	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tp [°C]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tm [°C]
DMPC + Memantina						
0	2,36	0,82	14,22	18,46	6,21	24,23
50	1,89	0,66	13,33	22,60	7,61	24,06
150	1,52	0,54	12,72	20,97	7,06	23,96
500	1,32	0,46	11,79	27,37	9,22	23,69
1000	0,28	0,01	10,35	22,26	7,50	23,41

Concentración compuesto [μM]	Pretransición (enfriamiento)			Transición principal (enfriamiento)		
	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tp [°C]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tm [°C]
DMPC + Memantina						
0	1,02	0,44	9,11	21,43	7,20	23,13
50	0,40	0,10	8,63	21,30	7,20	23,03
150	0,14	0,01	8,53	20,19	6,80	23,02
500	-	-	-	18,14	6,10	22,82
1000	-	-	-	12,42	4,20	22,41

**Tabla 7. 28: Parámetros termodinámicos de transición de la fase principal de liposomas multilamelares de DMPE puros, completamente hidratados y mezclas de DMPE/memantina obtenidas a partir de exploraciones de calentamiento y enfriamiento recolectadas a una velocidad de calentamiento (enfriamiento) de 1 °C min<sup>-1</sup>. La precisión de la temperatura de transición de fase principal y la entalpía fue de ± 0.01 °C y ± 0.8 kJ / mol, respectivamente. (Fuente: Elaboración propia)**

Concentración compuesto [μM]	Transición principal (calentamiento)			Transición principal (enfriamiento)		
	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tp [°C]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tm [°C]
DMPE + Memantina						
0	21,60	6,7	50,74	22,951	7,1	49,46
50	24,67	7,6	50,74	26,160	8,1	49,33
150	24,58	7,6	50,74	25,952	8,0	49,33
500	24,81	7,7	50,67	26,001	8,1	49,26
1000	25,62	7,9	50,64	26,941	8,4	49,22

**Tabla 7. 29: Parámetros termodinámicos de pretransición y transición de fase principal de liposomas multilamelares de DMPC puros, completamente hidratados y mezclas de DMPC/donepezilo obtenidos a partir de barridos de calentamiento y enfriamiento recolectadas a una velocidad de 1 °C min<sup>-1</sup> para ambos procesos. La precisión de la temperatura de transición de fase principal y la entalpía fue de ± 0.01 °C y ± 0.8 kJ/mol, respectivamente. (Fuente: Elaboración propia)**

Concentración compuesto [μM]	Pretransición (calentamiento)			Transición principal (calentamiento)		
	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tp [°C]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tm [°C]
DMPC + Donepezilo						
0	2,63	0,79	14,01	18,03	6,31	24,08
50	1,33	0,47	11,84	14,94	5,03	23,91
100	0,99	0,31	11,66	21,75	7,33	23,77
150	0,31	0,01	11,77	14,99	5,05	23,77
200	0,18	0,61	11,01	16,72	5,61	23,71
500	0,08	0,03	10,09	10,39	3,52	22,36
1000	0,09	0,03	9,91	17,22	5,82	21,68

Concentración compuesto [μM]	Pretransición (enfriamiento)			Transición principal (enfriamiento)		
	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tp [°C]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tm [°C]
DMPC + Donepezilo						
0	1,01	-0,36	9,05	21,32	7,1	23,11
50	0,1	-0,13	7,3	17,63	5,96	22,78
100	-	-	-	16,37	5,54	22,59
150	-	-	-	15,72	5,32	22,6
200	-	-	-	16,61	5,62	22,54
500	-	-	-	13,16	4,45	22,51
1000	-	-	-	13,89	4,7	22,46

**Tabla 7. 30: Parámetros termodinámicos de transición de la fase principal de liposomas multilamelares de DMPE puros, completamente hidratados y mezclas de DMPE/donepezilo obtenidas a partir de exploraciones de calentamiento y enfriamiento recolectadas a una velocidad de calentamiento (enfriamiento) de 1 °C min<sup>-1</sup>. La precisión de la temperatura de transición de fase principal y la entalpía fue de ± 0.01 °C y ± 0.8 kJ / mol, respectivamente. (Fuente: Elaboración propia)**

Concentración compuesto [μM]	Transición principal (calentamiento)			Transición principal (enfriamiento)		
	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tp [°C]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tm [°C]
DMPE + Donepezilo						
0	21,63	6,68	50,81	22,94	7,21	49,53
50	19,14	6,36	50,81	19,36	6,34	49,42
100	19,70	6,08	50,74	20,28	6,29	49,39
150	21,91	6,77	50,74	22,92	7,11	49,42
200	25,97	8,02	50,78	25,50	7,91	49,23
500	25,31	7,82	50,7	24,66	7,65	49,25
1000	22,48	6,94	50,7	24,05	7,46	49,25



**Tabla 7. 31: Parámetros termodinámicos de pretransición y transición de fase principal de liposomas multilamelares de DMPC puros, completamente hidratados y mezclas de DMPC/rivastigmina obtenidos a partir de barridos de calentamiento y enfriamiento recolectadas a una velocidad de 1 °C min<sup>-1</sup> para ambos procesos. La precisión de la temperatura de transición de fase principal y la entalpía fue de ± 0.01 °C y ± 0.8 kJ/mol, respectivamente. (Fuente: Elaboración propia)**

Concentración compuesto [μM]	Pretransición (calentamiento)			Transición principal (calentamiento)		
	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tp [°C]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tm [°C]
DMPC + Rivastigmina						
0	2,68	0,93	14,01	18,03	6,31	24,16
50	1,06	0,37	13,23	17,45	5,87	24,16
100	0,71	0,29	13,14	16,46	5,54	24,16
150	0,41	0,15	12,37	16,67	5,51	24,16
500	0,32	0,04	12,09	14,89	5,01	24,11
1000	0,12	0,01	11,91	10,6	3,57	24,10

Concentración compuesto [μM]	Pretransición (enfriamiento)			Transición principal (enfriamiento)		
	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tp [°C]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tm [°C]
DMPC + Rivastigmina						
0	1,01	0,36	9,05	21,32	7,11	23,11
50	0,05	0,11	7,76	13,37	4,51	23,03
100	-	-	-	14,98	5,05	23,02
150	-	-	-	13,91	4,69	23,01
500	-	-	-	11,82	3,99	23,01
1000	-	-	-	4,51	1,54	22,91

**Tabla 7. 32: Parámetros termodinámicos de transición de la fase principal de liposomas multilamelares de DMPE puros, completamente hidratados y mezclas de DMPE/rivastigmina obtenidas a partir de exploraciones de calentamiento y enfriamiento recolectadas a una velocidad de calentamiento (enfriamiento) de 1 °C min<sup>-1</sup>. La precisión de la temperatura de transición de fase principal y la entalpía fue de ± 0.01 °C y ± 0.8 kJ / mol, respectivamente. (Fuente: Elaboración propia)**

Concentración compuesto [μM]	Transición principal (calentamiento)			Transición principal (enfriamiento)		
	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tp [°C]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tm [°C]
DMPE + Rivastigmina						
0	20,91	6,03	50,87	19,62	6,08	49,49
50	21,31	6,58	50,81	21,15	6,56	49,46
100	21,50	6,53	50,77	20,1	6,23	49,46
150	19,79	6,11	50,71	21,86	6,78	49,43
500	23,17	7,15	50,7	23,71	7,35	49,42
1000	24,52	7,57	50,7	23,39	7,25	49,41

**Tabla 7. 33: Parámetros termodinámicos de pretransición y transición de fase principal de liposomas multilamelares de DMPC puros, completamente hidratados y mezclas de DMPC/H1 obtenidos a partir de barridos de calentamiento y enfriamiento recolectadas a una velocidad de 1 °C min<sup>-1</sup> para ambos procesos. La precisión de la temperatura de transición de fase principal y la entalpía fue de ± 0.01 °C y ± 0.8 kJ/mol, respectivamente. (Fuente: Elaboración propia)**

Concentración compuesto [μM]	Pretransición (calentamiento)			Transición principal (calentamiento)		
	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tp [°C]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tm [°C]
DMPC + H1						
0	1,98	0,67	12,31	13,01	6,01	24,08
10	0,78	0,51	11,96	15,05	5,07	23,94
20	0,35	0,2	12,45	14,35	4,83	23,94
30	0,32	0,11	11,48	11,96	4,03	23,72
50	0,23	0,12	10,19	12,78	4,31	23,67
100	-	-	-	9,91	3,34	23,31

Concentración compuesto [μM]	Pretransición (enfriamiento)			Transición principal (enfriamiento)		
	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tp [°C]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tm [°C]
DMPC + H1						
0	1,03	0,35	9,01	20,32	6,61	23,12
10	0,09	0,03	8,17	14,92	5,04	22,88
20	0,04	0,1	8,05	13,21	4,46	22,85
30	-	-	-	12,14	4,11	22,64
50	-	-	-	11,73	4,64	22,61
100	-	-	-	10,1	3,79	19,88

**Tabla 7. 34: Parámetros termodinámicos de transición de la fase principal de liposomas multilamelares de DMPE puros, completamente hidratados y mezclas de DMPE/H1 obtenidas a partir de exploraciones de calentamiento y enfriamiento recolectadas a una velocidad de calentamiento (enfriamiento) de 1 °C min<sup>-1</sup>. La precisión de la temperatura de transición de fase principal y la entalpía fue de ± 0.01 °C y ± 0.8 kJ / mol, respectivamente. (Fuente: Elaboración propia)**

Concentración compuesto [μM]	Transición principal (calentamiento)			Transición principal (enfriamiento)		
	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tp [°C]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tm [°C]
DMPE + H1						
0	20,73	6,01	50,77	19,17	6,06	49,41
10	14,97	4,64	50,46	17,18	4,13	49,11
20	13,16	4,07	50,51	17,84	5,81	49,21
30	10,51	3,25	50,62	18,43	4,52	49,22
50	12,46	3,86	50,54	1,53	6,23	49,09
100	6,49	2,01	50,51	19,17	5,18	49,23

**Tabla 7. 35: Parámetros termodinámicos de pretransición y transición de fase principal de liposomas multilamelares de DMPC puros, completamente hidratados y mezclas de DMPC/H2 obtenidos a partir de barridos de calentamiento y enfriamiento recolectadas a una velocidad de 1 °C min<sup>-1</sup> para ambos procesos. La precisión de la temperatura de transición de fase principal y la entalpía fue de ± 0.01 °C y ± 0.8 kJ/mol, respectivamente. (Fuente: Elaboración propia)**

Concentración compuesto [μM]	Pretransición (calentamiento)			Transición principal (calentamiento)		
	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tp [°C]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tm [°C]
DMPC + H2						
0	1,97	0,69	12,54	13,06	4,41	24,08
10	1,47	0,52	12,61	18,47	6,21	24,11
20	0,29	0,11	12,25	12,43	4,18	24,09
30	0,1231	0,07	12,08	14,98	5,04	24,04
50	0,03	0,01	11,61	15,23	5,13	23,96
100	-	-	-	14,44	4,87	23,82

Concentración compuesto [μM]	Pretransición (enfriamiento)			Transición principal (enfriamiento)		
	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tp [°C]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tm [°C]
DMPC + H2						
0	1,01	0,32	9,11	20,19	6,98	23,02
10	1,33	0,5	8,48	18,21	6,15	22,97
20	0,15	0,05	8,38	13,5	4,56	22,95
30	0,19	-0,07	8,39	13,93	4,71	22,95
50	-	-	-	15,42	5,21	22,93
100	-	-	-	13,25	4,48	22,87

**Tabla 7. 36: Parámetros termodinámicos de transición de la fase principal de liposomas multilamelares de DMPE puros, completamente hidratados y mezclas de DMPE/H2 obtenidas a partir de exploraciones de calentamiento y enfriamiento recolectadas a una velocidad de calentamiento (enfriamiento) de 1 °C min<sup>-1</sup>. La precisión de la temperatura de transición de fase principal y la entalpía fue de ± 0.01 °C y ± 0.8 kJ / mol, respectivamente. (Fuente: Elaboración propia)**

Concentración compuesto [μM]	Transición principal (calentamiento)			Transición principal (enfriamiento)		
	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tp [°C]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tm [°C]
DMPE + H2						
3	20,12	6,18	50,76	19,43	6,01	49,64
0						
10	19,11	5,67	50,64	20,18	6,18	49,16
20	19,13	6,01	50,51	20,01	5,97	49,12
30	20,11	5,32	50,63	19,67	5,97	49,15
50	19,67	5,18	50,59	19,34	6,18	49,07
100	19,46	5,87	49,97	20,86	5,32	49,01

**Tabla 7. 37: Parámetros termodinámicos de pretransición y transición de fase principal de liposomas multilamelares de DMPC puros, completamente hidratados y mezclas de DMPC/H3 obtenidos a partir de barridos de calentamiento y enfriamiento recolectadas a una velocidad de 1 °C min<sup>-1</sup> para ambos procesos. La precisión de la temperatura de transición de fase principal y la entalpía fue de ± 0.01 °C y ± 0.8 kJ/mol, respectivamente. (Fuente: Elaboración propia)**

Concentración compuesto [μM]	Pretransición (calentamiento)			Transición principal (calentamiento)		
	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tp [°C]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tm [°C]
DMPC + H3						
0	2,17	0,76	14,01	19,03	6,17	24,03
10	0,84	0,31	10,74	11,01	3,71	23,92
20	0,09	0,03	10,02	10,52	3,54	23,87
30	-	-	-	10,21	3,67	23,76
50	-	-	-	7,25	2,45	22,34
100	-	-	-	8,99	3,33	22,46

Concentración compuesto [μM]	Pretransición (enfriamiento)			Transición principal (enfriamiento)		
	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tp [°C]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tm [°C]
DMPC + H3						
0	1,46	0,56	9,16	20,21	6,13	23,26
10	0,05	0,02	8,10	10,28	3,47	22,90
20	-	-	-	9,52	3,22	22,86
30	-	-	-	9,82	4,01	22,83
50	-	-	-	10,17	3,44	22,75
100	-	-	-	10,14	3,43	22,54

**Tabla 7. 38: Parámetros termodinámicos de transición de la fase principal de liposomas multilamelares de DMPE puros, completamente hidratados y mezclas de DMPE/H3 obtenidas a partir de exploraciones de calentamiento y enfriamiento recolectadas a una velocidad de calentamiento (enfriamiento) de 1 °C min<sup>-1</sup>. La precisión de la temperatura de transición de fase principal y la entalpía fue de ± 0.01 °C y ± 0.8 kJ / mol, respectivamente. (Fuente: Elaboración propia)**

Concentración compuesto [μM]	Transición principal (calentamiento)			Transición principal (enfriamiento)		
	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tp [°C]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tm [°C]
DMPE + H3						
0	20,14	6,34	50,91	18,36	6,01	49,34
10	19,34	6,73	50,87	17,68	5,97	49,18
20	20,02	5,86	50,74	19,36	6,76	49,11
30	21,03	6,32	50,72	21,11	5,96	49,10
50	23,65	5,78	50,76	19,03	6,86	49,11
100	21,13	6,01	50,63	18,67	6,78	49,13

**Tabla 7. 39: Parámetros termodinámicos de pretransición y transición de fase principal de liposomas multilamelares de DMPC puros, completamente hidratados y mezclas de DMPC/A $\beta$  (1-40) obtenidos a partir de barridos de calentamiento y enfriamiento recolectadas a una velocidad de 1 °C min<sup>-1</sup> para ambos procesos. La precisión de la temperatura de transición de fase principal y la entalpía fue de  $\pm 0.01$  °C y  $\pm 0.8$  kJ/mol, respectivamente. (Fuente: Elaboración propia)**

Concentración compuesto [ $\mu$ M]	Pretransición (calentamiento)			Transición principal (calentamiento)		
	$\Delta H$ [kJ/mol]	$\Delta S$ [J/mol K]	Tp [°C]	$\Delta H$ [kJ/mol]	$\Delta S$ [J/mol K]	Tm [°C]
DMPC + A $\beta$ (1-40)						
0	2,32	0,87	14,74	19,13	6,30	24,00
10	2,10	0,76	14,73	19,25	5,80	24,01
20	2,17	0,81	14,69	18,36	6,10	23,98
40	1,86	0,67	13,87	19,74	5,60	23,90
80	1,98	0,69	13,86	17,64	6,30	23,89

Concentración compuesto [ $\mu$ M]	Pretransición (enfriamiento)			Transición principal (enfriamiento)		
	$\Delta H$ [kJ/mol]	$\Delta S$ [J/mol K]	Tp [°C]	$\Delta H$ [kJ/mol]	$\Delta S$ [J/mol K]	Tm [°C]
DMPC + A $\beta$ (1-40)						
0	1,41	0,79	9,61	16,54	6,80	23,12
10	1,36	0,64	9,58	15,36	6,10	23,10
20	1,43	0,71	9,57	17,21	7,30	22,97
40	1,58	0,79	9,54	14,44	8,60	22,97
80	1,63	0,63	9,46	17,63	6,40	22,96

**Tabla 7. 40: Parámetros termodinámicos de transición de la fase principal de liposomas multilamelares de DMPE puros, completamente hidratados y mezclas de DMPE/A $\beta$  (1-40) obtenidas a partir de exploraciones de calentamiento y enfriamiento recolectadas a una velocidad de calentamiento (enfriamiento) de 1 °C min<sup>-1</sup>. La precisión de la temperatura de transición de fase principal y la entalpía fue de  $\pm 0.01$  °C y  $\pm 0.8$  kJ / mol, respectivamente. (Fuente: Elaboración propia)**

Concentración compuesto [ $\mu$ M]	Transición principal (calentamiento)			Transición principal (enfriamiento)		
	$\Delta H$ [kJ/mol]	$\Delta S$ [J/mol K]	Tp [°C]	$\Delta H$ [kJ/mol]	$\Delta S$ [J/mol K]	Tm [°C]
DMPE + A $\beta$ (1-40)						
0	20,01	5,86	50,77	17,36	6,34	49,51
10	19,44	6,72	50,75	19,44	6,12	49,47
20	18,36	6,11	50,74	20,13	5,76	49,50
40	19,01	5,13	50,74	18,18	7,81	49,43
80	18,76	6,78	50,72	19,71	5,17	49,32

**Tabla 7. 41: Parámetros termodinámicos de pretransición y transición de fase principal de liposomas multilamelares de DMPC puros, completamente hidratados y mezclas de DMPC/A $\beta$  (1-42) obtenidos a partir de barridos de calentamiento y enfriamiento recolectadas a una velocidad de 1 °C min<sup>-1</sup> para ambos procesos. La precisión de la temperatura de transición de fase principal y la entalpía fue de  $\pm 0.01$  °C y  $\pm 0.8$  kJ/mol, respectivamente. (Fuente: Elaboración propia)**

