



Revista CENIC Ciencias Biológicas

ISSN: 0253-5688

ISSN: 2221-2450

Centro Nacional de Investigaciones Científicas

Torres McCook, Angel Ramón; Rodríguez Tanty, Chryslaine; García Pupo, Laura
INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD COLINESTERASA COMO
TERAPIA SINTOMÁTICA PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER
Revista CENIC Ciencias Biológicas, vol. 54, 2023, pp. 044-068
Centro Nacional de Investigaciones Científicas

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181276105011>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org



Sistema de Información Científica Redalyc
Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso
abierto

INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD COLINESTERASA COMO TERAPIA SINTOMÁTICA PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

CHOLINESTERASE ACTIVITY INHIBITORS AS SYMPTOMATIC THERAPY FOR ALZHEIMER'S DISEASE

Angel Ramón Torres McCook ^{a,*}(0000-0002-3115-1990).
Chryslaine Rodríguez Tanty^a (0000-0002-4153-3132).
Laura García Pupo^a (0000-0002-4153-3132).

^a Centro de Neurociencias de Cuba. Biocubafarma.

* angel.torres@cneuro.edu.cu

Recibido: 19 de julio de 2022;

Aceptado: 9 de noviembre de 2022;

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer es una de las principales causas de demencia en la actualidad. Este trastorno neurodegenerativo produce la disminución progresiva de la capacidad cognitiva y la memoria. Entre los procesos bioquímicos que caracterizan esta enfermedad se incluyen la formación de placas β -amiloides, el desarrollo de nudos neurofibrilares, y la pérdida de neuronas colinérgicas en la corteza cerebral. De hecho, la mayoría de los medicamentos disponibles para enfrentar esta enfermedad están dirigidos a las afectaciones que sufren los individuos enfermos en la sinapsis colinérgica del Sistema Nervioso Central. Es por esta razón que el desarrollo de fármacos dirigidos a dianas terapéuticas que permitan incrementar la disponibilidad de acetilcolina en la sinapsis colinérgica es un campo de investigación de gran interés. Sin embargo, el éxito en el uso clínico de estos compuestos resulta limitado por los efectos secundarios que producen y por el carácter multifactorial de esta enfermedad. La presente revisión tiene como objetivo brindar una panorámica sobre la disfunción colinérgica observada en los pacientes de la enfermedad de Alzheimer y que sustenta la hipótesis colinérgica en su fisiopatología. Además, se profundiza en los inhibidores de la actividad colinesterasa de uso clínico e innovadores, como alternativa de terapia sintomática para la enfermedad de Alzheimer.

Palabras clave: inhibición, acetilcolinesterasa, Hipótesis Colinérgica.

ABSTRACT

Alzheimer's disease is one of the leading causes of dementia today. This neurodegenerative disorder results in the progressive decline of cognitive ability and memory. The biochemical processes that characterize this disease include the formation of β -amyloid plaques, the development of neurofibrillary tangles, and the loss of cholinergic neurons in the cerebral cortex. In fact, most of the drugs available to deal with this disease are directed at the affectations suffered by diseased individuals in the cholinergic synapse of the Central Nervous System. It is for this reason that the development of drugs directed to therapeutic targets that allow increasing the availability of acetylcholine in the cholinergic synapse is a field of research of great interest. However, success in the clinical use of these compounds is limited by the side effects they produce and by the multifactorial nature of this disease. The present review aims to provide an overview of the cholinergic dysfunction observed in Alzheimer's disease patients that supports the cholinergic hypothesis in its pathophysiology. In addition, cholinesterase activity inhibitors of clinical and innovative use are discussed as an alternative symptomatic therapy for Alzheimer's disease.

Keywords: inhibition, acetylcholinesterase, Cholinergic Hypothesis.

INTRODUCCION

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por la disminución progresiva de la capacidad cognitiva, que influye negativamente en la ejecución de actividades cotidianas. La edad es uno de los principales factores de riesgo de esta enfermedad, donde más del 95% de los pacientes norteamericanos que la padecen son ancianos mayores de 65 años (Chawla y Parikh, 2020). Se espera que su prevalencia incremente de 30 millones de personas en el 2010 a 113 millones en el 2050 (Alzheimer's Association Report, 2021).

Entre las características fisiopatológicas de la enfermedad se encuentran la acumulación de placas β -amiloides ($A\beta$) en el exterior de las neuronas, y de nudos neurofibrilares en su interior. Las placas se forman por la acumulación de oligómeros de $A\beta$, los cuales contribuyen a la neurodegeneración al interferir en la comunicación interneuronal establecida mediante la sinapsis (Kurt et al., 2001). Los nudos neurofibrilares se forman por la acumulación de inclusiones filamentosas en los cuerpos celulares y las dendritas proximales. En neuronas sanas, la proteína *tau* se asocia con los microtúbulos, y modula la estabilidad de los ensamblajes de tubulina. En la EA, la proteína *tau* se hiperfosforila, pierde su asociación con los microtúbulos y forma filamentos helicoidales pareados que forman los nudos neurofibrilares (Grundke-Iqbal y col., 1986).

Entre las principales causas de la EA se encuentran alteraciones producidas en los sistemas de neurotransmisores presentes en el Sistema Nervioso Central (SNC) (Y.-J. Cheng y col., 2021), especialmente en el sistema colinérgico (Hampel y col., 2018). De hecho, la mayoría de los medicamentos disponibles para el tratamiento de la EA están dirigidos a las afectaciones que sufren individuos enfermos en la sinapsis colinérgica del SNC (Tanaka y col., 2021). Aunque estos fármacos poseen efectos positivos de corta duración y no detienen la progresión de la enfermedad, constituyen una alternativa importante en terapias paliativas con enfoque polifarmacológico (Kabir y col., 2020).