Concentración compuesto [ $\mu$ M]	Pretransición (calentamiento)			Transición principal (calentamiento)		
	$\Delta H$ [kJ/mol]	$\Delta S$ [J/mol K]	Tp [°C]	$\Delta H$ [kJ/mol]	$\Delta S$ [J/mol K]	Tm [°C]
DMPC + A $\beta$ (1-42)						
0	2,24	0,63	14,86	19,23	6,20	24,02
10	1,79	0,76	14,75	18,72	8,30	23,97
20	1,61	0,58	13,83	18,24	6,70	23,85
40	1,36	0,44	13,72	17,13	5,80	23,80
80	1,12	0,57	12,47	13,54	5,10	23,76

Concentración compuesto [ $\mu$ M]	Pretransición (enfriamiento)			Transición principal (enfriamiento)		
	$\Delta H$ [kJ/mol]	$\Delta S$ [J/mol K]	Tp [°C]	$\Delta H$ [kJ/mol]	$\Delta S$ [J/mol K]	Tm [°C]
DMPC + A $\beta$ (1-42)						
0	1,43	0,69	9,74	17,34	5,80	23,13
10	1,36	0,67	9,56	17,01	6,40	2,12
20	0,94	0,74	8,34	16,81	7,30	21,79
40	0,91	0,58	8,12	16,53	6,40	21,56
80	0,74	0,67	7,54	14,32	7,60	21,02

**Tabla 7. 42: Parámetros termodinámicos de transición de la fase principal de liposomas multilamelares de DMPE puros, completamente hidratados y mezclas de DMPE/A $\beta$  (1-42) obtenidas a partir de exploraciones de calentamiento y enfriamiento recolectadas a una velocidad de calentamiento (enfriamiento) de 1 °C min<sup>-1</sup>. La precisión de la temperatura de transición de fase principal y la entalpía fue de  $\pm 0.01$  °C y  $\pm 0.8$  kJ / mol, respectivamente. (Fuente: Elaboración propia)**

Concentración compuesto [ $\mu$ M]	Transición principal (calentamiento)			Transición principal (enfriamiento)		
	$\Delta H$ [kJ/mol]	$\Delta S$ [J/mol K]	Tp [°C]	$\Delta H$ [kJ/mol]	$\Delta S$ [J/mol K]	Tm [°C]
DMPE + A $\beta$ (1-42)						
0	23,13	6,01	50,8	17,15	6,19	49,86
10	20,07	5,36	50,79	18,43	5,78	49,84
20	19,76	6,84	50,8	18,12	6,36	49,86
40	19,86	5,96	50,78	17,23	6,17	49,74
80	20,07	6,17	50,79	17,56	5,34	49,8

## 12. PUBLICACIONES GENERADAS EN ESTA TESIS DOCTORAL.

### 12.1 Publicaciones generadas a partir de esta tesis.

1. **Zambrano, P.**, Suwalsky, M., Jemiola-Rzeminska, M., Strzalka, K., The acetylcholinesterase (AChE) inhibitor and anti-Alzheimer drug donepezil interacts with human erythrocytes. BBA-Biomembranes, 1861, 1078-1085 (2019).
2. **Zambrano, P.**, Suwalsky, M., Jemiola-Rzeminska, M., Strzalka, K. Studies on the interaction of NMDA receptor antagonist memantine with cell membranes: a mini-review. Chemico-Biological Interactions, 283, 47-50 (2018).
3. **Zambrano, P.**, Suwalsky, M., Villena, F., Jemiola-Rzeminska, M., Strzalka, K., In vitro effects of the anti-Alzheimer drug memantine on the human erythrocyte membrane and molecular models. Biochemical and Biophysical Research Communications, 483(1), 528-533 (2017).

### 12.2 Otras publicaciones generadas por el autor durante los estudios doctorales.

4. **Zambrano, P.**, Suwalsky, M., Jemiola-Rzeminska, M., Strzalka, K.  $\alpha$ 1- and  $\beta$ -adrenergic agonist labetalol induces morphological changes in human erythrocytes, Biochemical and Biophysical Research Communications, 503(1), 209-214 (2018).
5. Suwalsky, M., **Zambrano, P.**, Gallardo, M.J., Villena, F., Jemiola-Rzeminska, M., Strzalka, K., Effects of Thimerosal on Lipid Bilayers and Human Erythrocytes: An In Vitro Study. Journal of Membrane Biology, 249(6), 823-831 (2016)
6. Suwalsky, M., **Zambrano, P.**, Villena, F., Manrique-Moreno, M., Gallardo, M.J., Jemiola-Rzeminska, M., Strzalka, K., Edwards, A.M., Mennickent, S. Dukes, N., Morphological effects induced in vitro by propranolol on human erythrocytes. Journal of Membrane Biology 248(4), 683-93 (2015).

### 12.3 Publicaciones de divulgación en revistas internacionales.

7. **Zambrano, P.**, “Lindau: un encuentro de inspiración para jóvenes científicos”, Investigación y Ciencia (edición española de *Scientific American*), Barcelona, España. Nº504, Septiembre 2018.

#### **12.4 Participación en congresos nacionales e internacionales durante los estudios doctorales.**

1. 68<sup>th</sup> Lindau Nobel Laureate Meeting, Lindau, Alemania. (06/2018)
2. XXXII Chilean Chemical Conference, Chile (01/2018).
3. 5th European Joint Theoretical/Experimental Meeting on Membranes (EJTEMM2017). Poland (12/2017)
4. EMBL Conference: Revolutions in Structural Biology: Celebrating the 100th Anniversary of Sir John Kendrew. Germany (11/2017)
5. Advances in Protein Crystallography. Chile. (2016).
6. Rigaku OpenLab UNESCO-IUCr, Bolivia (2016).
7. 2nd Meeting of the Latin American Crystallographic Association (LACA). México. (2016).
8. X Meeting of the Argentine Association of Crystallography. Argentina. (2016)
9. VIII School of the Argentine Association of Crystallography. Argentina. (2016)
10. VII National Congress of Mexican Society of Crystallography, México (2016).
11. Bruker OpenLab II. Uruguay (2016)
12. 32nd Latin American Congress of Chemistry (CLAQ 2016) and XXXI Chilean Conference of Chemistry, Chile. (2016)
13. IX Meeting of the Argentine Association of Crystallography. Argentina. (2015)
14. VII School of the Argentine Association of Crystallography. Argentina. (2015)
15. 22nd Meeting of the Brazilian Crystallographic Association and 1st meeting of the Latin American Crystallographic Association (LACA). Brazil. (2015)
16. First Peruvian Congress of Crystallography and Polycrystals Course. Perú. (2015).
17. Scientific conferences in schools. Science Week in Chile. CONICYT - Explora Program. Chile. (2015)
18. VII Colloquium of Macromolecules, Chile. (2014)

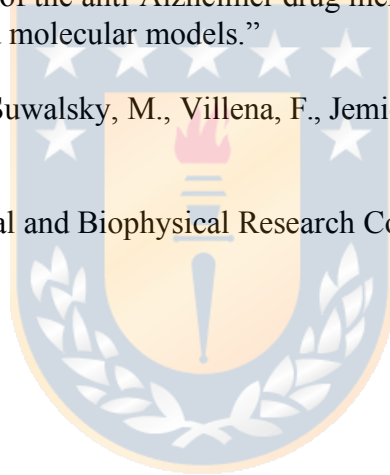


## Primer artículo.

**Nombre:** “In vitro effects of the anti-Alzheimer drug memantine on the human erythrocyte membrane and molecular models.”

**Autores:** Zambrano, P., Suwalsky, M., Villena, F., Jemiola-Rzeminska, M., Strzalka, K.,

**Publicado en:** Biochemical and Biophysical Research Communications, 483(1), 528-533 (2017).





## In vitro effects of the anti-Alzheimer drug memantine on the human erythrocyte membrane and molecular models



Pablo Zambrano<sup>a</sup>, Mario Suwalsky<sup>a,\*</sup>, Fernando Villena<sup>b</sup>,  
Malgorzata Jemiola-Rzeminska<sup>c,d</sup>, Kazimierz Strzalka<sup>c,d</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Chemical Sciences, University of Concepción, Concepción, Chile

<sup>b</sup> Faculty of Biological Sciences, University of Concepción, Concepción, Chile

<sup>c</sup> Malopolska Centre of Biotechnology, Jagiellonian University, Kraków, Poland

<sup>d</sup> Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Jagiellonian University, Kraków, Poland

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 29 November 2016

Accepted 16 December 2016

Available online 18 December 2016

#### Keywords:

Memantine

Human erythrocyte

Cell membrane

Phospholipid bilayer

### ABSTRACT

Memantine is a NMDA antagonist receptor clinically used for treating Alzheimer's disease. NMDA receptors are present in the human neurons and erythrocyte membranes. The aim of the present study was to investigate the effects of memantine on human erythrocytes. With this purpose, the drug was developed to in vitro interact with human red cells and bilayers built-up of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and dimyristoylphosphatidylethanolamine (DMPE). The latter represent lipids respectively present in both outer and inner monolayers of the red cell membrane. Results obtained by scanning electron microscopy (SEM) showed that memantine changed the normal biconcave shape of red cells to cup-shaped stomatocytes. According to the bilayer-couple hypothesis the drug intercalated into the inner monolayer of the erythrocyte membrane. Experimental results obtained by X-ray diffraction on multibilayers of DMPC and DMPE, and by differential scanning calorimetry on multilamellar vesicles indicated that memantine preferentially interacted with DMPC in a concentration-dependent manner. Thus, it can be concluded that in the low therapeutic plasma concentration of circa 1  $\mu\text{M}$  memantine is located in NMDA receptor channel without affecting the erythrocyte shape. However, at higher concentrations, once the receptors became saturated excess of memantine molecules (20  $\mu\text{M}$ ) would interact with phosphoinositide lipids present in the inner monolayer of the erythrocyte membrane inducing the formation of stomatocytes. However, 40–50  $\mu\text{M}$  memantine was required to interact with isolated phosphatidylcholine bilayers.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a progressive age related neurodegenerative disorder affecting millions of people worldwide. It involves the loss of neurons in areas of the brain responsible for cognitive functions including language, behavior, learning and memory [1]. Although there are many theories to describe the pathogenesis of AD, one of the most recent attributes the disorder to a calcium overload that results in neurodegeneration and cell apoptosis. The loss of neurons, particularly cholinergic neurons, is

*Abbreviations:* SEM, scanning electron microscopy; DSC, differential scanning calorimetry; DMPC, dimyristoylphosphatidylcholine; DMPE, dimyristoylphosphatidylethanolamine.

\* Corresponding author.

E-mail address: [msuwalsk@udec.cl](mailto:msuwalsk@udec.cl) (M. Suwalsky).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.12.111>

0006-291X/© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

believed to occur, at least partially as a result of excitotoxic injury induced by an excess of glutamate levels in the synaptic cleft and over-stimulation of the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor that controls a ligand- and voltage-gated ion channel [2,3]. Calcium crosses the cell membrane via NMDA receptor, whereas the over-stimulation of NMDA receptor can result in excessive increases in intracellular calcium concentrations and might contribute to both acute and chronic forms of neurodegeneration [4]. Today, two main pharmacological classes of drugs are already available for patients suffering from AD: cholinesterase and NMDA inhibitors [5]. Memantine, (3,5-dimethyladamantan-1-amine) is an NMDA receptor antagonist clinically used for the treatment of moderate-to-severe AD. Its clinical use has been approved by the Food and Drug Administration (FDA) in the United States, as well as in Europe [4,5]. Memantine has a three-ring structure with a bridgehead amine group that is protonated under physiological conditions carrying a

positive charge ( $\text{NH}_3^+$ ), and has two methyl side groups [6,7]. It is thought to function by preferentially blocking open NMDA channels in a reversible way. As reported that human red cells contain NMDA receptors on their surfaces [8] it is considered of interest to study the interaction between memantine and human erythrocytes. These cells are a suitable and simple model for this type of study because they have no organelles and have a unique membrane [9,10]. The studies were performed by scanning electron microscopy. Experiments were also carried out in molecular models of the erythrocyte membrane. They consisted in bilayers built-up of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and dimyristoylphosphatidylethanolamine (DMPE), classes of lipids located in the outer and inner monolayers of the red cell membrane, respectively [11,12]. Memantine interactions with DMPC and DMPE were determined by X-ray diffraction and differential scanning calorimetry (DSC). Other therapeutic drugs, such as the antiviral and antiparkinson agent amantadine [13], the beta blocker propranolol [14] and the non-steroidal antiinflammatories diclofenac, naproxen and ibuprofen [15] were also studied by these methods and techniques.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Scanning electron microscopy (SEM) observations of human red cells

One to two blood drops from the finger of a healthy donor without receiving pharmacological treatment were collected in an Eppendorf tube containing 1 ml of phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4 and 1 mg/ml of BSA (Bovine Serum Albumin). Red blood cells (RBC) were centrifuged (1000 rpm  $\times$  10 min), washed three times in PBS and BSA, placed in Eppendorf tubes and then centrifuged again. The supernatants were replaced by 150  $\mu\text{l}$  of memantine in PBS and BSA in a concentration range of 20  $\mu\text{M}$ –60  $\mu\text{M}$ , and incubated at 37  $^\circ\text{C}$  for 1 h. Controls corresponded to cells suspended in PBS and BSA without memantine. Samples were incubated at 37  $^\circ\text{C}$  for 1 h and centrifuged at 1000 rpm for 10 min, replacing the supernatant with 150  $\mu\text{l}$  of 2.5% glutaraldehyde and left to rest for 24 h at 4  $^\circ\text{C}$ . Samples were washed three times in distilled water and centrifuged (1000 rpm  $\times$  10 min); about 10  $\mu\text{l}$  of each sample were placed on siliconized Al glass covered stubs, air-dried at room temperature, gold coated for 3 min at 13.3 Pa in a sputter device (Edwards S 150, Sussex, England), and examined in a scanning electron microscope (JEOL JSM-6380LV, Japan).

### 2.2. X-ray diffraction analysis of DMPC and DMPE multilayers

Synthetic DMPC (lot SLBD7363V, MW 677.9) and DMPE (lot SLBF8298V, MW 635.9) from Sigma (St. Louis, MO), and memantine hydrochloride (lot MKBS2264V, MW 215.8, 99%) from Aldrich (Milwaukee, WI) were used without further purification. Approximately 2 mg of each phospholipid was introduced into Eppendorf tubes which were then filled with 150  $\mu\text{l}$  of (a) distilled water and (b) aqueous solutions of memantine in a range of concentrations (20  $\mu\text{M}$ –80  $\mu\text{M}$  for DMPC and DMPE). The specimens were shaken and incubated for 30 min at 30  $^\circ\text{C}$  and 60  $^\circ\text{C}$  with DMPC and DMPE, respectively. Then, the samples were introduced in 1.5 mm diameter special glass capillaries (Glas-Technik&Konstruktion, Berlin, Germany) and centrifuged for 10 min to 2500 rpm (Selecta Centrifuge, Mixtasel Model, Spain). Ni-filtered  $\text{CuK}\alpha$  (1.5418  $\text{\AA}$ ) radiation from a Bruker Kristalloflex 760 (Karlsruhe, Germany) X-ray generator was used. The relative reflection intensities were obtained in an MBraun PSD-50 M linear position-sensitive detector system (Garching, Germany) and no correction factors were applied. The experiments were performed at  $18 \pm 1$   $^\circ\text{C}$ , which is

below the main phase transition temperature of both phospholipids. Higher temperatures would have induced transitions onto more fluid phases making the detection of structural changes harder. Each experiment was performed in triplicate.

### 2.3. Differential scanning calorimetry (DSC) analysis of DMPC and DMPE liposomes

In order to obtain DMPC and DMPE thermograms, appropriate amounts of phospholipids dissolved in chloroform were placed to get the final lipid concentration in each test tube of 1 mM. The solvent was removed with a gentle stream of pure nitrogen gas to form a thin film on the walls of the glass test tube. Subsequently, the films were hydrated with distilled water and multilamellar liposomes (MLV) were prepared by vortexing the samples at a temperature higher than that of the gel-to-liquid crystalline phase transition of pure phospholipid (about 30  $^\circ\text{C}$  and 60  $^\circ\text{C}$  for DMPC and DMPE, respectively). DSC experiments were performed using NANO DSC Series III System with Platinum Capillary Cell (TA Instruments, New Castle, USA) with an active volume of 300  $\mu\text{l}$ . Bubble formation were avoided by heating the samples, which were degassed prior to being loaded by pulling a vacuum of 0.03–0.05 MPa on the solution for a period of 10–15 min. Each sample cell was filled with 300  $\mu\text{l}$  of sample solution and the same volume of water was used as a reference, the cells were sealed and thermally equilibrated for about 10 min at the starting temperature of the run. All measurements were performed on samples under 0.3 MPa pressure. Data were collected in the range of 5  $^\circ\text{C}$ –40  $^\circ\text{C}$  (DMPC) and 30  $^\circ\text{C}$ –70  $^\circ\text{C}$  (DMPE) at the scan rate 1  $^\circ\text{C min}^{-1}$  both for heating and cooling. Thermograms were corrected by subtraction of buffer blank scans and normalized to the lipid concentration. All samples were prepared and recorded at least three times and each data set was analysed for thermodynamic parameters with the software package from TA Instruments.