La presente revisión bibliográfica tiene como objetivo brindar una panorámica sobre la disfunción colinérgica observada en los pacientes de la EA y que sustenta la hipótesis colinérgica en su fisiopatología. Además, se profundiza en los inhibidores de la actividad colinesterasa de uso clínico e innovadores, como alternativa de terapia sintomática para la EA.

Sinapsis química

El término sinapsis fue introducido por Sherrington (1987), quien la definió como una zona de contacto especializada en la transmisión de la información entre dos neuronas (Foster & Sherrington, 1897). Actualmente, este término también se utiliza para describir las conexiones de las neuronas con las células efectoras y las células receptoras.

Según el criterio morfofuncional, la sinapsis puede clasificarse como eléctrica o química. La sinapsis eléctrica permite la transmisión de señales despolarizantes rápidas y estereotipadas, a diferencia de la sinapsis química, mediante la que se transmite una mayor variabilidad de señalizaciones, y se producen respuestas más complejas. Esta última puede ser mediada por potenciales excitatorios e inhibitorios, y producir cambios en la conductancia y el potencial de la membrana postsináptica, que duran desde pocos milisegundos hasta minutos. Además, en la sinapsis química está presente el fenómeno de amplificación de las señales neuronales; una pequeña terminal presináptica puede alterar la respuesta de una neurona postsináptica de mayores dimensiones. Por estas razones, la mayoría de las sinapsis presentes en el SNC son químicas.

La sinapsis química no posee continuidad estructural; las células pre- y postsináptica están separadas por la hendidura sináptica, que puede alcanzar hasta 40 nm (Kandel y col., 2013). La transmisión del impulso nervioso depende de la difusión de un neurotransmisor a través de la hendidura sináptica.

Transmisión del impulso nervioso

La secuencia de eventos que desencadena la transmisión del impulso nervioso en la sinapsis química, generalmente, ocurre de forma unidireccional. Como evento previo a este fenómeno, se forman las vesículas sinápticas y se llenan de gran cantidad de moléculas neurotransmisoras. Ante la descarga de un potencial de acción en la neurona presináptica, los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje se abren y permiten el influjo de este ion en la terminal presináptica. Esto incrementa las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} , y permite la fusión de las vesículas con la membrana plasmática de las zonas activas de la membrana presináptica.

Las moléculas neurotransmisoras en el interior de las vesículas son liberadas hacia la hendidura sináptica por exocitosis, difunden a través de la misma y se unen a su receptor en la membrana postsináptica. Esta unión desencadena la apertura o cierre de canales iónicos y altera la conductancia y el potencial de membrana. De esta forma, se establecen las condiciones para la descarga de un potencial de acción en la neurona postsináptica. La subsecuente remoción del neurotransmisor mediante degradación enzimática o su secuestro por células gliales, finaliza su acción (Purves y col., 2018).

Sinapsis colinérgica

La Acetilcolina (ACh) es una amina cuaternaria con función neurotransmisora presente en varios tipos de sinapsis de los sistemas nerviosos periférico y central. Su síntesis requiere de la enzima colinoacetiltransferasa (ChAT), y de los precursores acetilCoA y colina, en el citosol de la terminal axónica. La acetilCoA se sintetiza como resultado del metabolismo celular; mientras que la colina es transportada hacia el interior de la terminal axónica desde el fluido extracelular, mediante un transportador específico dependiente de Na^+ . Una vez concluida la síntesis del neurotransmisor, este es internalizado en vesículas presinápticas mediante un transportador vesicular que intercambia iones H^+ por ACh. Es por esta razón que la producción de ACh está limitada por la concentración intracelular de colina, la cual es dependiente del transporte activo de este precursor al interior de la célula (Harilal y col., 2020).

Las neuronas colinérgicas y algunas no colinérgicas, sintetizan acetilcolinesterasa (AChE) (Bear y col., 2007). Esta enzima es secretada en la hendidura sináptica, y se asocia a la membrana de la terminal axónica postsináptica colinérgica. La misma, degrada la ACh en colina y ácido acético rápidamente, debido a su alta eficiencia catalítica (Quinn, 1987), mecanismo esencial que regula la concentración del neurotransmisor en la hendidura sináptica durante la transmisión colinérgica. La colina resultante de esta degradación es secuestrada nuevamente por la terminal axónica y reutilizada en la síntesis de ACh.

Enzima acetilcolinesterasa

La AChE es una enzima que existe en dos formas moleculares: una forma asimétrica monomérica (G1), localizada en la unión neuromuscular; y una forma globular tetramérica (G4), anclada a la membrana de dominios hidrofóbicos. Esta última forma es la que se encuentra con mayor frecuencia en el SNC y su proporción suele modificarse durante el desarrollo de alguna enfermedad neurodegenerativa. Por ejemplo, durante la EA se ha descrito una pérdida selectiva de la forma G4 en algunas regiones corticales y en el hipocampo (Holzgrabe y col., 2007).

Estudios sobre la modelación molecular y mutagénesis en sitios específicos de la AChE, han evidenciado que esta enzima posee tres dominios específicos con residuos de aminoácidos (aa). Estos residuos contribuyen a la selectividad de la enzima por ciertos inhibidores (Radić y col., 1993), y a la especificidad por el sustrato (Vellom y col., 1993). La primera estructura cristalográfica de la AChE, fue obtenida por Sussman y col. (1991) de *Torpedo californica*. La misma consiste en 537 aa, y contiene 12 hojas plegadas β rodeadas de 14 hélices α (PDB ID: 1EVE). La zona más externa de interacción con el sustrato se denomina sitio aniónico periférico (PAS, de sus siglas en inglés), formado por los residuos Trp 84, Trp 279 y Phe 330 (Sussman y col., 1991). Además, su entrada se encuentra alineada con numerosos aa aromáticos que incluyen: Tyr 70, Tyr 72, Tyr 121, Tyr 279 y Tyr 334. Esta zona incrementa la eficiencia catalítica de la enzima al orientar al sustrato hacia el centro activo (P. Sharma y col., 2020). Adicionalmente, se ha planteado que esta región promueve la agregación del péptido A β , por lo que se piensa que los inhibidores específicos por este sitio también inhiben la deposición de placas A β (Inestrosa y col., 1996).

La zona más interna del centro activo consiste en cuatro subsitios: el bolsillo de acilación, el subsitio aniónico, la cavidad oxianiónica y el sitio catalítico (CAS). Este último, también conocido como sitio esteárico, es el sitio donde ocurre la hidrólisis de la ACh, y está formado por tres aa en *T. californica*: Ser 200, Glu 327 e His 440 (Sussman y col., 1991). El proceso de hidrólisis ocurre en dos etapas sucesivas y muy rápidas de acilación y desacilación (Figura 1).

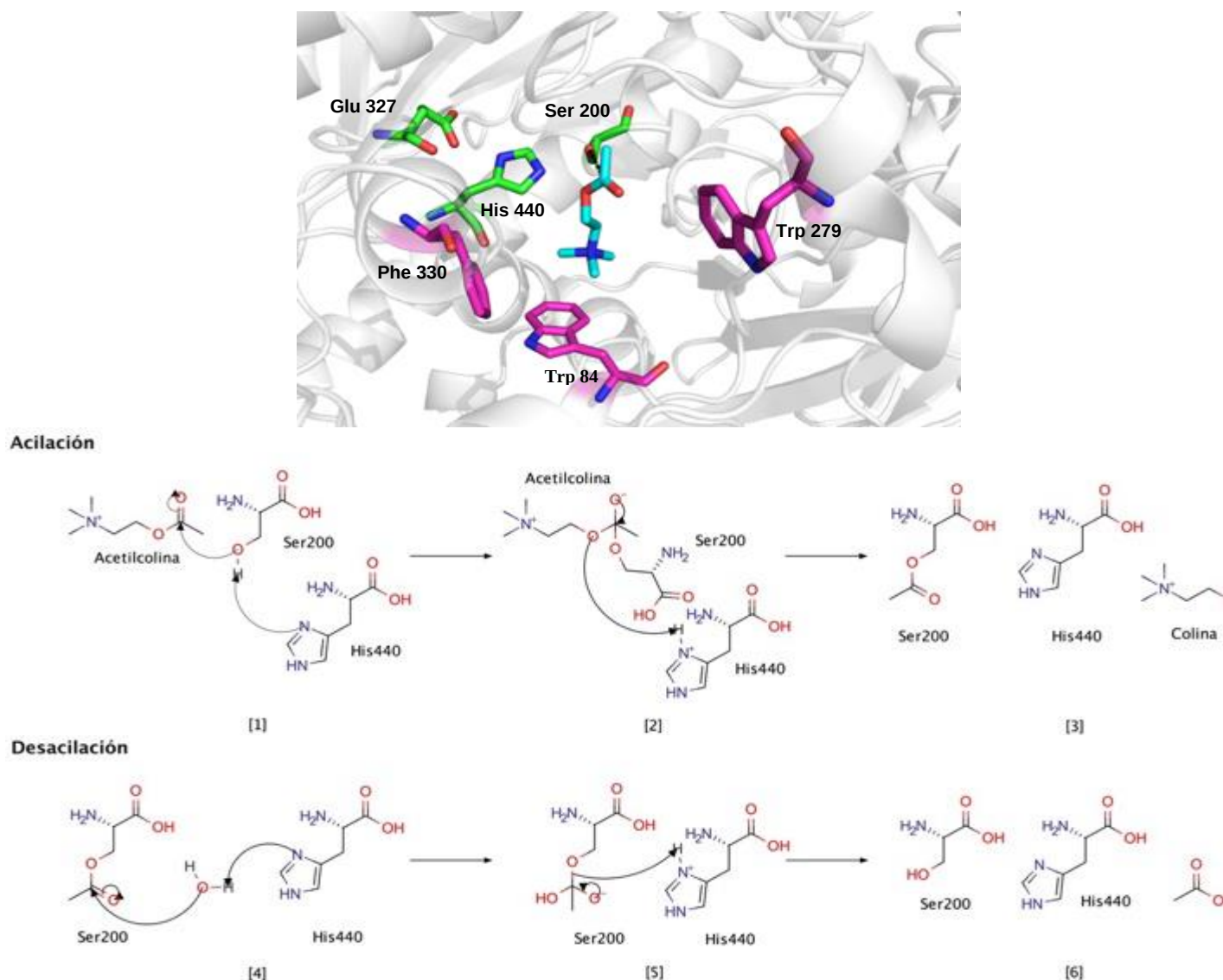


Fig. 1. Mecanismo catalítico de la enzima AChE de *Torpedo californica* en presencia del sustrato ACh. Se observan las interacciones con los aa pertenecientes al CAS (Ser 200, Glu 327 e His 440), en verde, y al PAS (Trp 84, Trp 279 y Phe 330), en magenta, con el sustrato ACh, en azul. Se muestran los reaccionantes ([1] y [4]), intermediarios ([2] y [5]) y productos ([3] y [6]) de los mecanismos de acilación y desacilación, respectivamente.