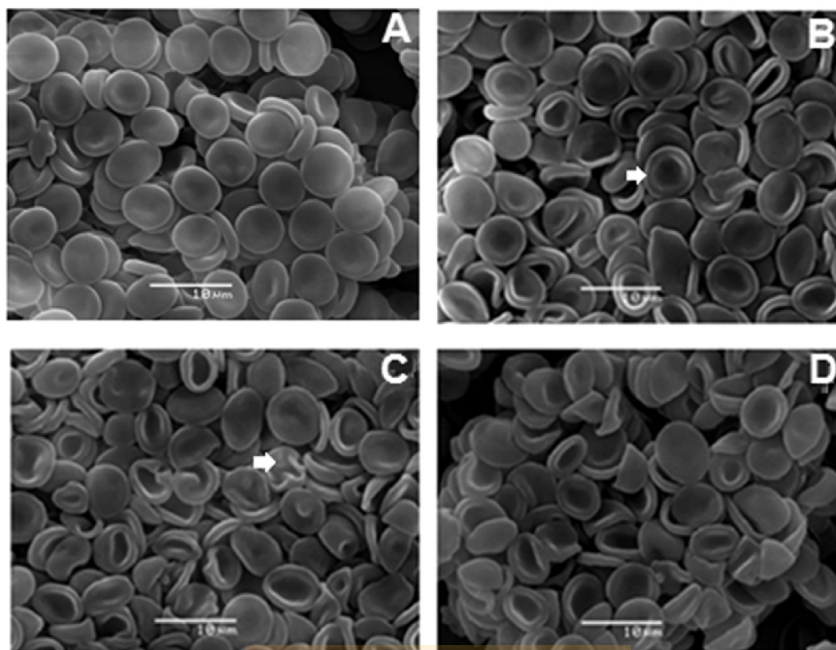
## 3. Results

### 3.1. Scanning electron microscopy (SEM) observations of human red cells

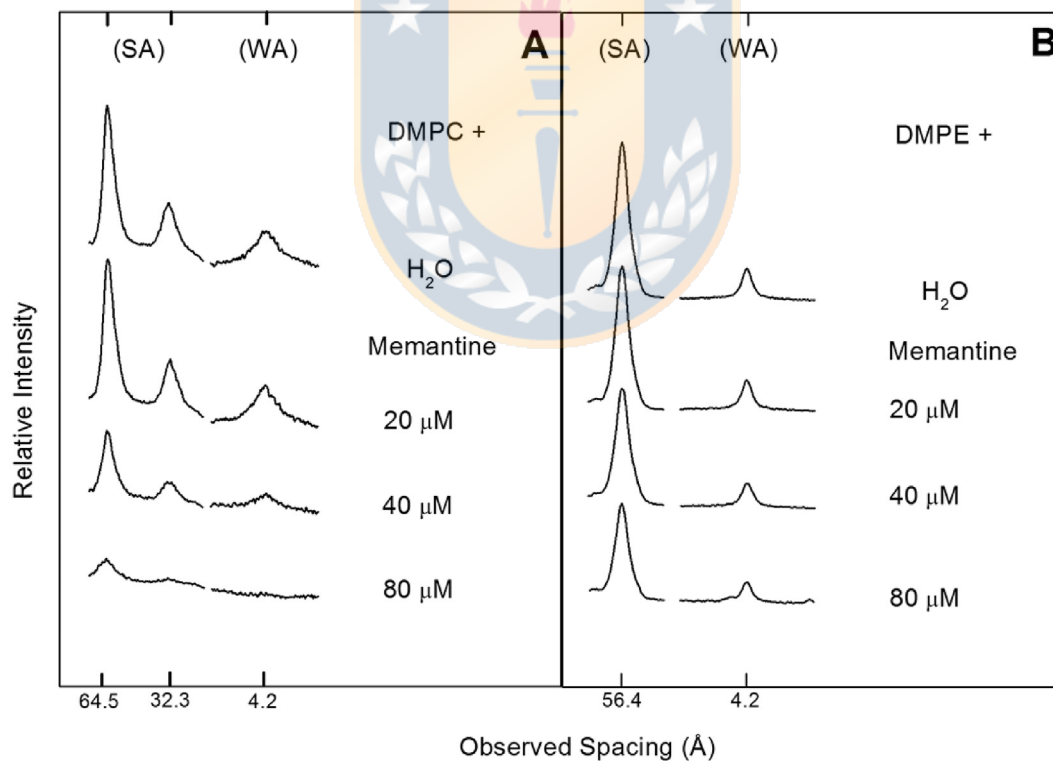
The resulting images of the interaction of memantine with human erythrocytes (Fig. 1) indicate that the drug induced changes in the morphology of the red blood cells. The average normal shape of the human red blood cell incubated in PBS (pH 7.4, control, Fig. 1A) is a flat biconcave disc (discocyte)  $\sim 8$   $\mu\text{m}$  diameter. Morphological analysis of the results has revealed that memantine changed the normal shape of the red blood cells in a dose-dependent manner. Fig. 1B (20  $\mu\text{M}$ ) shows that discocytes underwent a partial transformation into stomatocytes (cup-shaped cells). With 40  $\mu\text{M}$  and 60  $\mu\text{M}$  memantine (Fig. 1C and D) knizocytes (cells with two or three concavities) and stomatocytes were observed.

### 3.2. X-ray diffraction analysis of DMPC and DMPE multilayers

Results related to the application of this technique can be observed in Fig. 2. In addition, Fig. 2A exhibits results obtained by incubating DMPC with water and aqueous memantine solutions. Water altered the structure of DMPC as its bilayer repeat increased from about 55  $\text{\AA}$  in its dry crystalline form to 65  $\text{\AA}$  when immersed in water, and its small-angle reflections were reduced to only the first two orders of the bilayer width. On the other hand, a strong reflection of 4.2  $\text{\AA}$  located in the wide angle region corresponds to the average distance between fully extended acyl chains organized with rotational disorder in hexagonal packing. The figure discloses that after exposure to memantine in the range 20  $\mu\text{M}$ –80  $\mu\text{M}$  there



**Fig. 1.** Effect of memantine on the morphology of human erythrocytes. Images obtained by scanning electron microscopy (SEM) of (A) Control; (B) 20  $\mu\text{M}$ ; (C) 40  $\mu\text{M}$ ; (D) 60  $\mu\text{M}$  memantine. Arrows in Fig. 1B and C highlight a stomatocyte and a knizocyte, respectively.



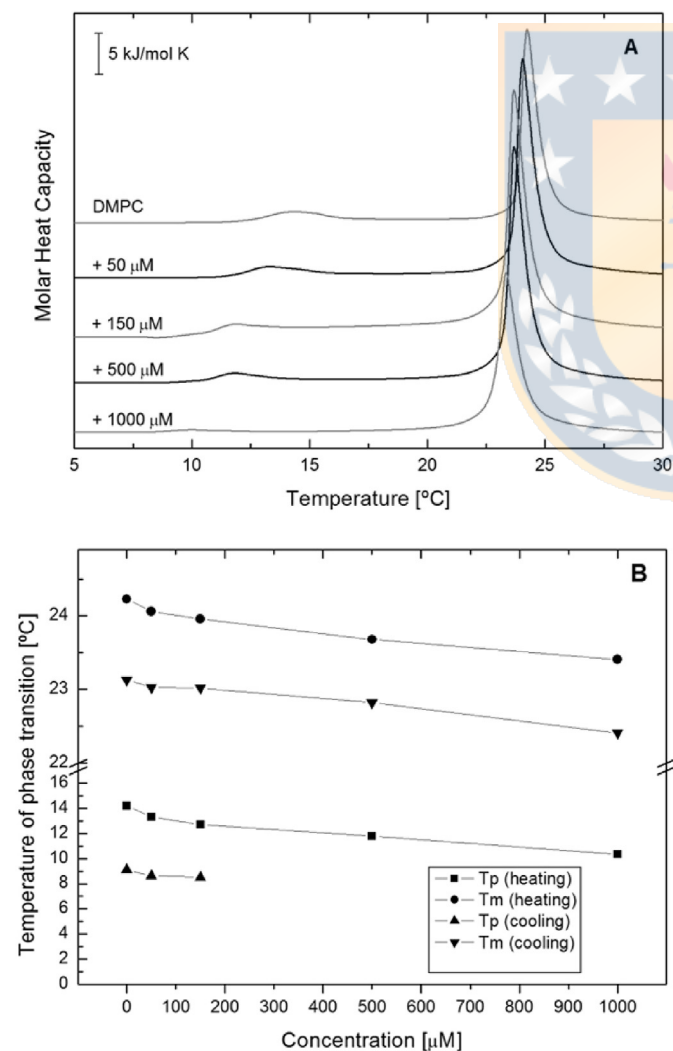
**Fig. 2.** Microdensitograms from X-ray diffraction patterns of (A) dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and (B) dimyristoylphosphatidylethanolamine (DMPE) in water and incubated with memantine; (SA) small-angle and (WA) wide-angle reflections.

was a gradual weakening of the lipid reflection intensities. Fig. 2A also shows that with memantine 80  $\mu\text{M}$  most of the existing DMPC reflections disappeared. From these results it can be concluded that memantine produced a structural perturbation of both the polar and the acyl hydrophobic regions of DMPC bilayers. Fig. 2B shows

the results of the X-ray diffraction analysis of DMPE bilayers incubated with water and memantine. As previously reported [16], water caused no significant effect on DMPE bilayers. On the other hand, increasing memantine concentrations up to 80  $\mu\text{M}$  induced no significant changes on DMPE X-ray diffraction patterns.

### 3.3. Differential scanning calorimetry (DSC) analysis of DMPC and DMPE liposomes

The results of the DSC experiments performed on DMPC multilamellar vesicles (MLVs) are shown in Fig. 3A. When fully hydrated, they show a known and well defined thermotropic feature. In the temperature range from 5 °C to 30 °C, DMPC liposomes exhibited a strong and sharp peak of main transition at 24.23 °C (Table 1), with an enthalpy change ( $\Delta H$ ) of 18.46 kJ mol<sup>-1</sup> corresponding to the conversion of rippled gel phase ( $P_{\beta}$ ) to the lamellar liquid-crystal  $L_{\alpha}$  phase. In addition to this main transition peak, a small peak also appeared at 14.22 °C with a  $\Delta H$  of 2.36 kJ mol<sup>-1</sup> corresponding to the  $L_{\beta} \rightarrow P_{\beta}$  transformation, called pretransition. These results are consistent with previous reports in literature [17]. The presence of memantine induced a perturbation of the thermotropic behavior of DMPC vesicles. It can be observed that the main phase transition was displaced by 0.82 °C whereas pretransition had a marked shift of 3.87 °C for 1 mM concentration, both following a concentration-dependent performance (Fig. 3B). As the memantine content increased, pretransition peak was lowered and even disappeared completely under cooling. Fig. 4A shows



**Fig. 3.** (A) Representative DSC curves obtained for multilamellar DMPC liposomes containing different memantine concentrations. Scans were recorded at a heating rate of 1 °C min<sup>-1</sup>; (B) a plot of phase transition temperature of DMPC multilamellar liposomes determined for cooling and heating scans as a function of memantine concentration.

the results of the DSC experiments for DMPE vesicles in presence of memantine. In the temperature range from 30 °C to 70 °C, DMPE liposomes showed a single, strong and sharp peak of transition at 50.74 °C (Table 1) with a  $\Delta H$  of 21.60 kJ mol<sup>-1</sup> from the conversion of gel-to-liquid-crystal phase. These calorimetric parameters are consistent with those found in literature [18]. When memantine was added, the thermotropic performance of DMPE was only slightly affected and a downshift of the transition temperature not exceeding 0.1 °C was observed for highest drug content. For all DSC data given, the transition temperature corresponds to the maximum value of the peak and the transition enthalpy corresponds to the integrated area under the curve divided by the concentration of phospholipid. Full datasets of thermodynamic parameters including temperature, entropy and enthalpy values are shown in Tables 1 and 2 for DMPC and DMPE, respectively.

## 4. Discussion

Memantine is an NMDA antagonist receptor clinically used for treating moderate-to-severe AD. The NMDA receptors are arranged as a dimer of GluN1-GluN2B heterodimers with a twofold symmetry axis along the entire molecule composed of an amino terminal domain, a ligand-binding domain, and a trans-membrane domain; the latter constitute the heterotetrameric ion channel formed by the GluN1 and GluN2B subunits [19]. NMDA receptors require the agonists glutamate and glycine to activate the receptor, a high permeability of the channel to calcium ions, and a voltage-dependent block of channel by magnesium ions [20]. On the other hand, memantine has a three-ring structure with a bridge-head amine group that is protonated under physiological conditions carrying a positive charge ( $-\text{NH}_3^+$ ), and has two methyl side groups [6]. The diameter at the narrow constriction of the NMDA-receptor channel, the N site of NR1, is 5.5 Å [20]. The 5.5 Å widest dimension of memantine is a good match to the dimensions of the pore constriction [21]. The primary binding sites of memantine would involve an interaction between its charged amino group and the side chain of an Asn residue in the GluN1 subunit, whereas its two methyl groups would bind the A645 and A644 residues on the third transmembrane helices of GluN1 and GluN2B, respectively [7]. NMDA receptors have been identified in the brain; however, human red cells express NMDA receptors on their surfaces [8]. Therefore, it is considered of interest to study the interaction of memantine with human erythrocytes in order to understand the molecular mechanism of its interaction with NMDA. According to SEM results, human red blood cells gradually changed their discocyte normal shape to cup-shaped stomatocytes from 20 μM and higher concentrations of memantine (Fig. 1). This result does not agree with those reported by Reinhart et al. [8] and Kuskonmaz et al. [22] who found that memantine even at a higher concentration (100 μM) does not affect hemorheological parameters such as red blood cell deformability or aggregability in healthy human subjects. According to the bilayer couple hypothesis [23], morphology changes induced by external molecules are due to a differential expansion of two monolayers of the erythrocyte membrane. Thus, stomatocytes are formed when molecules are inserted in the inner monolayer, while echinocytes (spiculated shaped) are formed when the molecule is inserted into the outer monolayer. The preferential interaction of memantine with DMPC, a class of lipid mainly located in the outer monolayer of the red cell membrane should have induced echinocytosis instead of the observed stomatocytosis. Several hypothetical mechanisms might explain this apparent anomaly. One of them is the lipid scrambling mechanism, based on the redistribution of membrane lipids. Accordingly, memantine would produce a rapid movement of phosphatidylcholines (PC) and sphingomyelins towards the inner

**Table 1**  
Thermodynamic parameters of the pretransition and main phase transition of pure, fully hydrated DMPC multilamellar liposomes and DMPC/memantine mixtures determined from heating and cooling scans collected at a heating (cooling) rate of 1 °C min<sup>-1</sup>. The accuracy for the main phase transition temperature and enthalpy was ±0.01 °C and ±0.8 kJ/mol, respectively.

Compound Conc [μM]	Pretransition heating			Main transition heating		
DMPC + Memantine	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tp [°C]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tm [°C]
0	2.36	0.82	14.22	18.46	6.21	24.23
50	1.89	0.66	13.33	22.60	7.61	24.06
150	1.52	0.54	12.72	20.97	7.06	23.96
500	1.32	0.46	11.79	27.37	9.22	23.69
1000	0.28	0.01	10.35	22.26	7.50	23.41

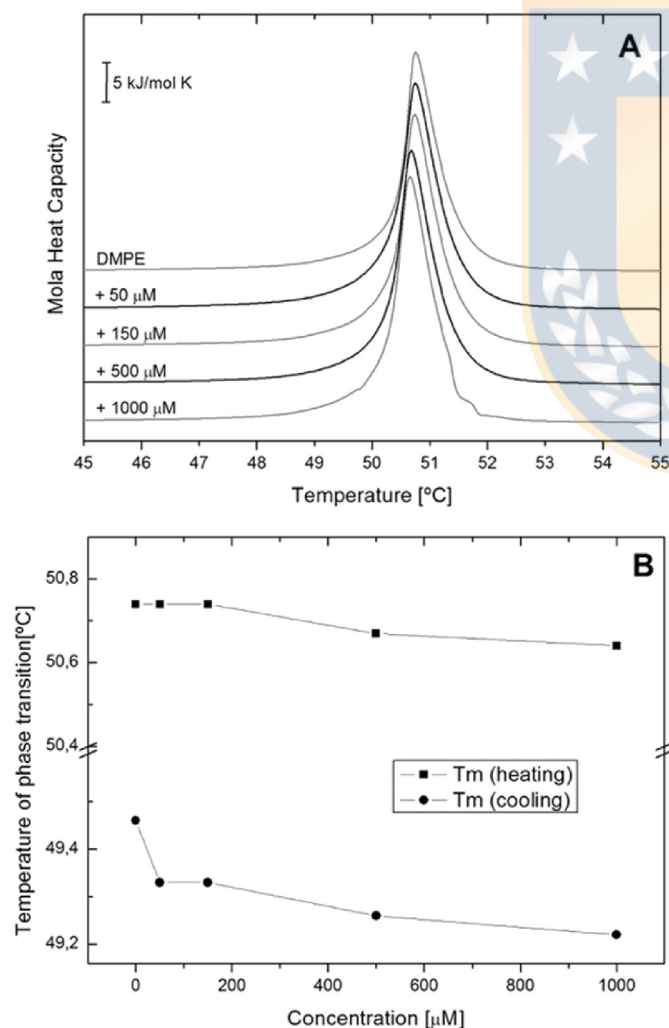
  

Compound Conc [μM]	Pretransition cooling			Main transition cooling		
DMPC + Memantine	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tp [°C]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	Tm [°C]
0	1.02	0.44	9.11	21.43	7.20	23.13
50	0.40	0.10	8.63	21.30	7.20	23.03
150	0.14	0.01	8.53	20.19	6.80	23.02
500	–	–	–	18.14	6.10	22.82
1000	–	–	–	12.42	4.20	22.41

monolayer, and the outward displacement of phosphatidylethanolamines and phosphatidylserines [24]. Thus, the interaction of memantine with PCs in the inner monolayer would induce the formation of stomatocytes, effect that can be produced by as little

as 0.6% memantine in the inner membrane moiety [24]. Another possible mechanism is the interaction of memantine with a protein present in the erythrocyte membrane such as spectrine [25]. However, the most plausible explanation would imply the intercalation of memantine molecules in the inner monolayer where the interaction with polyphosphoinositide lipids becomes feasible [26]. They form a minor component on the cytosolic side of eukaryotic cell membranes, where the phosphate group gives the molecules a negative charge at physiological pH [26,27]. Being memantine an amphipathic molecule, its hydrophobic three-ring structure would be located in the acyl-chain region of the bilayer, while its positively charged amino group would be electrostatically bound to the phosphatidylinositol negatively charged phosphate group. A rather similar mechanism has been proposed by Chen et al. [26] for the amphipathic drug chlorpromazine.