La cavidad oxianiónica, formada por los residuos Gly 121, Gly 122 y Ala 204 (Ordentlich y col., 1998), es un factor determinante en la geometría del centro activo de la enzima. Este sitio acomoda el grupo acetil del sustrato ACh hacia el CAS para la hidrólisis, y la estabilización del complejo enzima-sustrato (Zhang y col., 2002). Por otra parte, el bolsillo de acilación de la AChE es responsable de la especificidad por el sustrato ACh. En *T. californica*, este subsitio consiste en los residuos aromáticos Trp 233, Phe 288, Phe 290 y Phe 331 (Bajda y col., 2013). Adicionalmente, el subsitio aniónico de la AChE es responsable de acomodar la amina cuaternaria de la ACh, y guiar al sustrato hacia el interior del centro activo. En *T. californica*, este subsitio está conformado por los residuos Trp 84, Glu 199 y Phe 330 (P. Sharma y col., 2020).

Hipótesis colinérgica

La hipótesis colinérgica se basa en un grupo de características neuropatológicas presentes en la transmisión colinérgica de los pacientes con EA. Entre estas características se encuentran: la disminución de neuronas colinérgicas en la corteza cerebral (Bowen y col., 1976; Davies & Maloney, 1976); que el núcleo basal de Meynert en la región basal del cerebro anterior es la fuente de la inervación colinérgica cortical con mayor neurodegeneración en pacientes con EA (Whitehouse y col., 1981); y la demostración de que los antagonistas colinérgicos poseen efectos negativos sobre la memoria y cognición, mientras que los agonistas poseen el efecto contrario (Drachman & Leavitt, 1974).

Adicionalmente, y como parte de la lesión colinérgica, los receptores nicotínicos (nAChR) y muscarínicos de la ACh en corteza, también son afectados (Weinstock, 1995). Por ejemplo, Nordberg (2001) planteó que la progresión del déficit cognitivo durante las primeras etapas de la EA, podría estar asociado a la disminución de los niveles de $\alpha 7$ -nAChR. Además, cerebros humanos *post mortem* con EA, han mostrado daños en el acoplamiento de los receptores M1 con la proteína G (Warpman *y col.*, 1993), y una disminución considerable de los receptores muscarínicos $\alpha 4\beta 2$ (Warpman & Nordberg, 1995). Asimismo, Mulugeta *y col.* (2003) observaron una reducción significativa de los receptores muscarínicos M4 en el giro dentado y en la región CA4 del hipocampo de pacientes con EA.

La denervación colinérgica actúa de conjunto con otras afectaciones en el desarrollo del déficit cognitivo que se produce en la EA (Figura 2), entre los cuales se incluyen los cambios patológicos mediados por las placas A β . Concretamente, se ha descrito que la denervación colinérgica acelera la deposición de A β en ratones *APP/PS1* y contribuye al desarrollo de la discapacidad cognitiva en la EA (Ramos-Rodríguez *y col.*, 2013). Además, estudios *in vitro* basados en células sugieren que la incubación de cultivos celulares con la AChE inhibe la actividad γ -secretasa e incrementa los niveles de la Presenilina 1 (*PS1*, de sus siglas en inglés) (Campanari *y col.*, 2014). Asimismo, la proteína precursora amiloide (*APP*, de sus siglas en inglés) influye en la expresión de la AChE. Hicks *y col.* (2013) observaron que la sobreexpresión de *APP*₆₉₅ reprime la expresión de AChE en líneas neuronales humanas. Adicionalmente, estudios *in silico* han sugerido que los oligómeros A β inhiben la actividad de la ChAT y reducen los niveles de ACh en la neurona (Fgaier *y col.*, 2015). Por otra parte, estudios *in vitro* con proteínas humanas purificadas, describen que los oligómeros A β incrementan la actividad hidrolizante de la butirilcolinesterasa (BChE) mediante la formación de los complejos BA β ACs, junto a la apolipoproteína E (APOE) (Kumar *y col.*, 2016).

También se ha descrito que la unión del péptido A β ₍₁₋₄₂₎ al $\alpha 7$ -nAChR incrementa la actividad sináptica colinérgica, seguido de una dramática inhibición de la misma en el modelo de *Drosophila* (Hahm *y col.*, 2018), y que ese mismo péptido puede inducir la muerte celular en cultivos de neuroblastoma humano con sobreexpresión de $\alpha 7$ -nAChR (Wang *y col.*, 2000). Por su parte, Fisher (2012) describió que la estimulación de receptores muscarínicos M1 y M3 promueve el procesamiento no amiloidogénico de *APP*. Asimismo, Yi *y col.* (2020) plantearon que la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato-5 mediada por los oligómeros A β , regula negativamente la actividad de los receptores muscarínicos M1.

La relación entre el sistema colinérgico central y los cambios patológicos asociados a la proteína *tau* en la EA, también ha sido investigada (Figura 2). Particularmente, se ha descrito que la denervación colinérgica y la activación de la glucógeno sintasa quinasa 3 (*GSK3*, de sus siglas en inglés) aceleran la hiperfosforilación de la proteína *tau* (Zhao *y col.*, 2013). Esto produce el desprendimiento de *tau* de los microtúbulos, lo cual interfiere con los motores de kinesina y perjudica el transporte mitocondrial en el axón neuronal. Por su parte, la activación de los receptores M1 activa la proteína quinasa C (*PKC*, de sus siglas en inglés) e inhibe la *GSK3- β* , lo cual produce una reducción significativa de la hiperfosforilación de *tau* (Agarwal *y col.*, 2021).

La acumulación de *tau* en el interior de las neuronas tiene efectos destructivos sobre las estructuras sinápticas (Majdi *y col.*, 2020). Se ha descrito que degrada los receptores nicotínicos en la membrana postsináptica mediante la activación de la calpaina-2 en cultivos celulares de hipocampo (Yin *y col.*, 2016). Por otra parte, la estimulación de los receptores $\alpha 7$ -nAChR activa la janus quinasa activada 2 (*Jak2*, de sus siglas en inglés), la cual se asocia con la tirosina quinasa de tipo no receptor Fyn, y permite la activación de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), que fosforila a la proteína quinasa B (*Akt*, de sus siglas en inglés) y, consecuentemente, inhibe a la *GSK3*, lo cual disminuye la fosforilación de *tau* (Bitner *y col.*, 2009).

Como parte de la neurodegeneración observada en la EA, los nudos neurofibrilares intraneuronales de proteína *tau* hiperfosforilada, pueden ser liberados al ambiente extracelular (Goedert, 1999). Con respecto a esto, Gómez-Ramos *y col.* (2006) sugirieron que los receptores muscarínicos interactúan con *tau* extracelular e incrementan la concentración de Ca²⁺ intracelular a niveles tóxicos en cultivos celulares de neuroblastoma.

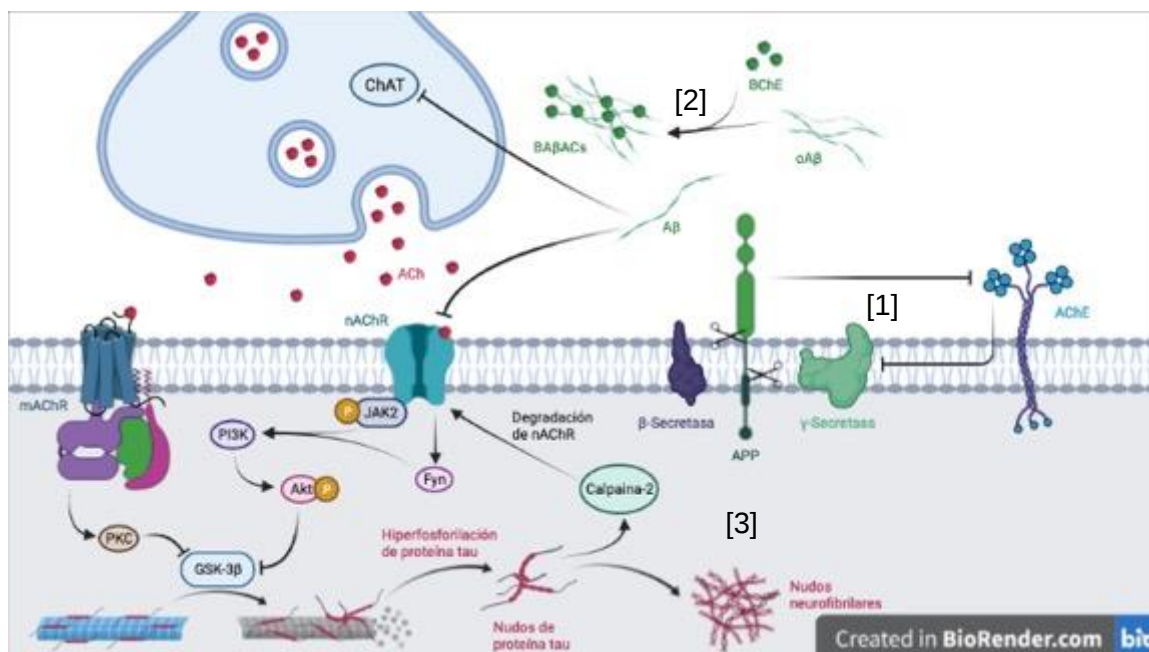


Fig. 2. Relación entre el sistema colinérgico y los cambios patológicos producidos por Aβ y la proteína tau en la EA. [1] La sobreexpresión de APP disminuye la expresión de AChE, en tanto la AChE inhibe la actividad γ-secretasa e incrementa los niveles de PS1. [2] Los oligómeros Aβ forman los complejos BAβACs al interactuar con la BACE1. Estos oligómeros inhiben la actividad de la enzima ChAT y de los receptores nicotínicos α7-nAChR. [3] La acumulación de proteína tau hiperfosforilada intracelular activa a la calpaina-2, la cual degrada los receptores nicotínicos de la ACh. La hiperfosforilación de tau puede disminuir mediante la inhibición de la GSK3. A través de la activación de la PKC por los receptores muscarínicos de la ACh; o la cascada de fosforilación que involucra a la JAK2, la PI3K y la Akt. Hecho en BioRender.com

Inhibidores terapéuticos de la actividad colinesterasa

Los inhibidores de la actividad colinesterasa constituyen un amplio grupo de compuestos químicos con características físico-químicas diferentes. Estos inhiben a las enzimas responsables del hidrólisis de la ACh en la hendidura sináptica, e incrementan la disponibilidad del neurotransmisor en el SNC de los pacientes con EA. Por lo tanto, mejoran la neurotransmisión colinérgica central y mitigan el deterioro cognitivo significativamente en los primeros años de tratamiento (Xu et al., 2021). La interrupción temporal del tratamiento con estos fármacos produce un rápido declive cognitivo y está asociado a un mayor riesgo de ingreso hospitalario (Howard y col., 2015).