Interactions between drugs and cell membranes are related to aspects such as drug delivery, segregation, distribution, efficacy and resistance [28]. Molecular models of cell membranes constituted by lipid bilayers are commonly used as alternatives of real cell membranes in order to investigate their interactions with biologically relevant molecules. Additional experiments were carried out in DMPC and DMPE bilayers, classes of lipids found in the outer and inner monolayers of the human erythrocyte membrane. X-ray diffraction and DSC results showed that memantine preferentially interacted with DMPC. DMPC and DMPE differ only in their terminal amino groups, which are <sup>+</sup>N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> in DMPC and <sup>+</sup>NH<sub>3</sub> in DMPE. DMPE smaller polar group and higher effective charge generates a more stable bilayer system sustained by hydrogen bonds and electrostatic interactions [16]. As a result, the tight DMPE molecular packing is not significantly affected by water neither by memantine (Fig. 2B). Conversely, water fills DMPC highly polar interbilayer spaces resulting in an increase of its bilayer separation. As a consequence, memantine molecules might insert into DMPC bilayers and induce structural perturbations. Details of PC and PE fully hydrated gel phases have been reported elsewhere [16,29,30]. It is very likely that the tricyclodecane structure of memantine is in contact with DMPC acyl chains, while the positively charged amino group interacts with the negatively charged phosphate polar head groups of the lipid. These last interactions might generate a weakening of the electrostatic attractions and hydrogen bonds that maintain DMPC molecules in the bilayer arrangement. These results do not agree with those reported in the literature. Whereas Li et al. [28] indicated a negligible interaction between 5 mM memantine and PC bilayers, molecular dynamics calculations performed by Chew et al. concluded that the drug located into the interfacial region of POPC bilayers [31].



**Fig. 4.** (A) Representative DSC curves obtained for multilamellar DMPE liposomes containing different memantine concentrations. Scans were recorded at a heating rate of 1 °C min<sup>-1</sup>; (B) a plot of phase transition temperature of DMPE multilamellar liposomes determined for cooling and heating scans as a function of memantine concentration.

**Table 2**

Thermodynamic parameters of the main phase transition of pure, fully hydrated DMPE multilamellar liposomes and DMPE/memantine mixtures determined from heating and cooling scans collected at a heating (cooling) rate of 1 °C min<sup>-1</sup>. The accuracy for the main phase transition temperature and enthalpy was ±0.01 °C and ±0.8 kJ/mol, respectively.

Compound Conc [μM]	Main transition heating			Main transition cooling		
	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	T <sub>m</sub> [°C]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/mol K]	T <sub>m</sub> [°C]
DMPE + Memantine						
0	21.60	6.7	50.74	22.951	7.1	49.46
50	24.67	7.6	50.74	26.160	8.1	49.33
150	24.58	7.6	50.74	25.952	8.0	49.33
500	24.81	7.7	50.67	26.001	8.1	49.26
1000	25.62	7.9	50.64	26.941	8.4	49.22

Our X-ray and DSC experimental results on lipid bilayers tend to indicate that memantine molecules would be inserted into the outer monolayer of the erythrocyte membrane. However, the shape change to stomatocytes induced by memantine to human erythrocytes might be explained by its location in the inner moiety of the cell membrane as described above. We now conclude that the explanation for the observed differences of the experimental results might lie in the different memantine concentrations used in this study. At low concentrations, of the order of 1 μM as reported in human plasma when it is therapeutically applied [32] memantine would locate in the NMDA receptor channel without affecting the erythrocyte shape. Once the receptors become saturated excess of memantine molecules (20 μM) would interact with a lipid located in the inner monolayer of the erythrocyte membrane inducing the formation of stomatocytes. However, 40–50 μM memantine is required to interact with isolated phosphatidylcholine bilayers and does therefore not apply at therapeutic concentrations.

### Conflict of interest

We do not have any conflict of interest.

### Acknowledgements

To FONDECYT (Project 1130043) and CONICYT-PCHA (Doctorado Nacional/2016-21160337 to P. Zambrano). Calorimetric measurements were carried out using the instrument purchased thanks to financial support of European Regional Development Fund (contract No. POIG.02.01.00-12-167/08, project Malopolska Centre of Biotechnology). Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology of Jagiellonian University is a partner of the Leading National Research Center (KNOW) supported by the Ministry of Science and Higher Education.

### References

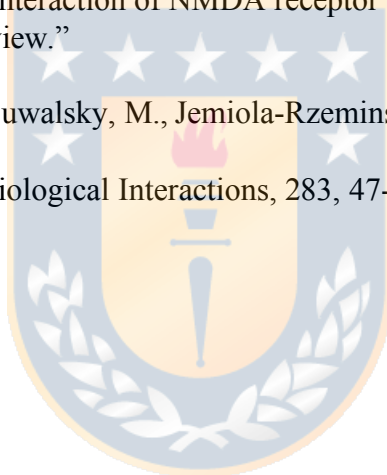
- [1] M.R. Farlow, NMDA receptor antagonists: a new therapeutic approach to Alzheimer's disease, *Geriatrics* 59 (2004) 22–27.
- [2] B. Reisberg, R. Doody, A. Stöffler, F. Schmitt, S. Ferris, H.J. Möbius, Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease, *N. Engl. J. Med.* 348 (2003) 1333–1341.
- [3] D.M. Robinson, G.M. Keating, Memantine: a review of its use in Alzheimer's disease, *Drugs* 66 (2006) 1515–1534.
- [4] Z. Yang, X. Zhou, Q. Zhang, Effectiveness and safety of memantine treatment for Alzheimer's disease, *J. Alzheimer's Dis.* 36 (2013) 445–458.
- [5] A. Gallini, A. Sommet, J.L. Montastruc, Does memantine induce bradycardia? A study in the french pharmaco vigilance database, *pharmacoepidemiol, Drug Saf.* 17 (2008) 877–881.
- [6] S.A. Lipton, Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond, *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (2006) 160–170.
- [7] W. Limapichat, W.Y. Yu, E. Branigan, H.A. Lester, D.A. Dougherty, Key binding interactions for memantine in the NMDA receptor, *ACS Chem. Neurosci.* 4 (2013) 255–260.
- [8] W.H. Reinhart, A. Bogdanova, Activation of N-methyl D-aspartate (NMDA) Receptors Has No Influence on Rheological Properties of Erythrocytes, vol. 49, 2011, pp. 307–313.
- [9] J.Y. Chen, W.H. Huestis, Role of membrane lipid distribution in chlorpromazine-induced shape change of human erythrocytes, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1323 (1997) 299–309.
- [10] H.L. Brockman, M.M. Momsen, J.R. Knudtson, S.T. Miller, G. Graff, J.M. Yanni, Interactions of olopatadine and selected antihistamines with model and natural membranes, *Ocul. Immunol. Inflamm.* 11 (2003) 247–268.
- [11] J.M. Boon, B.D. Smith, Chemical control of phospholipid distribution across bilayer membranes, *Med. Res. Rev.* 22 (2002) 251–281.
- [12] P.F. Devaux, A. Zachowsky, Maintenance and consequences of membrane phospholipids asymmetry, *Chem. Phys. Lipids* 73 (1994) 107–120.
- [13] M. Suwalsky, M. Jemiola-Rzeminska, M. Altamirano, F. Villena, N. Dukes, K. Strzalka, Biophysical Chemistry Interactions of the antiviral and anti-parkinson agent amantadine with lipid membranes and human erythrocytes, *Biophys. Chem.* 202 (2015) 13–20.
- [14] M. Suwalsky, P. Zambrano, F. Villena, M. Manrique-Moreno, M.J. Gallardo, M. Jemiola-Rzeminska, et al., Morphological effects induced in vitro by propranolol on human erythrocytes, *J. Membr. Biol.* 248 (2015) 683–693.
- [15] M. Manrique-Moreno, P. Garidel, M. Suwalsky, J. Howe, K. Brandenburg, The membrane activity of Ibuprofen, Diclofenac, and Naproxen: a physico-chemical study with lecithin phospholipids, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1788 (2009) 1296–1303.
- [16] M. Suwalsky, Polymeric materials encyclopedia, in: J.C. Salamone (Ed.), *Phospholipid Bilayers*, vol. 7, CRC, Boca Raton, FL, 1996, pp. 5073–5078.
- [17] R. Koynova, M. Caffrey, Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines, *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* 1376 (1998) 91–145.
- [18] R.N. Lewis, R.N. McElhane, Calorimetric and spectroscopic studies of the polymorphic phase behavior of a homologous series of n-saturated 1,2-diacyl phosphatidylethanolamines, *Biophys. J.* 64 (1993) 1081–1096.
- [19] E. Karakas, H. Furukawa, Crystal structure of as heterotetrameric NMDA receptor ion channel, *Science* 344 (2014) 992–997.
- [20] K. Kashiwagi, T. Masuko, C.D. Nguyen, T. Kuno, I. Tanaka, K. Igarashi, K. Williams, Channel blockers acting at N-methyl-D-aspartate receptors: differential effects of mutations in the vestibule and ion channel pore, *Mol. Pharmacol.* 61 (2002) 533–545.
- [21] K.-K. Tai, S.E. Blondelle, J.M. Ostrech, R.A. Houghten, M. Motal, An N-methyl-D-aspartate receptor channel blocker with neuroprotective activity, *PNAS* 98 (2001) 3519–3524.
- [22] S. Kuskonmaz, E. Cicek, F.M. Comu, M. Aslan, O. Kurtipek, Effect of propofol and memantine on erythrocyte deformability in diabetic rat model, *Med. Sci. Discov.* 2 (2015) 221–224.
- [23] M.P. Sheetz, S.J. Singer, Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71 (1974) 4457–4461.
- [24] S.L. Schrier, A. Zachowsky, P.F. Devaux, Mechanisms of amphipath-induced stomatocytosis in human erythrocytes, *Blood* 79 (1992) 782–786.
- [25] A. Enomoto, Y. Tatakawa, S. Manno, A. Tanaka, N. Mohandas, Regulation of erythrocyte ghost membrane mechanical stability by chlorpromazine, *Biochim. Biophys. Acta* 1512 (2001) 285–290.
- [26] J.Y. Chen, L.S. Brunauer, F.C. Chu, C.M. Hessel, M.M. Gedde, W.H. Huestis, Selective amphipathic nature of chlorpromazine binding to plasma membrane bilayers, *Biochim. Biophys. Acta* 1616 (2003) 95–105.
- [27] J.E. Ferrel Jr., W.H. Huestis, Phosphoinositide metabolism and the morphology of human erythrocytes, *J. Cell. Biol.* 98 (1984) 1992–1998.
- [28] B. Li, H. Wang, P. Feng, X. Han, Z. Chen, X. Lu, et al., Qualitative and Quantitative Analyses of the Molecular-level Interaction between Memantine and Model Cell Membranes, 2015.
- [29] P.C. Mason, J.F. Nagle, R.M. Eppard, J. Katsaras, Anomalous swelling in phospholipid bilayers is not coupled to the formation of a ripple phase, *Phys. Rev. E* 63 (2001) 309021–309024.
- [30] J. Katsaras, S. Tristram-Nagle, Y. Liu, R.L. Headrick, E. Fontes, P.C. Mason, J. Nagle, Clarification of the ripple phase of lecithin bilayers using fully hydrated, aligned samples, *Phys. Rev. E* 61 (2000) 5668–5677.
- [31] C.F. Chew, A. Guy, P.C. Biggin, Distribution and Dynamics of Adamantanes in a Lipid Bilayer, vol. 95, 2008, pp. 5627–5636.
- [32] G. Rammes, W. Danysz, C.G. Parsons, Pharmacodynamics of memantine: an update, *Curr. Neuropharmacol.* 6 (2008) 55–78.

## Segundo artículo.

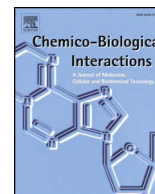
**Nombre:** “Studies on the interaction of NMDA receptor antagonist memantine with cell membranes: a mini-review.”

**Autores:** Zambrano, P., Suwalsky, M., Jemiola-Rzeminska, M., Strzalka, K.

**Publicado en:** Chemico-Biological Interactions, 283, 47-50 (2018).







## Studies on the interaction of NMDA receptor antagonist memantine with cell membranes: A mini-review

Pablo Zambrano<sup>a,\*</sup>, Mario Suwalsky<sup>a</sup>, Malgorzata Jemiola-Rzeminska<sup>b,c</sup>, Kazimierz Strzalka<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Chemical Sciences, University of Concepción, Concepción, Chile

<sup>b</sup> Malopolska Centre of Biotechnology, Jagiellonian University, Kraków, Poland

<sup>c</sup> Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Jagiellonian University, Kraków, Poland

### A B S T R A C T

Memantine is an NMDA receptor antagonist clinically used for the treatment of moderate to severe Alzheimer's disease. Currently, it is the only NMDA receptor antagonist drug marketed against this disease. Despite the large number of publications regarding its clinical and therapeutic use, studies related to its mechanism of action are still inconclusive. Knowledge of drug interactions with cell membranes may lead to the development of novel drugs for neurodegenerative diseases. The present mini-review aims to give an overview of the latest findings regarding the interaction of memantine with cell membranes, specifically with that of the human erythrocyte.

### 1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is one of the most common neurodegenerative pathologies for which no effective cure has been found. In the United States approximately 5 million people over 65 years of age suffer from this disease [1]. It is expected that by the year 2050 about one million new cases will appear each year and the estimated total prevalence may reach 13.8 millions of affected patients [2]. The AD etiology is multifactorial and includes genetic and environmental components. There are many theories that describe the pathogenesis of AD. Among the most accepted is the intraneuronal accumulation of  $\text{Ca}^{2+}$  resulting in neurodegeneration and cellular apoptosis [3–5]. NMDA receptors are a subtype of glutamate receptors that are involved in regulating synaptic neuroplasticity and the intracellular influx of calcium, playing an important role in memory and learning [6–9]. NMDA receptors contribute to the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and modulate the oxygen supply to the peripheral tissues. Any alteration of the activity of this receptor by an agonist or antagonist causes an alteration of the ion flow through the channel. Therefore, uncontrolled activation of the receptor results in a transient accumulation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  inducing cellular contraction and alteration in intracellular pH [10].

Memantine (3,5-dimethyladamantan-1-amine, Fig. 1) is an NMDA receptor antagonist clinically used for the treatment of moderate to severe AD. This drug is thought to function by preferentially blocking

reversibly open NMDA channels [11,12]. Several randomized studies have been conducted to determine the efficacy of memantine in AD [13–15]. According to the main results, memantine monotherapy significantly improves various aspects of the disease such as behavior, activities of daily living and global function. However, it has been found that the efficacy of the drug is small and there is limited evidence of its clinical benefit [16,17]. Despite the large number of clinical studies on the use of memantine in AD, data on its interaction with human cell membranes are scarce. Previous studies have proposed qualitative models on the reaction kinetics and molecular orientation in lipid bilayers [18]. On the other hand, studies have been carried out on the deformability of the red blood cell membrane in experimental animals with inconclusive results [19,20]. The objective of this mini-review is to report the existing information regarding the interaction of memantine with cell membranes, and its effect on the human erythrocyte membrane.

### 2. Interaction of memantine with NMDA receptor

NMDA receptors are not only present in neural membranes, they also exist in other cell types such as erythrocytes [21]. This receptor is activated in the presence of glutamate, which is the main excitatory substance of the central nervous system. However, glutamate does not act individually as the presence of glycine is required to activate the NMDA receptor [22–24]. Despite the variety of reports and structural

*Abbreviations:* NMDA, n-methyl-D-aspartate; DPPC, dipalmitoylphosphatidylcholine; DPPG, dipalmitoylphosphatidylglycerol; DMPC, dimyristoylphosphatidylcholine; DMPE, dimyristoylphosphatidylethanolamine; SEM, scanning electron microscopy; DSC, differential scanning calorimetry; MLV, multilamellar liposome

\* Corresponding author.

E-mail address: [pzambranol@udec.cl](mailto:pzambranol@udec.cl) (P. Zambrano).

<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.01.022>

Received 10 August 2017; Received in revised form 15 January 2018; Accepted 26 January 2018

0009-2797/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

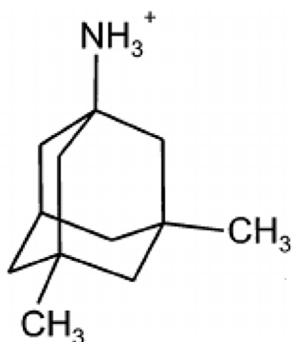


Fig. 1. Chemical structure of the protonated form of memantine (3,5-dimethyladamantan-1-amine).

studies concerning the NMDA receptor, the molecular structure has not been quite elucidated. It has been proposed that it can form tetra and pentameric structures [25]. This receptor is formed by different subunits: NMDAR1 (NR1), NMDAR2 (NR2) and NMDAR3 (NR3)<sup>2</sup>, which together form a Ca<sup>2+</sup> permeable ion channel. The functional area of the NMDA receptor is formed by heterotetramers composed of two dimers corresponding to the NR1-NR2 subunits, where the NR1 subunit possesses a binding site for glycine and the NR2 subunit possesses a binding site for glutamate [26–29]. One of the NR2 subunits (called NR2D) has a high affinity to glutamate and they are not sensitive to blocking by Mg<sup>2+</sup>. This activity could result in a slow but prolonged entry of Ca<sup>2+</sup> into the cell [30]. Regarding the NR3 subunit, the existence of two variants (a and b) encoded by different genes has been demonstrated. The variant NR3a is expressed in receptors throughout the central nervous system, while the variant NR3b is expressed exclusively in motor neurons [31]. The function of this subunit is not completely understood but it is postulated that it acts by decreasing the tonic currents generated by the activation of the NR1-NR2 dimer [32]. The NR3a and NR3b subunits, when associated with the other subunits, act as regulators of the NMDA receptor because they alter the properties of calcium permeability and magnesium sensitivity [33]. Over-activation of NMDA receptors generally leads to an increase in the cytoplasmic concentration of Ca<sup>2+</sup> and the generation of reactive oxygen species, factors that seem to play a very important role in the mechanisms of neurodegeneration and progressive neuronal death such as in Alzheimer and Huntington diseases. AD can be considered a chronic pathology of excessive accumulation of intracellular calcium [10,34]. So far, the memantine binding sites at the NMDA receptor have not been elucidated; however, computational simulations have been performed in order to understand its mechanism of action [35]. The chemical structure of memantine (Fig. 1) includes a three-ring cyclic structure with an amino group which is protonated under physiological conditions generating an NH<sub>3</sub><sup>+</sup> amino group [36]. Preferred memantine binding sites would involve an interaction between the NH<sub>3</sub><sup>+</sup> charged amino group and the side chain of an asparagine residue in the GluN1 subunit, while its two methyl groups would bind to residues A645 and A644 on the third transmembrane GluN1 and GluN2B, respectively [35].

### 3. Effect of memantine on molecular models of membranes

The interaction of memantine with molecular membrane models has been studied on limited occasions. Li et al. [37] reported the interaction of memantine with lipid bilayers of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and dipalmitoylglycerophosphorylglycerol (DPPG) by means of sum frequency generation (SFG) vibration spectroscopy in real time. These experiments concluded that memantine can be absorbed in DPPC bilayers but did not alter the flip-flop movement ratio of phospholipids even at high concentrations of the drug (5 mM); thus, the interaction would be negligible. However, a strong interaction between low

concentrations of memantine (1 mM) and DPPG bilayers was reported [37]. We have recently conducted differential scanning calorimetry (DSC) and X-ray diffraction studies on the interaction of memantine with lipid bilayers using dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and dimyristoylphosphatidylethanolamine (DMPE), classes of phospholipids representative of those present in the outer and inner monolayer of most cell membranes, respectively [38]. Calorimetric studies on the thermotropic behavior of lipid bilayers in presence of memantine are scarce. Our DSC results exhibited a high memantine capacity to alter both the pretransition and major transition phases of multilamellar liposome (MLV) of DMPC. Due to its high lipophilicity (logP = 3.28 [39]), memantine could easily penetrate and insert into the center of DMPC bilayer. This phenomenon could lead to a reduction of interfacial tension and affect the interaction between the lipid apolar fatty acid side chains. The existence of an amino group in the memantine structure may suggest a direct and specific interaction with DMPC polar heads, causing a decrease in the molar capacity, a widening of the main phase transition and a shift to lower temperature values. On the other hand, the effect of memantine on the thermotropic behavior of DMPE was found to be weak. This can be explained by the lipid compact molecular packing given its smaller polar group compared to that of DMPC. Accordingly, DMPE molecules are not very miscible with memantine, which demonstrates a slight effect of this compound on the ordering of DMPE molecules. Our studies by X-ray diffraction were also carried out in DMPC and DMPE lipid bilayers. Results showed that after exposure of DMPC to 40 μM memantine there was a strong weakening of the lipid reflection intensities, and with 80 μM memantine the reflection in the wide-angle region of DMPC disappeared. From these results it can be concluded that memantine was inserted and produced a structural perturbation of both the polar and the hydrophobic acyl regions of DMPC. In contrast, DMPE bilayers incubated with memantine in the concentration range of 20 μM–80 μM only induced a gradual and moderate decrease in the reflection intensities. Both X-ray diffraction and differential scanning calorimetry studies coincided in that memantine preferentially interacts with DMPC structurally affecting both its polar and hydrophobic regions. It is very likely that the memantine tricyclic molecule, in contact with the acyl lipid chains and the positively charged amino group interacted with the lipid negatively charged phosphate group. These interactions may weaken the electrostatic attraction and hydrogen bonds that bind together DMPC molecules leading to a disorder of its packing arrangement.

The effects of memantine on the metabolism of phospholipids in experimental animals and in some human tissues have also been studied. Honneger et al. reported the kinetics of memantine and its effects on the content and composition of phospholipids in cultured human fibroblasts and macrophages; they concluded that chronic exposure to memantine above 10 μM generates a disproportionate increase in phosphatidylinositol at the expense of phosphatidylserine and sphingomyelin [40]. On the other hand, Mistry et al. reported that memantine altered the metabolism of [3H]-inositol and phosphoinositide in neonatal slices of rat cerebral cortex [41].

### 4. Effect of memantine on human erythrocytes

NMDA receptors are present in human erythrocytes [21], playing a crucial role in the survival of the cell. The number of NMDA receptors varies depending on the maturity status of the erythrocytes, being higher in young cells [42]. As in neuronal cells, NMDA receptor activity in mature erythrocytes is controlled by plasma glutamate and glycine. Studies of the interaction of memantine with red blood cells are limited. Reinhart et al. [19] reported that either activation or inhibition of the NMDA receptor in human erythrocytes has no influence on the deformity and aggregation of the cells at high concentrations of the drug. Kuskonmaz et al. [20] studied the erythrocyte deformity in experimental animals (diabetics) and observed that both agonists and NMDA receptor antagonists (memantine) did not alter cell deformity. In a

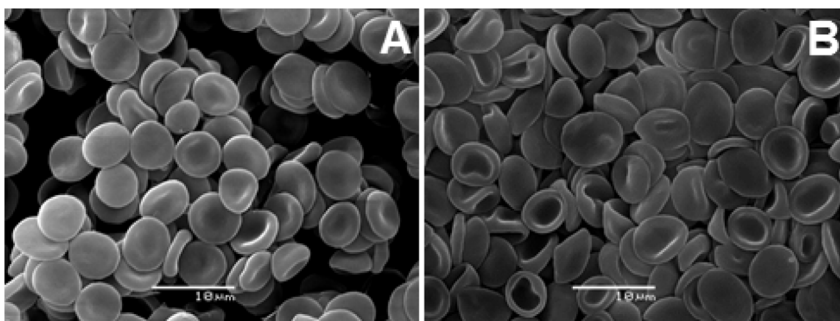


Fig. 2. Effect of memantine on the morphology of human erythrocytes. Images obtained by scanning electron microscopy (SEM) of (A) Control and (B) 20  $\mu\text{M}$  memantine.

recent study by scanning electron microscopy (SEM) we reported that *in vitro* memantine affects the morphology of human erythrocytes [38], result that differ with those of Reinhart et al. and Unal et al. [18,19]. We found that 20  $\mu\text{M}$  memantine changed the normal shape of the erythrocytes from discocytes to cup-shaped stomatocytes (Fig. 2). According to the bilayer-couple hypothesis of Sheetz and Singer [43], morphological changes induced by external molecules are due to the differential expansion of the two erythrocyte membrane monolayers. Thus, stomatocytes are formed when drug molecules insert into the inner monolayer, while echinocytes (erythrocytes with a spiny configuration) are formed when the molecules are inserted into the outer monolayer. According to our SEM results, memantine molecules preferentially locate into the inner monolayer of the human erythrocyte membrane.

## 5. Discussion

Memantine is one of the most widely used drugs for the pharmacological treatment of Alzheimer's disease. However, despite its widespread use, the benefits are minor and it does not cure or stop the disease. The existing information regarding the interaction of memantine with the NMDA receptor, cell membrane molecular models and human red blood cells is presented in this mini-review. One of the aspects that could eventually improve the effectiveness of memantine would be the union of the drug to the NMDA receptor, although its structure has not been completely elucidated [25]. The binding sites of memantine to the NMDA receptor have been reported in different experimental and theoretical studies concluding that memantine binds to the receptor in the inter membrane domain of the receptor [35]. According to several reports, the NMDA receptor, specifically one of its subunits, plays a crucial role in controlling the influx of calcium into the cell, which is a key aspect of neurodegeneration [30]. In this sense, a good challenge for the design of drugs would be to develop drugs that block with greater specificity the subunits that have a crucial role in the flow of intracellular calcium, such as the NR2 subunit (called NR2D). It has been described that this subunit has a high affinity to glutamate and it is not sensitive to blocking by  $\text{Mg}^{2++}$ , which can lead to a prolonged entry of calcium into the cell [30].

The bibliographic reports regarding the interaction of memantine with molecular membrane models are very scarce. In this sense, the phospholipid composition of the models used in the different studies varies considerably. There are studies regarding the interaction of this drug with lipid bilayers of DPPC, DPPG, DMPC and DMPE; however, the experimental conditions as well as the concentrations of the drug differ in the different studies [37,38]. Our X-ray diffraction and DSC results showed that memantine interacted preferentially with DMPC, a class of lipid present mainly in the outer monolayer of the human erythrocyte membrane [38]. Other studies have found similar results with other types of phospholipids but at higher concentrations [37]. In this sense, it would be highly advisable to deepen the experimental studies regarding the interaction of memantine with membrane models in order to improve the affinity of this drug with the membrane. As explained

above, the binding site of memantine in the NMDA receptor is in the intermembrane zone, and a better adjustment of the drug in this site could eventually improve its blocking effectiveness and thus control the intracellular calcium flow.

Regarding the interaction of memantine with human red blood cells, the information is limited. In some reports, the presence and importance of NMDA receptors in the control of intracellular calcium flow in erythrocytes has been described [20,25,31]. In addition, a slight influence of memantine on the rheological properties (aggregation and deformity) of human red blood cells has been reported [19]. These studies differ from the one we recently published where the formation of stomatocytes was reported [38]. The fact that memantine preferentially interacted with DMPC, class of lipid mainly present in the outer monolayer of the human red cell membrane, echinocytes instead of stomatocytes would have been expected. This discrepancy might be explained by a scrambling mechanism, by which phosphatidylcholines and sphingomyelins move towards the inner monolayer. Another explanation would imply the interaction of memantine with phosphoinositide lipids, mechanism proposed by Chen et al. for chlorpromazine [44]. The mean plasma therapeutic concentration of memantine is reported to be approximately 2  $\mu\text{M}$  [33], and may reach an intracellular concentration of 30  $\mu\text{M}$  [34]. The concentration of memantine in our *in vitro* study on its effects on human erythrocytes [38] was 20  $\mu\text{M}$ , which is higher than in plasma levels but within the reported intracellular range.

In summary, information regarding the interaction of memantine with NMDA receptors, molecular models of membranes and human erythrocytes is scarce. It is necessary to deepen and increase the knowledge regarding the interaction of memantine with NMDA receptors and cell membranes, which can lead to an improvement in the efficacy of this drug for the treatment of Alzheimer's Disease.

## Acknowledgements

To FONDECYT (Project 1130043), CONICYT-PFCHA Grant (Doctorado Nacional/N°21160337 to P. Zambrano), European Regional Development Fund (contract No. POIG.02.01.00-12-167/08, project Malopolska Center of Biotechnology) and Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology of Jagiellonian University.

## Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2018.01.022>.

## References

- [1] I.O. Korolev, Alzheimer's Disease: a clinical and basic science review, *Med. Student Res. J* 4 (2014) 24–33.
- [2] M. Prince, M. Prina, M. Guerchet, World alzheimer report 2013 journey of caring: an analysis of long-term care for dementia, *Alzheimer's Dis. Int.* (2013) 1–92.
- [3] M.J. Berridge, Dysregulation of neural calcium signaling in Alzheimer disease, bipolar disorder and schizophrenia, *Prion* 7 (2013) 2–13, <http://dx.doi.org/10.4161/pri.21767>.

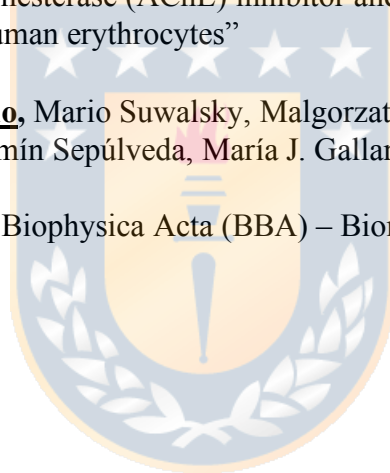
- [4] M.A. Riazantseva, G.N. Mozhaeva, E.V. Kaznacheeva, Calcium hypothesis of Alzheimer disease, *Usp. Fiziol. Nauk* 43 (2012) 59–72, <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-009-0736-1>.
- [5] C. Garwood, A. Faizullahoy, S.B. Wharton, P.G. Ince, P.R. Heath, P.J. Shaw, et al., Calcium dysregulation in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 39 (2013) 788–799, <http://dx.doi.org/10.1111/nan.12033>.
- [6] P. Paoletti, C. Bellone, Q. Zhou, NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease, *Nat. Rev. Neurosci.* 14 (2013) 383–400, <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3504>.
- [7] J.T. Coyle, NMDA receptor and schizophrenia: a brief history, *Schizophr. Bull.* 38 (2012) 920–926, <http://dx.doi.org/10.1093/schbul/sbs076>.
- [8] V. Vyklicky, M. Korinek, T. Smejkalova, A. Balik, B. Krausova, M. Kaniakova, et al., Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels, *Physiol. Res.* 63 (2014) 191–203 [www.biomed.cas.cz/physiolres](http://www.biomed.cas.cz/physiolres).
- [9] J.E. Lisman, J.M. Fellous, X.J. Wang, A role for NMDA-receptor channels in working memory, *Nat. Neurosci.* 1 (1998) 273–275, <http://dx.doi.org/10.1038/1086>.
- [10] K.N. Green, F.M. LaFerla, Linking calcium to Abeta and Alzheimer's disease, *Neuron* 59 (2008) 190–194, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2008.07.013>.
- [11] J.W. Johnson, N.G. Glasgow, N.V. Povyshewa, Recent insights into the mode of action of memantine and ketamine, *Curr. Opin. Pharmacol.* 20 (2015) 54–63, <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2014.11.006>.
- [12] M. a. Rogawski, G.L. Wenk, The neuropharmacological basis for the use of memantine in the treatment of Alzheimer's disease, *CNS Drug Rev.* 9 (2003) 275–308, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1527-3458.2003.tb00254.x>.
- [13] C. Fox, M. Crugel, I. Maidment, B.H. Auestad, S. Coulton, A. Treloar, et al., Efficacy of memantine for agitation in Alzheimer's dementia: a randomised double-blind placebo controlled trial, *PLoS One* 7 (2012) e35185, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0035185>.
- [14] I.D. Maidment, C.G. Fox, M. Boustani, J. Rodriguez, R.C. Brown, C.L. Katona, Efficacy of memantine on behavioral and psychological symptoms related to dementia: a systematic meta-analysis, *Ann. Pharmacother.* 42 (2008) 32–38, <http://dx.doi.org/10.1345/aph.1K372>.
- [15] G.T. Grossberg, F. Manes, R.F. Allegri, L.M. Gutiérrez-Robledo, S. Gloger, L. Xie, et al., The safety, tolerability, and efficacy of once-daily memantine (28 mg): a multinational, randomized, double-blind, placebo-controlled trial in patients with moderate-to-severe Alzheimer's disease taking cholinesterase inhibitors, *CNS Drugs* 27 (2013) 469–478, <http://dx.doi.org/10.1007/s40263-013-0077-7>.
- [16] S. Matsunaga, T. Kishi, N. Iwata, Memantine monotherapy for Alzheimer's Disease: A systematic review and meta-analysis, *PLoS One* 10 (2015), <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0123289>.
- [17] L.S. Schneider, K.S. Dagerman, J.P.T. Higgins, R. McShane, Lack of evidence for the efficacy of memantine in mild Alzheimer disease, *Arch. Neurol.* 68 (2011) 991–998, <http://dx.doi.org/10.1001/archneurol.2011.69>.
- [18] C.F. Chew, A. Guy, P.C. Biggin, Distribution and dynamics of adamantanes in a lipid bilayer, *Biophys. J.* 95 (2008) 5627–5636, <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.108.139477>.
- [19] W.H. Reinhart, C. Geissmann-Ott, A. Bogdanova, Activation of N-methyl D-aspartate (NMDA) receptors has no influence on rheological properties of erythrocytes, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2011, pp. 307–313, <http://dx.doi.org/10.3233/CH-2011-1481>.
- [20] Y. Unal, F.M. Comu, U. Emik, M. Alkan, H.K. Pampal, M. Arslan, The effects of propofol and memantine on erythrocyte deformability, *Bratislava Med. J.* 115 (2014) 253–255, [http://dx.doi.org/10.4149/BLL\\_2014\\_052](http://dx.doi.org/10.4149/BLL_2014_052).
- [21] A. Makhro, J. Wang, J. Vogel, A. a. Boldyrev, M. Gassmann, L. Kaestner, et al., Functional NMDA receptors in rat erythrocytes, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298 (2010) C1315–C1325, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00407.2009>.
- [22] R.A. Lester, G. Tong, C.E. Jahr, Interactions between the glycine and glutamate binding sites of the NMDA receptor, *J. Neurosci.* 13 (1993) 1088–1096 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8095067>.
- [23] Y. Nong, Y.-Q. Huang, W. Ju, L.V. Kalia, G. Ahmadian, Y.T. Wang, et al., Glycine binding primes NMDA receptor internalization, *Nature* 422 (2003) 302–307, <http://dx.doi.org/10.1038/nature01497>.
- [24] H. Furukawa, S.K. Singh, R. Mancusso, E. Gouaux, Subunit arrangement and function in NMDA receptors, *Nature* 438 (2005) 185–192, <http://dx.doi.org/10.1038/nature04089>.
- [25] E.K. Michaelis, Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging, *Prog. Neurobiol.* 54 (1998) 369–415, [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-0082\(97\)00055-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-0082(97)00055-5).
- [26] S. Schorge, D. Colquhoun, Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with truncated and tandem subunits, *J. Neurosci.* 23 (2003) 1151–1158 doi:23/4/1151 [pii].
- [27] M. Papadakis, L.M. Hawkins, F.A. Stephenson, Appropriate NR1-NR1 disulfide-linked homodimer formation is requisite for efficient expression of functional, cell surface N-Methyl-D-aspartate NR1/NR2 receptors, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 14703–14712, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M313446200>.
- [28] T. Schüler, I. Mesic, C. Madry, I. Bartholoma, B. Laube, Formation of NR1/NR2 and NR1/NR3 heterodimers constitutes the initial step in N-methyl-D-aspartate receptor assembly, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 37–46, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M703539200>.
- [29] C. Rauner, G. Köhr, Triheteromeric NR1/NR2A/NR2B receptors constitute the major N-methyl-D-aspartate receptor population in adult hippocampal synapses, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 7558–7566, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.182600>.
- [30] H. Monyer, N. Burnashev, D.J. Laurie, B. Sakmann, P.H. Seeburg, Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors, *Neuron* 12 (1994) 529–540, [http://dx.doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90210-0](http://dx.doi.org/10.1016/0896-6273(94)90210-0).
- [31] S. Das, Y.F. Sasaki, T. Rothe, L.S. Premkumar, M. Takasu, J.E. Crandall, et al., Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A, *Nature* 393 (1998) 377–381, <http://dx.doi.org/10.1038/30748>.
- [32] J.E. Chatterton, M. Awobuluyi, L.S. Premkumar, H. Takahashi, M. Talantova, Y. Shin, et al., Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits, *Nature* 415 (2002) 793–798, <http://dx.doi.org/10.1038/nature715>.
- [33] R. a. Al-Hallaq, B.R. Jarabek, Z. Fu, S. Vicini, B.B. Wolfe, R.P. Yasuda, Association of NR3A with the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 and NR2 subunits, *Mol. Pharmacol.* 62 (2002) 1119–1127, <http://dx.doi.org/10.1124/mol.62.5.1119>.
- [34] C. Supnet, I. Bezprozvanny, The dysregulation of intracellular calcium in Alzheimer disease, *Cell Calcium* 47 (2010) 183–189, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2009.12.014>.
- [35] W. Limapichat, W.Y. Yu, E. Branigan, H.A. Lester, D.A. Dougherty, Key Binding Interactions for Memantine in the NMDA Receptor, (2013).
- [36] S.A. Lipton, Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond, *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (2006) 160–170, <http://dx.doi.org/10.1038/nrd1958>.
- [37] B. Li, H. Wang, P. Feng, X. Han, Z. Chen, X. Lu, et al., Qualitative and Quantitative Analyses of the Molecular-level Interaction between Memantine and Model Cell Membranes, (2015), <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b05747>.
- [38] P. Zambrano, M. Suwalsky, F. Villena, M. Jemiola-Rzeminska, K. Strzalka, In vitro effects of the anti-Alzheimer drug memantine on the human erythrocyte membrane and molecular models, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 483 (2017) 528–533, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.12.111>.
- [39] C. Hansch, A. Leo, D. Hoekman, S.R. Heller, Exploring QSAR, (1995), <http://dx.doi.org/10.1021/es00010a719>.
- [40] U.E. Honegger, G. Quack, U.N. Wiesmann, Evidence for lysosomotropism of memantine in cultured human Cells: cellular kinetics and effects of memantine on phospholipid content and composition, *Membrane Fluidity and p-Adrenergic Trans.* (1993) 202–208.
- [41] R. Mistry, R. Wilke, R.A.J. Challiss, Modulation of NMDA effects on agonist-stimulated phosphoinositide turnover by memantine in neonatal rat cerebral cortex, *Br. J. Pharmacol.* 114 (1995) 797–804, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.1995.tb13275.x>.
- [42] A. Makhro, P. Hänggi, J.S. Goede, J. Wang, A. Brüggemann, M. Gassmann, et al., N-methyl-D-aspartate receptors in human erythroid precursor cells and in circulating red blood cells contribute to the intracellular calcium regulation, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 305 (2013) C1123–C1138, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00031.2013>.
- [43] M.P. Sheetz, S.J. Singer, Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 71 (1974) 4457–4461, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.71.11.4457>.
- [44] J.Y. Chen, L.S. Brunauer, F.C. Chou, C.M. Helsel, M.M. Gedde, W.H. Huestis, Selective amphipathic nature of chlorpromazine binding to plasma membrane, *Biochim. Biophys. Acta* 1616 (2003) 95–105.