La mayoría de las terapias farmacológicas disponibles para enfrentar la EA son principalmente inhibidores de la AChE. Weiner y col. (2009) clasificaron los inhibidores reversibles de la AChE en tres categorías: [1] inhibidores dirigidos al centro activo, que interactúan con el subsitio aniónico catalítico en el fondo del mismo; [2] inhibidores de sitios aniónicos periféricos, que interactúan con grupos en la entrada del centro activo; e [3] inhibidores que interactúan con ambos sitios y forman puentes entre ellos.

Inhibidores de las colinesterasas con uso clínico aprobado

A pesar de la creciente incidencia y prevalencia de la EA, sólo existen seis tratamientos aprobados para su uso en el enfrentamiento terapéutico de esta enfermedad (Lalli y col., 2021; Miziak y col., 2021), de los cuales cuatro son inhibidores de la actividad colinesterasa (Figura 3).

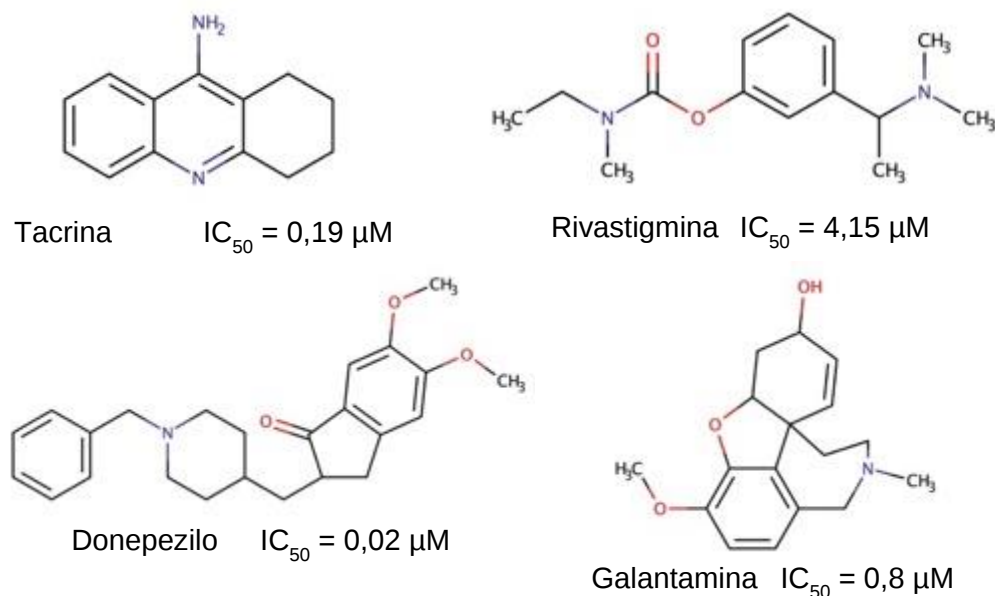


Fig. 3. Estructuras de los inhibidores de la actividad colinesterasa aprobados por la FDA para el tratamiento de la EA, y los valores de IC_{50} descritos para su actividad inhibitoria sobre la AChE humana (Luo y col., 2005).

Tacrina

La tacrina es una aminoacridina capaz de inhibir tanto la actividad colinesterasa (Ahmed y col., 2006) como de la histamina N-metil-transferasa. Además, es un antagonista de los receptores muscarínicos M1 y M2, y es capaz de interactuar débilmente con los receptores nicotínicos de la ACh (Freeman & Dawson, 1991). Este fue el primer medicamento inhibidor de la actividad colinesterasa aprobado por la FDA para combatir la EA. Sin embargo, salió rápidamente del mercado debido a la alta incidencia de efectos secundarios como la hepatotoxicidad, y afectaciones gastrointestinales como náuseas y vómitos (Watkins y col., 1994).

A pesar de poseer un uso discontinuado a nivel clínico, la tacrina continúa siendo de interés investigativo para muchos grupos dedicados a la formulación y síntesis de agentes multifuncionales para el tratamiento de la EA. Esto se debe a que su hepatotoxicidad puede ser abolida mediante su unión a otros farmacóforos (Panek y col., 2017). La tacrina constituye por tanto una referencia para el diseño de nuevos fármacos sin efectos hepatotóxicos, y capaces de modular diversas dianas biológicas relacionadas con el progreso y evolución de la EA (Bautista-Aguilera y col., 2020).

Rivastigmina

La rivastigmina es un derivado de fenilcarbamato, capaz de inhibir de manera pseudoirreversible la actividad colinesterasa, con efectos de mayor duración de la que puede cuantificarse en el plasma. Una vez absorbida, su comportamiento es similar al de la ACh y se une tanto al centro activo como al sitio aniónico periférico de la AChE. En lugar de disociarse inmediatamente tras su hidrólisis, la rivastigmina deja el sitio esterático de la AChE carbamilado temporalmente, lo cual inhibe la actividad enzimática (Nguyen y col., 2021).