### **Tercer artículo.**

**Nombre:** “The acetylcholinesterase (AChE) inhibitor and anti Alzheimer drug donepezil interacts with human erythrocytes”

**Autores:** Pablo Zambrano, Mario Suwalsky, Malgorzata Jemiola-Rzeminska, Kazimierz Strzalka, Benjamín Sepúlveda, María J. Gallardo.

**Enviado a:** Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes. (02-12-2018).





## The acetylcholinesterase (AChE) inhibitor and anti-Alzheimer drug donepezil interacts with human erythrocytes

Pablo Zambrano<sup>a</sup>, Mario Suwalsky<sup>a,\*</sup>, Malgorzata Jemiola-Rzeminska<sup>b,c</sup>, Kazimierz Strzalka<sup>b,c</sup>, Benjamin Sepúlveda<sup>d</sup>, María J. Gallardo<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Concepción, Concepción, Chile

<sup>b</sup> Malopolska Centre of Biotechnology, Jagiellonian University, Kraków, Poland

<sup>c</sup> Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Jagiellonian University, Kraków, Poland

<sup>d</sup> Centro de Óptica y Fotónica, Universidad de Concepción, Chile

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Donepezil  
Cell membrane  
Lipid bilayer  
Human erythrocyte  
Acetylcholinesterase

### ABSTRACT

Donepezil is used to treat symptomatically the Alzheimer's disease (AD). This drug is a specific inhibitor of the enzyme acetylcholinesterase (AChE), whose main physiological function is to hydrolyze the neurotransmitter acetylcholine. The main objective of this work was to study the effect of donepezil on human erythrocytes as AChE is present in its membrane. For this purpose, human erythrocytes and molecular model of its membrane built-up of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and dimyristoylphosphatidylethanolamine (DMPE) were used. The latter correspond to classes of phospholipids present in the outer and inner monolayers of the human erythrocyte membrane, respectively. Our experimental evidences obtained from X-ray diffraction and differential scanning calorimetry (DSC) analysis indicated that donepezil was capable of interacting with both phospholipids. Fluorescence spectroscopy results showed a moderate increase in the fluidity of the hydrophobic tails of DMPC and isolated unsealed human erythrocyte membranes (IUM). On the other hand, results by scanning electron microscopy (SEM) and optical defocusing microscopy (DM) showed that the drug changed the normal biconcave shape of the erythrocytes inducing the formation of stomatocytes (cup-shaped cells). This effect was explained by the incorporation of donepezil molecules into the erythrocyte membrane and interactions with AChE.

### 1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is one of the pathologies with more causes of death in the world [1]. It is estimated that the mortality rate associated with AD will considerably increase within the next 30 years [2]. Despite the great amount of clinical and scientific efforts to find a cure for this disease, there is currently no effective treatment that definitively halts this pathology [3]. Modern pharmacological treatments include inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) as the main option, but the efficacy of these therapeutic agents is continuously questioned [4–6]. One of the most commonly used drugs in this disease is donepezil, [2-((1-Benzylpiperidin-4-yl) methyl)-5,6-dimethoxy-2,3-dihydro-1H-inden-1-one] (Fig. 1A), which is a piperidine derivative [7–9]. The use of donepezil for the treatment of mild and moderate AD

generated significant improvements compared to the treatment of choice in the past (tacrine) [10]. It is generally well tolerated, despite causing the characteristic side effects of AChE inhibitors such as nausea, diarrhea, constipation, headache, dizziness, sleep disturbances and stomach complications [11]. Several studies by X-ray crystallography and theoretical-computational methods of the donepezil-AChE complex showed that donepezil interacts with residues of the anionic and peripheral sites of the enzyme and not with the exact binding site of acetylcholine [12–14]. All the enantiomeric forms of this inhibitor show the same profile of selectivity and interaction with AChE, as it is rapidly converted in aqueous solution, thus existing as a racemic mixture [15]. Despite the extensive literature regarding the use of human erythrocytes as bio-markers of the status of the AChE enzyme and AChE-drug interactions [16,17], studies of the interaction of donepezil

**Abbreviations:** AChE, acetylcholinesterase; DMPC, dimyristoylphosphatidylcholine; DMPE, dimyristoylphosphatidylethanolamine; DSC, differential scanning calorimetry; SEM, scanning electron microscopy; DM, defocusing microscopy; MLV, multilamellar vesicles; LUV, large unilamellar vesicles; GP, generalized polarization; DPH, 1,6-diphenyl-hexa-1,3,5-triene

\* Corresponding author.

E-mail address: [msuwalsk@udec.cl](mailto:msuwalsk@udec.cl) (M. Suwalsky).

<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.03.014>

Received 2 December 2018; Received in revised form 6 March 2019; Accepted 18 March 2019

Available online 20 March 2019

0005-2736/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

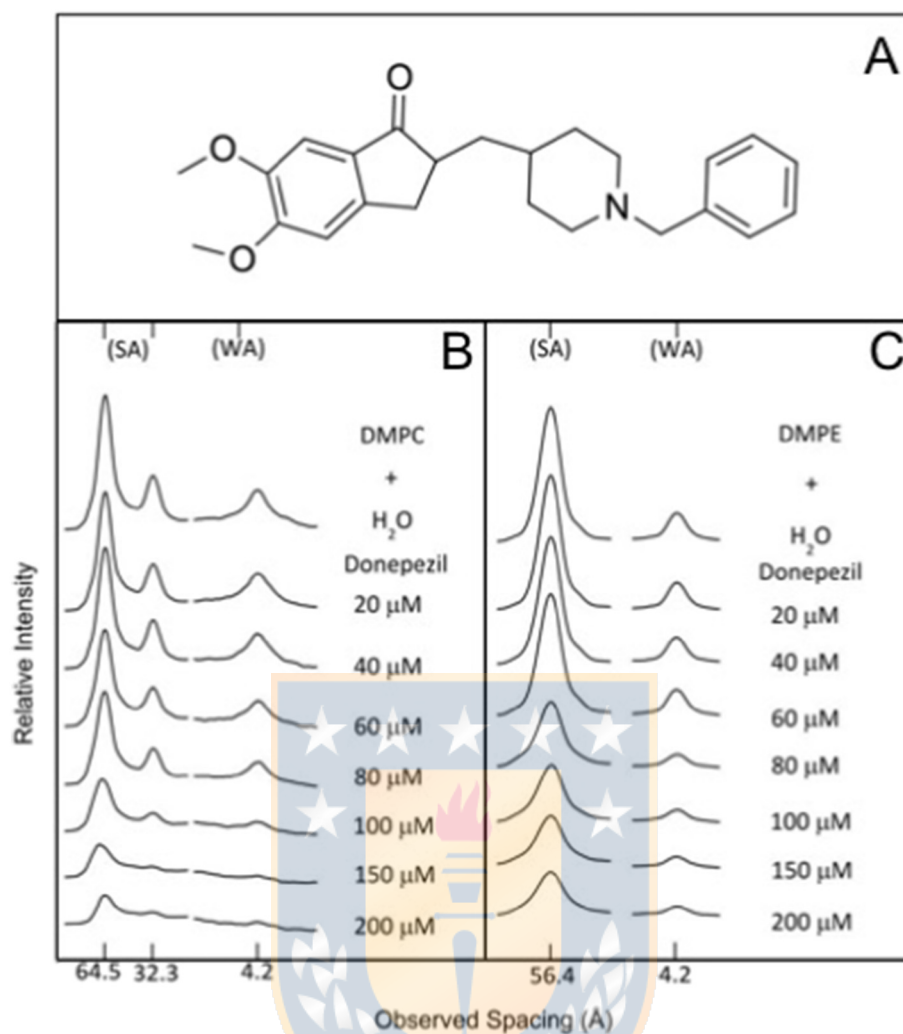


Fig. 1. (A) Structural formula of donepezil. Microdensitograms from X-ray diffraction patterns of (B) dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), and (C) dimyristoylphosphatidylethanolamine (DMPE) in water and incubated with aqueous solutions of donepezil; (SA) small-angle and (WA) wide-angle reflections.

with human erythrocytes are scarce. Thus, we considered of interest to study the interaction of donepezil with human erythrocytes and molecular models of its membrane in order to understand its molecular mechanism of action. To carry out this study, bilayers built-up of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and dimyristoylphosphatidylethanolamine (DMPE) were used, which correspond to classes of phospholipids located in the outer and inner monolayers of the human erythrocyte membrane, respectively [18,19]. X-ray diffraction and differential scanning calorimetry (DSC) were used to study the interaction of donepezil with multibilayers and multilamellar vesicles (MLV) of DMPC and DMPE, respectively; in addition, fluorescence spectroscopy was used for DMPC large unilamellar liposomes (LUV) and isolated unsealed human erythrocyte membranes (IUM). The morphological effect of donepezil on human erythrocytes was determined by scanning electron microscopy (SEM) and optical defocusing microscopy (DM), the latter a technique that allows observing morphological changes in real time and obtaining three-dimensional reconstructions of the cell surface [20].

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

Synthetic DMPC (lot SLBD7363, MW 677.9), DMPE (lot SLBF8298V, MW 635.9) from Aldrich (Milwaukee, WI, USA), and donepezil

hydrochloride (lot No. 093M4709V, MW 379.5) from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) were used without subsequent purification. 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) and 6-dodecanoyl-2-dimethylaminonaphthalene (laurdan) fluorescent probes were from Molecular Probe (Eugene, OR, USA).

### 2.2. X-ray diffraction of DMPC and DMPE multibilayers

Approximately 2 mg of each phospholipid was placed in Eppendorf tubes and filled with 150 μl of (a) distilled water and (b) aqueous solutions of donepezil in the range of 20–200 μM. After shaking the samples were incubated at 30 °C and 60 °C for 30 min for DMPC and DMPE, respectively. Subsequently, they were transferred to 1.5 mm diameter glass capillaries (Glass-Technik&Konstruktion, Berlin, Germany) and centrifuged for 15 min at 2500 rpm (Selecta Centrifuge, Mixtasel, Spain). Ni-filtered CuK $\alpha$  radiation (1.5418 Å) was used from a Bruker Kristalloflex 760 X-ray generator (Karlsruhe, Germany). A linear position detector system MBraun PSD-50 M (Garching, Germany) was used to obtain the relative reflection intensities. No correction factors were applied to the collected data. All X-ray diffraction experiments were developed at  $18 \pm 1$  °C, which is less than the main phase transition temperature of both phospholipids. Experiments carried out at higher temperatures would have induced transitions to more fluid phases making harder the detection of structural changes induced by donepezil. All samples were analyzed in triplicate to ensure

reproducibility.

### 2.3. Differential scanning calorimetry (DSC) of DMPC and DMPE liposomes (MLV)

Appropriate quantities of dissolved DMPC or DMPE in pure chloroform (analytical quality) were placed into a special glass test tube to obtain a final phospholipid concentration of 1 mM. The solvent was evaporated by a gentle flow of nitrogen gas and a thin film was formed on the walls of the glass tubes. Subsequently, the films were hydrated with distilled water and aqueous solutions of donepezil and the multilamellar liposomes (MLV) were vortexed from the samples for 1 min at a temperature higher than the phase transition temperature of the pure phospholipid (approximately 30 °C and 60 °C for DMPC and DMPE, respectively). All DSC experiments were performed with the NANO DSC Series III system with capillary cell platinum (TA Instruments, New Castle, USA) with a final volume of 300  $\mu$ l. To avoid bubble formation the samples were degassed by subjecting them to a vacuum of 30.4–50.7 kPa for 15 min; then, 300  $\mu$ l of sample solution was placed in the sample cell and an equal volume of distilled water was used as reference. The cells were sealed and thermally equilibrated for 10 min at the start temperature. The DSC analysis was developed in samples under a pressure of 0.3 MPa. The scanning rate value for both heating and cooling processes was 1 °C min<sup>-1</sup> for all samples and scans were recorded within a range of 5–40 °C (DMPC) and 30–70 °C (DMPE). The thermograms were corrected by subtracting the blank (water scans) and normalized to the corresponding lipid concentration. All the thermodynamic parameters were obtained using the TA Instruments software package and all the samples were analyzed three times.

### 2.4. Fluorescence spectroscopy of large unilamellar vesicles (LUV) of DMPC and isolated unsealed human erythrocyte membranes (IUM)

The probes laurdan and 1,6-diphenyl-hexa-1,3,5-triene (DPH) were used. LUV were prepared by the extrusion method detailed by Suwalsky et al. [21], and IUM were obtained following the method of Dodge et al. [22] with blood from a healthy donor without pharmacological treatment. DPH and laurdan probes were incorporated into LUV and IUM suspensions by addition of 1  $\mu$ l/ml aliquots of 0.5 mM stock solutions of the probe in dimethyl sulfoxide and ethanol, respectively and incubated at 37 °C for 1 h. The temperature was controlled by an external bath circulator and verified before and after each measurement. Donepezil was incorporated in LUV and IUM by adding an adequate volume of a concentrated donepezil solution in order to obtain the different concentrations used in this study. The subtraction of the blank was developed in all measurements using samples without probes. DPH fluorescence anisotropy ( $r$ ) was calculated according to the definition:  $r = (I_{||} - I_{\perp}) / (I_{||} + 2I_{\perp})$ , where  $I_{||}$  and  $I_{\perp}$  are the corresponding parallel and perpendicular emission fluorescence intensities with respect to the vertically polarized excitation light. Laurdan fluorescence spectral shifts were quantitatively evaluated using the generalized polarization (GP) concept which is defined by the expression  $GP = (I_b - I_r) / (I_b + I_r)$ , where  $I_b$  and  $I_r$  are the emission intensities at the blue and red edges of the emission spectrum, respectively. Generalized polarization and anisotropy measurements were performed in a K-2 spectrofluorometer (ISS Inc., Champaign, IL, USA) using ISS software for data collection and analysis. Measurements were performed at 18 °C and 37 °C for LUV and 37 °C for IUM suspensions. The data presented in the results represented mean values and standard error of 15 measurements in three independent experiments. Statistical analyses were performed using Graph Pad Prism 5 (Graph Pad Software Inc.). One-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test at significance level  $\alpha = 0.05$  was used to estimate the differences between the samples treated with donepezil and the control.

### 2.5. Scanning electron microscopy (SEM) observation of human erythrocytes

The effect of donepezil on the morphology of human erythrocytes was analyzed using scanning electron microscopy (SEM). For this purpose, approximately two drops of blood were taken from a healthy donor without pharmacological treatment and collected in an Eppendorf tube containing 1.5 ml of phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4 and 1 mg/ml of BSA (bovine serum albumin). Subsequently, the blood samples were centrifuged (1000 rpm  $\times$  10 min) and washed three times with PBS and BSA solutions. Then, the samples were suspended in 150  $\mu$ l of donepezil solutions in PBS and BSA in the concentration range of 20–40  $\mu$ M and incubated at 37 °C for 1 h. The control sample consisted in erythrocytes suspended in PBS and BSA without donepezil. The cells were centrifuged at 1000 rpm for 10 min and the supernatant was replaced with 150  $\mu$ l of a 2.5% glutaraldehyde solution and allowed to stand for 24 h at 4 °C. After this process, the fixed samples were washed in distilled water in order to eliminate the remains of glutaraldehyde, and centrifuged (1000 rpm  $\times$  10 min). Approximately 5  $\mu$ l of each sample was deposited in silicon glass sample holders. Samples were dried in a drying-oven at 20 °C and gold coated for 3 min at 13.3 Pa in a sputter device (Edwards S 150, Sussex, England), and observed in a scanning electron microscope (JEOL, JSM-6380LV, Japan).

### 2.6. Studies of the morphology of human erythrocytes by defocusing microscopy (DM)

The effect of donepezil on an isolated human erythrocyte was evaluated by defocusing microscopy (DM), a new technique based on the visualization of a single erythrocyte, and the analysis of contrast images observed out of focus and in real time [20]. The experiments were performed using an inverted Nikon Eclipse Ti-U optical microscope (Nikon, Tokyo, Japan). The lens was mounted in a C-focus system (Mad City Labs, Madison, USA) for a nanometric control of the focal plane position. The visualization was done with a high-resolution CMOS camera (Thorlabs, New Jersey, USA). 20  $\mu$ l of blood were collected from the finger of a healthy donor without pharmacological treatment. The final sample was prepared by diluting 20 times the stock solution of blood in a solution of PBS and BSA 1 mg/ml; the donepezil stock solution was prepared in PBS and BSA. In order to obtain the images, the diluted blood solution was placed in a special cuvette and observed under the optical microscope. Subsequently, an erythrocyte was selected and the concentration of donepezil was increased up to 40  $\mu$ M. To obtain three-dimensional reconstructions, two images of an erythrocyte were captured in the defocus positions +1 and -1  $\mu$ m and analyzed using Matlab algorithms (Mathworks Inc., Natick, MA).

## 3. Results

### 3.1. X-ray diffraction of DMPC and DMPE multibilayers

The diffractograms obtained by incubating DMPC with water and aqueous solutions of donepezil are shown in Fig. 1B. Water modified DMPC molecular arrangement in its dry crystalline phase since its bilayer repeat (lipid bilayer plus the layer of water) increased from approximately 55 Å to 65 Å when it was incubated in water. At the same time, the small angle reflections (SA in the figure), which correspond to its polar terminal groups were reduced to only the first two bilayer repeat orders. Additionally, only one reflection of 4.2 Å was observed in the wide-angle region (WA in the figure), which corresponds to the average distance between the fully extended acyl chains packaged in a hexagonal arrangement. Fig. 1B also shows that after exposure to donepezil in a range of concentrations there was a gradual weakening of DMPC reflection intensities, which with 150  $\mu$ M donepezil they were considerably reduced. These results allow concluding that donepezil



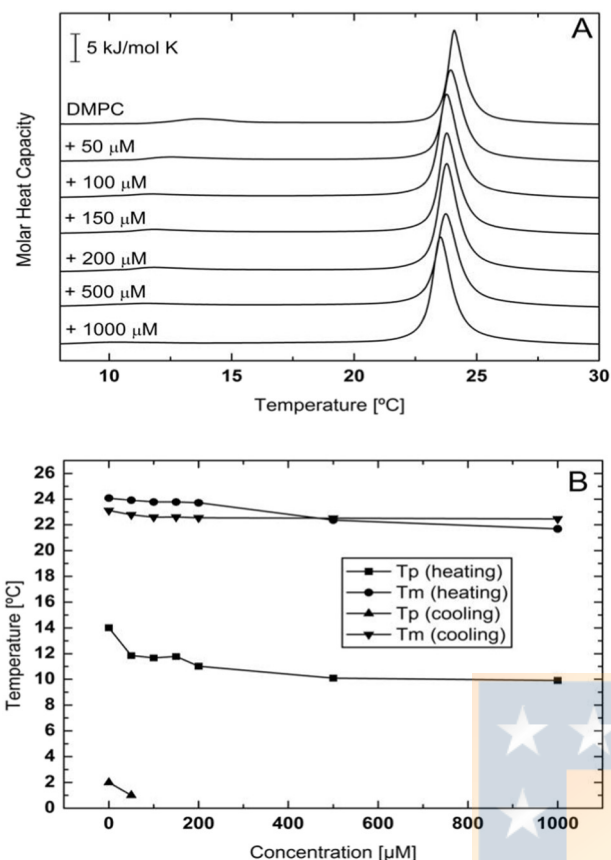


Fig. 2. (A) DSC thermograms obtained for DMPC MLV containing donepezil at different concentrations. Scans were recorded at a heating rate of  $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ; (B) a plot of phase transition temperature of DMPC MLV determined for cooling and heating scans as a function of donepezil concentration.

caused a great structural perturbation to both the polar and the hydrophobic acyl chain regions of DMPC bilayers. Fig. 1C shows the results of the X-ray diffraction analysis of DMPE bilayers incubated with water and donepezil in the range of 20–200 μM. As it can be seen, donepezil increasing concentrations also produced a significant decrease in DMPE reflection intensities. These results indicate that donepezil was able to induce significant structural perturbations to both DMPC and DMPE bilayers.

### 3.2. Differential scanning calorimetry (DSC) of DMPC and DMPE liposomes (MLV)

The results of the DSC experiments on pure DMPC MLV shown in Fig. 2 have been previously reported [23]. The scan from  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  to  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  exhibited a strong and acute primary transition peak at  $24.08\text{ }^{\circ}\text{C}$  with an enthalpy change ( $\Delta H$ ) of  $18.03\text{ kJ/mol}$ ; this result corresponds to the conversion of the rippled gel phase ( $P_{\beta}'$ ) to the lamellar liquid crystal ( $L_{\alpha}$ ) phase (Table 1). Furthermore, a small peak, called the pretransition also appeared at a temperature of  $14.03\text{ }^{\circ}\text{C}$  with a  $\Delta H$  of  $2.63\text{ kJ/mol}$ , which corresponds to the  $L_{\beta}' \rightarrow P_{\beta}'$  transition. These data are consistent with previous reports in the literature [24,25]. After adding donepezil, an alteration of the thermotropic behavior of DMPC was observed (Fig. 2A). In fact, a donepezil concentration of  $50\text{ }\mu\text{M}$  induced a shift of the main phase transition temperature, which with  $1\text{ mM}$  decreased by  $1.47\text{ }^{\circ}\text{C}$  and the pretransition peak completely disappeared. This variation in temperature as a concentration function is plotted in Fig. 2B. On the other hand, Fig. 3 discloses the results of the DSC experiments for DMPE MLV. As explained in detail in literature sources [26], DMPE in the well-hydrated state presents a single, strong and acute transition

Table 1

Thermodynamic parameters of the pretransition and main phase transition of pure, fully hydrated DMPC multilamellar liposomes and DMPC/donepezil mixtures obtained from heating and cooling scans collected at a heating (cooling) rate of  $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . The accuracy for the main phase transition temperature and enthalpy was  $\pm 0.01\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $\pm 0.8\text{ kJ/mol}$ , respectively.

Compound conc. [ $\mu\text{M}$ ]	Pretransition heating			Main transition heating		
	$\Delta H$ [kJ/mol]	$\Delta S$ [J/mol K]	$T_p$ [ $^{\circ}\text{C}$ ]	$\Delta H$ [kJ/mol]	$\Delta S$ [J/mol K]	$T_m$ [ $^{\circ}\text{C}$ ]
DMPC + donepezil						
0	2.63	0.79	14.03	18.03	6.31	24.08
50	1.33	0.47	11.84	14.94	5.03	23.91
100	0.99	0.31	11.66	21.75	7.33	23.77
150	0.31	0.01	11.77	14.99	5.05	23.73
200	–	–	–	16.72	5.61	23.71
500	–	–	–	10.39	3.52	22.70
1000	–	–	–	17.22	5.82	22.61

Compound conc. [ $\mu\text{M}$ ]	Pretransition cooling			Main transition cooling		
	$\Delta H$ [kJ/mol]	$\Delta S$ [J/mol K]	$T_p$ [ $^{\circ}\text{C}$ ]	$\Delta H$ [kJ/mol]	$\Delta S$ [J/mol K]	$T_m$ [ $^{\circ}\text{C}$ ]
DMPC + donepezil						
0	1.01	0.36	9.05	21.32	7.10	23.11
50	0.10	0.13	7.30	17.63	5.96	22.82
100	–	–	–	16.37	5.54	22.59
150	–	–	–	15.72	5.32	22.61
200	–	–	–	16.61	5.62	22.54
500	–	–	–	13.16	4.45	22.51
1000	–	–	–	13.89	4.71	22.46

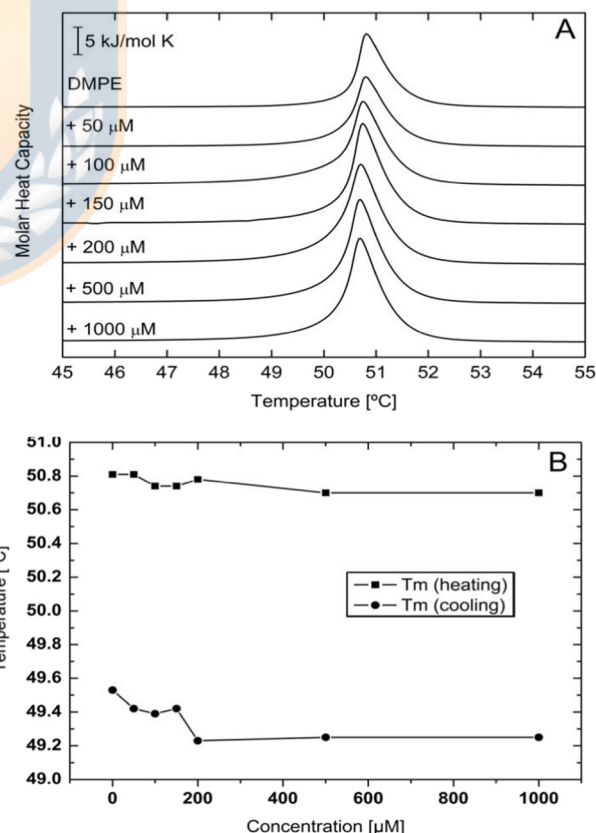


Fig. 3. (A) DSC thermograms obtained for DMPE MLV containing donepezil at various concentrations. Scans were recorded at a heating rate of  $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ; (B) a plot of phase transition temperature of DMPE MLV determined for cooling and heating scans as a function of donepezil concentration.

**Table 2**

Thermodynamic parameters of the main phase transition of pure, fully hydrated DMPE multilamellar liposomes and DMPE/donepezil mixtures obtained from heating and cooling scans collected at a heating (cooling) rate of  $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . The accuracy for the main phase transition temperature and enthalpy was  $\pm 0.01\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $\pm 0.8\text{ kJ/mol}$ , respectively.

Compound conc. [ $\mu\text{M}$ ]	Main transition heating			Main transition cooling		
	$\Delta\text{H}$ [kJ/mol]	$\Delta\text{S}$ [J/mol K]	$T_m$ [ $^{\circ}\text{C}$ ]	$\Delta\text{H}$ [kJ/mol]	$\Delta\text{S}$ [J/mol K]	$T_m$ [ $^{\circ}\text{C}$ ]
0	21.63	6.68	50.81	22.94	7.21	49.53
50	19.14	6.36	50.81	19.36	6.34	49.42
100	19.71	6.08	50.74	20.28	6.29	49.39
150	21.91	6.77	50.74	22.92	7.11	49.42
200	25.97	8.02	50.78	25.50	7.91	49.23
500	25.31	7.82	50.73	24.66	7.65	49.25
1000	22.48	6.94	50.71	24.05	7.46	49.21

peak at  $50.81\text{ }^{\circ}\text{C}$  with a transition enthalpy of  $21.63\text{ kJ/mol}$  (Table 2), which corresponds to the conversion of the gel to the liquid-crystal phase. The thermotropic effect of DMPE was moderately affected by the presence of donepezil, even with a  $1\text{ mM}$  concentration. However, an increase in the peak base width was observed with this donepezil concentration (Fig. 3A), where a displacement of the main transition temperature of  $0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$  was detected (Fig. 3B). In these results, the transition enthalpy corresponds to the integrated area under the curve divided by the phospholipid concentration, and the transition temperature corresponds to the maximum value of the peak. The data of DMPC and DMPE thermodynamic parameters, including the values of temperature, entropy and enthalpy are shown in Tables 1 and 2, respectively.

### 3.3. Fluorescence spectroscopy of large unilamellar vesicles (LUV) and isolated unsealed human erythrocyte membranes (IUM)

The concentration-dependent effects of donepezil on DMPC LUV and IUM were studied at two different levels of the lipid bilayer: at the deep hydrophobic core of the acyl chains determined by DPH steady-state fluorescence anisotropy ( $r$ ), and at the hydrophilic/hydrophobic level of the polar heads determined by laurdan fluorescence spectral shift through the GP parameter. These effects were studied at  $18$  and  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  on DMPC LUV and at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  on IUM. The results of laurdan fluorescence spectral shifts are shown in Fig. 4A. A moderate decrease in GP values was observed in DMPC LUV at  $18\text{ }^{\circ}\text{C}$  (solid black squares), causing a variation ( $\Delta\text{GP}$ ) of  $0.045$  with  $100\text{ }\mu\text{M}$  donepezil. At  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a very small decrease in laurdan GP for both DMPC LUV (red solid circles) and IUM (blue solid triangles) was observed, reaching a maximum in the  $\Delta\text{GP}$  values of  $0.004$  and  $0.015$  with  $100\text{ }\mu\text{M}$  donepezil, respectively. On the other hand, changes in DPH fluorescence anisotropy as a function of the concentration of donepezil are shown in Fig. 4B. A decrease as a function of donepezil concentration was observed for DPH anisotropy values in DMPC LUV at  $18\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , and in IUM at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; these results imply that donepezil caused a rather weak structural disorder at the level of hydrophilic polar region of DMPC LUV and RBC membrane bilayer.

### 3.4. Scanning electron microscopy (SEM) observation of human erythrocytes

Fig. 5A presents the results of the morphological analysis of human erythrocytes by scanning electron microscopy (SEM). Fig. 5A-1 shows the normal morphology (discocyte) of erythrocytes; however, when they were *in vitro* exposed to  $20\text{ }\mu\text{M}$  donepezil (Fig. 5A-2) their discoid morphology was altered changing to stomatocytes, form characterized by the presence of a pronounced invagination. This alteration of the cell

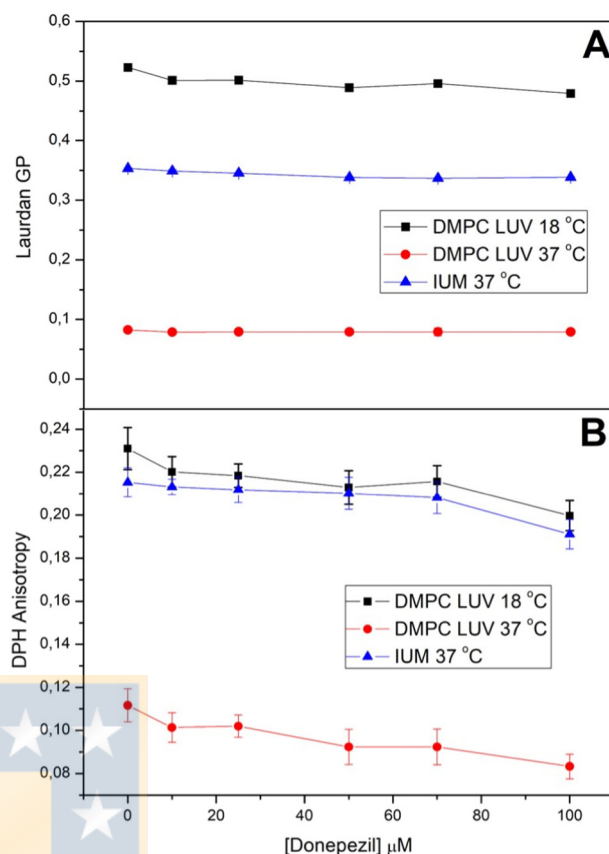


Fig. 4. Fluorescence measurement of (A) generalized polarization (GP) of laurdan and (B) anisotropy of DPH in large unilamellar vesicles (LUV) of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) at  $18\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , and in isolated unsealed human erythrocyte membranes (IUM) at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  incubated with different concentrations of donepezil. Statistically significant differences ( $\alpha = 0.05$ ) between generalized polarization (GP) and anisotropy values for the samples treated with donepezil respect to the control ( $0\text{ }\mu\text{M}$ ) are denoted as (\*).

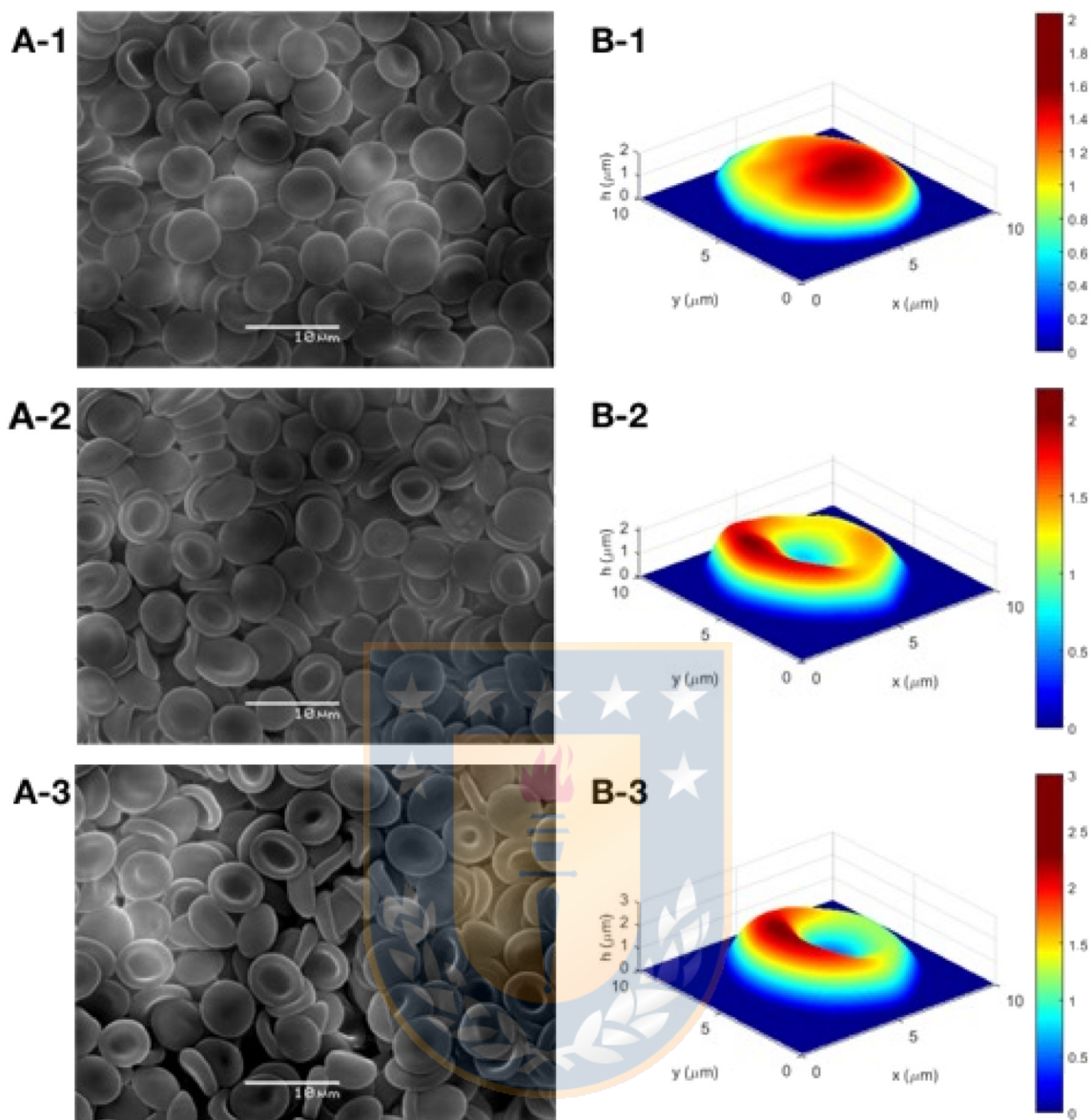
morphology became more noticeable when the donepezil concentration was  $40\text{ }\mu\text{M}$ , condition in which a larger amount of stomatocytes were produced (Fig. 5A-3).