La rivastigmina es capaz de inhibir ambas colinesterasas, lo cual posee relevancia clínica para el tratamiento de la EA. Esto es debido a que se han descrito elevados niveles de BChE en el hipocampo y la corteza temporal de pacientes con EA, mientras que la actividad de la AChE disminuye en dichas regiones (Perry y col., 1978). Además, la inhibición de ambas colinesterasas incrementa más los niveles de ACh en el cerebro, en comparación con la simple inhibición de una de estas enzimas (Lane y col., 2006). Adicionalmente, es el único de los inhibidores de la actividad colinesterasa empleado para la terapia sintomática de la EA que disminuye sustancialmente la actividad AChE en el líquido cefalorraquídeo (Marco-Contelles y col., 2006).

De hecho, en pacientes con niveles de EA leves a moderados, mejora las funciones cognitivas y su desenvolvimiento en actividades cotidianas. La administración oral de rivastigmina está asociada a efectos tróficos adversos como náuseas, vómitos, dispepsia, astenia, anorexia y pérdida de peso (Müller, 2007). Estos efectos secundarios suelen desaparecer a medida que aumenta el tiempo de consumo del fármaco, pero constituyen la causa principal por la cual los pacientes suelen abandonar el tratamiento.

La rivastigmina puede administrarse mediante parches transdérmicos de manera controlada y continua (Lefèvre y col., 2007, 2009), lo cual genera mayor tolerabilidad y reducción de los efectos secundarios. Esta forma de

administración resulta ventajosa, ya que muchos pacientes con EA sufren problemas de deglución, lo cual afecta la administración de fármacos orales a intervalos regulares (Khoury y col., 2018).

Galantamina

La galantamina es un alcaloide terciario de isoquinolina que ha sido obtenido de varias plantas que incluyen algunas especies del género *Galanthus*, y otros géneros relacionados, que incluyen *Narcissus*, *Leucojun* y *Lycoris* (Shi & Seltzer, 2011). El costo de extracción de esta sustancia es elevado, y las fuentes naturales de las que proviene escasas, por lo que se han desarrollado métodos para su síntesis (Marco-Contelles y col., 2006).

La galantamina es un inhibidor competitivo y reversible, con alta selectividad por la AChE (Scott & Goa, 2000). Aunque el mecanismo de acción de este inhibidor aún no ha sido completamente dilucidado, se ha asociado su efecto terapéutico al incremento de la función colinérgica. Este es el único fármaco comercialmente disponible que, además, modula alostéricamente la subunidad α de los receptores nAChR y los activa (Woodruff-Pak y col., 2001, 2002). Los nAChR se localizan en terminales de neuronas colinérgicas y no colinérgicas. La activación de estos receptores estimula la liberación de ACh y de otros neurotransmisores como la dopamina, la noradrenalina, el 5-HT y el glutamato. Por eso la acción moduladora alostérica de la galantamina en los nAChR se asocia al incremento de la liberación de estos neurotransmisores en el SNC (Ago y col., 2011).

Este fármaco mejora los síntomas conductuales, el desenvolvimiento en actividades cotidianas y el procesamiento cognitivo con buena eficacia y tolerabilidad. Entre los principales efectos adversos se encuentran náuseas, vómitos, diarrea, anorexia y pérdida de peso (Epperly y col., 2017). Entre los efectos adversos no tróficos que producen la discontinuidad del tratamiento se encuentran mareos y síncope; aunque estos han sido descritos en la minoría de los pacientes. La mayoría de estas afectaciones ocurren durante el período de escalada de la dosis. El consumo de galantamina junto a los alimentos y la ingesta adecuada de líquido promueve la reducción de estos efectos no deseados (Shi & Seltzer, 2011).

La galantamina se desarrolló inicialmente como un comprimido de liberación inmediata y posteriormente se reformuló como una cápsula de liberación prolongada (Hing y col., 2005). Sin embargo, se han desarrollado varios métodos para mejorar la administración de este fármaco. Por ejemplo, Wahba y col. (2016) adjuntaron la galantamina a nanopartículas de hidroxipatita que contenían cerio para la administración selectiva del fármaco a las regiones afectadas del cerebro. Otro ejemplo de optimización de la administración de la galantamina se evidencia en el profármaco Memogain. Este se aplica nasalmente, lo cual permite la llegada más rápida del fármaco al cerebro de pacientes con EA (Bhattacharya y col., 2015). También se han desarrollado parches transdérmicos de galantamina, los cuales poseen un pH moderado, alto contenido del fármaco y un patrón de liberación controlada del mismo, con alto potencial para el tratamiento de la EA (Woo y col., 2015).

Donepezilo

El donepezilo es un derivado de la indanonebenzilpiperidina que actúa como inhibidor reversible y no competitivo de la actividad colinesterasa en el SNC y otros tejidos (Brewster II y col., 2018). Posee una mayor selectividad por la AChE, en comparación con la BChE (Dooley & Lamb, 2000) y es considerado como el fármaco líder para el tratamiento de la EA (Breijyeh & Karaman, 2020). La unión del donepezilo a la AChE inhibe la hidrólisis de la ACh y aumenta la disponibilidad de este neurotransmisor en la hendidura sináptica.