### 3.5. Studies of the morphology of human erythrocytes by defocusing microscopy (DM)

The three-dimensional reconstructions of the morphology of human erythrocytes exposed to donepezil studied by optical defocusing microscopy are presented in Fig. 5B. Fig. 5B-1 shows the three-dimensional reconstruction of an erythrocyte in the normal state (discoid form). In the presence of donepezil  $20\text{ }\mu\text{M}$  (Fig. 5B-2) the morphology of the erythrocyte was altered presenting a cleft on its surface (stomatocytes form). In this condition the volume of the cell was not significantly altered. Fig. 5B-3 presents the three-dimensional reconstruction of an erythrocyte in the presence of donepezil  $40\text{ }\mu\text{M}$ . In this condition the erythrocyte presents a prominent invagination at the surface which indicates a higher degree of stomatocytosis.

## 4. Discussion

The effects of the AChE inhibitor donepezil on lipid multilayers composed of DMPC and DMPE were studied by X-ray diffraction. Both represent classes of phospholipids present in the outer and inner monolayers of the human erythrocyte membrane, respectively. The experimental results indicated that donepezil was able to alter the packing arrangements of DMPC and DMPE bilayers, both in the



**Fig. 5.** Morphological effects of donepezil on human erythrocytes. Images obtained by (A) scanning electron microscopy (SEM) and (B) defocusing microscopy (DM). (A-1) control; (A-2) incubated with 20  $\mu\text{M}$  and (A-3) with 40  $\mu\text{M}$  donepezil. (B-1) Control, (B-2) incubated with 20  $\mu\text{M}$  and (B-3) with 40  $\mu\text{M}$  donepezil.

hydrophobic region of the hydrocarbon chains as well as in the hydrophilic zone (polar heads). These phospholipids have a similar chemical structure except for their terminal amino groups, which are  $^+\text{N}(\text{CH}_3)_3$  in DMPC and  $^+\text{NH}_3$  DMPE [27]. The hydration of DMPC generates an interbilayer space resulting in an increase in the bilayers separation. This condition facilitates the entry of donepezil into the interbilayer space and to induce structural alterations. It has been established that donepezil is a drug with a low polarity, composed mainly of non-polar C–H and C–C bonds, containing only a few electronegative atoms [28,29]. The molecule possesses four hydrogen-bond acceptors and zero hydrogen-bond donors. However, the molecule also possesses a tertiary basic amino group (whose pKa of conjugated acid is 8.82) which is protonated at a physiological pH [30]. Donepezil in the protonated state is considerably more polar and less able to diffuse membranes, such as the blood brain barrier [31]. According to our X-ray results, the neutral region of donepezil might interact with DMPC hydrophobic tails, and its positively charged protonated amino group would interact with the negatively charged phosphate of the lipid polar head group. Together, these interactions generate a structural disorder and as a consequence a weakening of DMPC low and wide-angle

reflection intensities (Fig. 1B). Contrary to DMPC, DMPE polar groups are less bulky and therefore have a high effective charge which generates a much more stable system through hydrogen bonds and electrostatic interactions. This special feature of DMPE leads to a more difficult entry of water into the interbilayer zone and therefore the diffusion of the drug. However, its reflection intensities considerably decreased in a donepezil concentration-dependent manner (Fig. 1C). The explanation for this effect lies in that the donepezil protonated amino group might interact with DMPE polar head groups disrupting the hydrogen bond and electrostatic interactions network that holds the bilayers together.

According to the calorimetric measurements from DMPC MLV presented in Fig. 2A and Table 1, as the donepezil concentration increased a slight shift of the main transition temperature ( $T_m$ ) towards smaller values was observed ( $\Delta T = 1.47^\circ\text{C}$  and  $0.65^\circ\text{C}$  on cooling and heating, respectively) while the pretransition was completely abolished. This is an indication that the drug was capable of altering the transformation of the tilted to a rippled chain gel phase ( $L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$ ) typical in DMPC. In the case of DMPE, increasing concentrations of donepezil made the transition less cooperative, evidenced by the increase in the width of

the main transition and the displacement at lower temperatures of the  $T_m$  ( $\Delta T = 0.1$  °C, Fig. 3A, Table 2).

The fluorescence spectroscopy studies were carried out using DPH and laurdan fluorophores. DPH exhibits a hydrophobic nature, with low solubility and fluorescence in water [32]. The variations of DPH steady-state fluorescence anisotropy as a function of the concentration of donepezil show that the drug only induced small changes in the hydrophobic regions of DMPC at both 18 and 37 °C and in IUM at 37 °C. However, practically no significant effects were observed in laurdan GP in any of these systems in the range of the assayed concentrations. Statistically, the changes induced in the anisotropy and GP by donepezil were not significant.

Considering the X-ray and to a lower extent DSC results on DMPC and DMPE, it seems plausible that donepezil molecules might have the ability to insert in either the outer or the inner monolayer of the human erythrocyte membrane. However, SEM observations showed that when the erythrocytes were exposed to donepezil to lower concentrations, the normal discocyte shape changed to stomatocytes (deep cavity on the cell surface). According to the bilayer-couple hypothesis [33], echinocytes (spiculated cells) are formed when external molecules are inserted in the outer monolayer and stomatocytes (cup-shaped cells) when the molecules locate into the inner monolayer of the erythrocyte membrane. The fact that donepezil induced the formation of stomatocytes might be explained by its location in the inner moiety of the cell membrane and its interaction with the AChE enzyme, of which erythrocytes possess abundant amounts [34–38]. The lipid-protein interfaces in the human erythrocyte membrane are sites of membrane defects where water is able to penetrate [39,40]. Considering that donepezil is highly soluble in water it is very likely that it might locate in the vicinity of AChE. This enzyme is bound to the erythrocyte membrane by an anchor of glycosylphosphatidylinositol (GPI) [41]. As reported, its binding site is composed of the aromatic residues Trp84, Tyr70, Tyr121 and Trp279, which might interact with the benzene ring of the drug [12,14]. In addition, a strong hydrogen bridge and a water bridge might be formed between Ser286 and the carbonyl group of the drug [42]. On the other hand, the oxygen of the two methoxy groups can make  $\pi$ - $\pi$  type interaction with the Trp279 residue [43].

In conclusion, our results demonstrate that donepezil interacts with the human erythrocyte membrane affecting the cell shape, most likely as a consequence of its interaction with the AChE enzyme. It should be present that there are no reports regarding the effect of the inhibition of the AChE on the morphology of erythrocytes. These findings are of interest as the mechanism of action of donepezil has been related to its ability to inhibit the enzymatic activity of AChE. Besides, they might contribute to understand the molecular mechanism of action of AChE enzyme inhibitors and, as a consequence to the development of more effective drugs for the treatment of the Alzheimer's disease.

#### Conflict of interest

We do not have any conflict of interest.

#### Transparency document

The Transparency document associated this article can be found, in online version.

#### Acknowledgements

The authors thank to FONDECYT (Project 1130043) and to CONICYT-PFCHA (Beca Doctorado Nacional 21160337 to P. Zambrano). DSC measurements were carried out using the instrument purchased thanks to financial support of European Regional Development Fund (contract No. POIG.02.01.00-12-167/08, Project Malopolska Centre of Biotechnology). The Jagiellonian University is a partner of the Leading National Research Center (KNOW) supported by

the Ministry of Science and Higher Education.

#### References

- [1] A. Association, 2018 Alzheimer's disease facts and figures, *Alzheimers Dement.* 14 (2018) 367–429, <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.001>.
- [2] M. Prince, R. Bryce, E. Albanese, A. Wimo, W. Ribeiro, C.P. Ferri, The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis, *Alzheimers Dement.* 9 (2013) 63–75.e2, <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.11.007>.
- [3] D. Mehta, R. Jackson, G. Paul, J. Shi, M. Sabbagh, Why do trials for Alzheimer's disease drugs keep failing? A discontinued drug perspective for 2010–2015, *Expert Opin. Investig. Drugs* 26 (2017) 735–739, <https://doi.org/10.1080/13543784.2017.1323868>.
- [4] R.E. Becker, N.H. Greig, E. Giacobini, Why do so many drugs for Alzheimer's disease fail in development? Time for new methods and new practices? *J. Alzheimers Dis.* 15 (2008) 303–325, <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9767-z>. *Plastid*.
- [5] E. Giacobini, R.E. Becker, One hundred years after the discovery of Alzheimer's disease. A turning point for therapy? *J. Alzheimers Dis.* (2007) 37–52, <https://doi.org/10.3233/JAD-2007-12105>.
- [6] R. Knight, M. Khondoker, N. Magill, R. Stewart, S. Landau, A systematic review and meta-analysis of the effectiveness of acetylcholinesterase inhibitors and memantine in treating the cognitive symptoms of dementia, *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 45 (2018) 131–151, <https://doi.org/10.1159/000486546>.
- [7] B. Seltzer, Donepezil: an update, *Expert. Opin. Pharmacother.* 8 (2007) 1011–1023, <https://doi.org/10.1517/14656566.8.7.1011>.
- [8] M. Dooley, H.M. Lamb, Donepezil. A review of its use in Alzheimer's disease, *Drugs Aging* 16 (2000) 199–226, <https://doi.org/10.2165/00002512-200016030-00005>.
- [9] X. Barril, M. Orozco, F.J. Luque, Towards improved acetylcholinesterase inhibitors: a structural and computational approach, *Mini-Rev. Med. Chem.* 1 (2001) 255–266, <https://doi.org/10.2174/1389557013406828>.
- [10] H. Sugimoto, H. Ogura, Y. Arai, Y. Limura, Y. Yamanishi, Research and development of donepezil hydrochloride, a new type of acetylcholinesterase inhibitor, *Jpn. J. Pharmacol.* 89 (2002) 7–20, <https://doi.org/10.1254/jip.89.7>.
- [11] N. Mimica, P. Presečki, Side effects of approved antidementives, *Psychiatr. Danub.* 2009, pp. 108–113.
- [12] G. Kryger, I. Silman, J.L. Sussman, Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs, *Structure* 7 (1999) 297–307, [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(99\)80040-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(99)80040-9).
- [13] G. Kryger, I. Silman, J.L. Sussman, Three-dimensional structure of a complex of E2020 with acetylcholinesterase from Torpedo californica, *J. Physiol. Paris* (1998) 191–194, [https://doi.org/10.1016/S0928-4257\(98\)80008-9](https://doi.org/10.1016/S0928-4257(98)80008-9).
- [14] C. Niu, Y. Xu, Y. Xu, X. Luo, W. Duan, I. Silman, J.L. Sussman, W. Zhu, K. Chen, J. Shen, H. Jiang, Dynamic mechanism of E2020 binding to acetylcholinesterase: a steered molecular dynamics simulation, *J. Phys. Chem. B* 109 (2005) 23730–23738, <https://doi.org/10.1021/jp0552877>.
- [15] L. Wan, C. Guo, Z. Zhou, Y. Qi, Y. Li, D. Li, X. Zheng, Y. Zhong, Steady-state plasma concentration of donepezil enantiomers and its stereoselective metabolism and transport in vitro, *Chirality* 25 (2013) 498–505, <https://doi.org/10.1002/chir.22153>.
- [16] R. von Bernhardt, R. Alarcon, D. Mezzano, P. Fuentes, N.C. Inestrosa, Blood cells cholinesterase activity in early stage Alzheimer's disease and vascular dementia, *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 19 (2005) 204–212 (83500 [pii]v), <https://doi.org/10.1159/000083500>.
- [17] C.R.D. Assis, A.G. Linhares, M.P. Cabrera, V.M. Oliveira, K.C.C. Silva, M. Marcuschi, E.V.M. Maciel Carvalho, R.S. Bezerra, L.B. Carvalho, Erythrocyte acetylcholinesterase as biomarker of pesticide exposure: new and forgotten insights, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25 (2018) 18364–18376, <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2303-9>.
- [18] A.A. Spector, M.A. Yorek, Membrane lipid composition and cellular function, *J. Lipid Res.* 26 (1985) 1015–1035 (doi:3906008).
- [19] P.F. Devaux, A. Zachowski, Maintenance and consequences of membrane phospholipid asymmetry, *Chem. Phys. Lipids* 73 (1994) 107–120, [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(94\)90177-5](https://doi.org/10.1016/0009-3084(94)90177-5).
- [20] U. Agero, L.G. Mesquita, B.R.A. Neves, R.T. Gazzinelli, O.N. Mesquita, Defocusing microscopy, *Microsc. Res. Tech.* 65 (2004) 159–165, <https://doi.org/10.1002/jemt.20117>.
- [21] M. Suwalsky, M. Manrique, F. Villena, C.P. Sotomayor, Structural effects in vitro of the anti-inflammatory drug diclofenac on human erythrocytes and molecular models of cell membranes, *Biophys. Chem.* 141 (2009) 34–40, <https://doi.org/10.1016/J.BPC.2008.12.010>.
- [22] J.T. Dodge, C. Mitchell, D.J. Hanahan, The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes, *Arch. Biochem. Biophys.* 100 (1963) 119–130, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(63\)90042-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(63)90042-0).
- [23] M. Jemiola-Rzeminska, C. Rivera, M. Suwalsky, K. Strzalka, Interaction of arsenic compounds with model phospholipid membranes, *Thermochim. Acta* 458 (2007) 132–137, <https://doi.org/10.1016/j.tca.2007.01.004>.
- [24] D. Pentak, W.W. Sułkowski, A. Sułkowska, Calorimetric and EPR studies of the thermotropic phase behavior of phospholipid membranes, *J. Therm. Anal. Calorim.* 93 (2008) 471–477, <https://doi.org/10.1007/s10973-007-8653-z>.
- [25] P. Zambrano, M. Suwalsky, F. Villena, M. Jemiola-Rzeminska, K. Strzalka, In vitro effects of the anti-Alzheimer drug memantine on the human erythrocyte membrane and molecular models, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 483 (2017) 528–533, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.12.111>.
- [26] M. Kusube, H. Matsuki, S. Kaneshina, Thermotropic and barotropic phase transitions of N-methylated dipalmitoylphosphatidylethanolamine bilayers, *Biochim.*

- Biophys. Acta Biomembr. 1668 (2005) 25–32, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.11.002>.
- [27] J.C. Salamone, *Polymeric Materials Encyclopedia, Twelve Volume Set*, <https://www.crcpress.com/Polymeric-Materials-Encyclopedia-Twelve-Volume-Set/Salamone/9780849324703>, (1996).
- [28] E.I. Solntseva, J.V. Bukanova, V.G. Skrebitsky, Donepezil in low micromolar concentrations modulates voltage-gated potassium currents in pyramidal neurons of rat hippocampus, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430 (2013) 1066–1071, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.12.037>.
- [29] K. Li, N. Cheng, X.T. Li, Inhibitory effects of cholinesterase inhibitor donepezil on the Kv1.5 potassium channel, *Sci. Rep.* 7 (2017), <https://doi.org/10.1038/srep41509>.
- [30] S. Di Angelantonio, G. Bernardi, N.B. Mercuri, Donepezil modulates nicotinic receptors of substantia nigra dopaminergic neurones, *Br. J. Pharmacol.* 141 (2004) 644–652, <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705660>.
- [31] S.A. Francis, F. Smith, J. Malkinson, *Integrated Pharmacy: Case Studies, First Ed*, Pharmaceutical Press, London, 2015 <https://books.google.cl/books?id=u0cKjwEACAAJ>.
- [32] N.S. Raja, K. Sankaranarayanan, A. Dhathathreyan, B.U. Nair, Interaction of chromium(III) complexes with model lipid bilayers: implications on cellular uptake, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1808 (2011) 332–340, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.09.015>.
- [33] M.P. Sheetz, S.J. Singer, Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71 (1974) 4457–4461, <https://doi.org/10.1073/pnas.71.11.4457>.
- [34] D.L. Wright, D.T. Plummer, Multiple forms of acetylcholinesterase from human erythrocytes, *Biochem. J.* 133 (1973) 521–527, <https://doi.org/10.1042/bj1330521>.
- [35] M. Heller, D.J. Hanahan, Human erythrocyte membrane bound enzyme acetylcholinesterase, *BBA-Biomembranes* 255 (1972) 251–272, [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(72\)90027-2](https://doi.org/10.1016/0005-2736(72)90027-2).
- [36] C. Saldanha, Human erythrocyte acetylcholinesterase in health and disease, *Molecules.* 22 (2017), <https://doi.org/10.3390/molecules22091499>.
- [37] P. Ott, B.H. Ariano, Y. Binggeli, U. Brodbeck, A monomeric form of human erythrocyte membrane acetylcholinesterase, *Biochim. Biophys. Acta* 729 (1983) 193–199.
- [38] S. Biagioni, G. Scarsella, L. Settini, M.E. Traina, Acetylcholinesterase molecular forms from rat and human erythrocyte membrane, *Mol. Cell. Biochem.* 47 (1982) 183–190 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7144743>.
- [39] C. Ho, C.D. Stubbs, Hydration at the membrane protein-lipid interface, *Biophys. J.* 63 (1992) 897–902, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(92\)81671-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(92)81671-5).
- [40] E. Lang, P. Modicano, M. Arnold, R. Bissinger, C. Faggio, M. Abed, F. Lang, Effect of thioridazine on erythrocytes, *Toxins* 23 (2013) 1918–1931.
- [41] M.G. Paulick, C.R. Bertozzi, The glycosylphosphatidylinositol anchor: a complex membrane-anchoring structure for proteins, *Biochemistry.* 47 (2008) 6991–7000, <https://doi.org/10.1021/bi8006324>.
- [42] H. Dvir, I. Silman, M. Harel, T.L. Rosenberry, J.L. Sussman, Acetylcholinesterase: from 3D structure to function, *Chem. Biol. Interact.* 187 (2010) 10–22, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.01.042>.
- [43] A. Rahman, M.T. Ali, M.M.A.K. Shawan, M.G. Sarwar, M.A.K. Khan, M.A. Halim, Halogen-directed drug design for Alzheimer's disease: a combined density functional and molecular docking study, *Springerplus* 5 (2016), <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2996-5>.