Debido al amplio uso que posee este fármaco en el tratamiento de la EA, los efectos adversos que produce su administración y consumo han sido de gran interés investigativo. En un estudio comparativo de Hansen y col. (2008), se observó que la incidencia de los efectos adversos comunes entre los inhibidores de la actividad colinesterasa disponibles para el tratamiento de la EA, son menos frecuentes en el donepezilo y más frecuentes en la rivastigmina. Estos efectos adversos pueden clasificarse en dos categorías: [1] efectos secundarios comunes, observados generalmente en pacientes con EA; y [2] efectos secundarios poco frecuentes o extraordinarios, observados sólo en condiciones especiales o en pequeños grupos de pacientes bajo tratamiento con otros medicamentos concomitantes y que sufren de otras patologías. Las reacciones adversas más frecuentes producidas por el tratamiento con donepezilo incluyen: problemas cardiovasculares (Kuwahata y col., 2021); alteraciones del sistema digestivo, hemáticas y linfáticas; cambios metabólicos y nutricionales; problemas musculares y esqueléticos; complicaciones en el sistema respiratorio, piel y apéndices; problemas urogenitales y del SNC. Estos últimos incluyen: agitación, insomnio, confusión, depresión, ansiedad, mareos, vértigo, dolor de cabeza, inquietud y alucinaciones (Cacabelos, 2007; Haake y col., 2020).

Dubois y col. (2014) observaron una reducción del 45% de la tasa de atrofia del hipocampo tras un tratamiento con donepezilo en pacientes con sospecha de EA prodrómica. Resultados similares fueron obtenidos por Cavedo y col. (2017), quienes observaron que la administración de donepezilo en la fase prodrómica de la EA redujo sustancialmente la tasa de atrofia de los núcleos del sistema colinérgico en la región basal del cerebro anterior. Además, se ha descrito que el donepezilo posee un efecto neuroprotector contra las lesión celular neuronal inducida por los oligómeros A β (Kimura, Akasofu, y col., 2005; Kimura, Komatsu, y col., 2005). Estos resultados

sugieren que el donepezilo disminuye el deterioro cognitivo no sólo mediante la mejora de la función colinérgica, sino también mediante la inhibición de la neurodegeneración progresiva en la EA.

Terapias combinadas de inhibidores en uso clínico

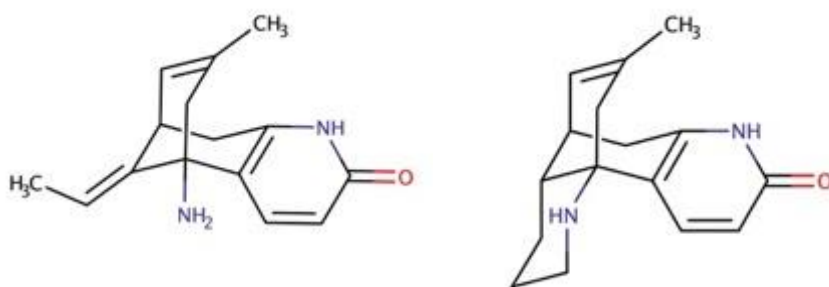
La combinación de terapias farmacológicas aprobadas por la FDA constituye una alternativa para mejorar la eficacia del tratamiento de la EA. De hecho, Matsunaga y col. (2015) sugirieron la combinación de los inhibidores colinesterásicos y la memantina, inhibidor de los receptores NMDA, como un tratamiento beneficioso para pacientes con EA de moderada a grave. También se ha descrito que la combinación de galantamina y memantina, constituye una mejor alternativa en comparación con la monoterapia con galantamina para mejorar la cognición de pacientes con deterioro cognitivo leve debido a la EA (Koola, 2020). Además, se ha observado que la combinación de estos fármacos es superior a la de donepezilo y memantina, en cuanto al mejoramiento cognitivo de pacientes con EA (Koola y col., 2018).

Inhibidores derivados de fuentes naturales en fase de estudio preclínico

Huperzinas

Las huperzinas (Hup) son alcaloides de licopodio, que pueden ser extraídos y aislados de la planta *Huperzia serrata* (J.-S. Liu y col., 1986). Esta planta fue utilizada en la medicina natural y tradicional china para aliviar la deficiencia de memoria. Estos compuestos poseen potencialidades para su uso en el tratamiento sintomático de la EA, pues incrementan la disponibilidad de ACh en la hendidura sináptica (K. Sharma, 2019).

Existen dos tipos de Hup: la HupA y la HupB (Figura 4). La Hup A es un fuerte inhibidor reversible de la AChE ($K_i = 20 - 40$ nM) (Rajendran y col., 2002) que interactúa con los residuos aromáticos presentes en el centro activo de la enzima AChE (Upadhyay y col., 2019). Adicionalmente, la Hup A posee una alta afinidad por la enzima AChE, lo que permite una rápida formación del complejo AChE-HupA, el cual se disocia lentamente (Upadhyay, Ahmad, Sharma, y col., 2020). En comparación con otros inhibidores de la AChE disponibles, como la rivastigmina, el donepezilo y la tacrina, produce una inhibición más sostenida de la enzima, posee mayor biodisponibilidad oral y es mucho mejor transportada a través de la barrera hematoencefálica (BHE) (D. H. Cheng & Tang, 1998).



Huperzina A $IC_{50} = 0,07 \mu M$

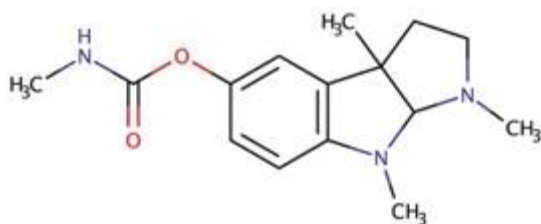
Huperzina B $IC_{50} = 1,93 \mu M$

Fig. 4. Estructura química de las huperzinas A y B, y los valores de IC_{50} descritos para su actividad inhibitoria sobre la AChE (Szypula y col., 2020).

No existen muchos estudios farmacológicos sobre las propiedades de la Hup B, aunque se le conoce por ser un inhibidor reversible con alta selectividad por la AChE (J. Liu et al., 1999). Como inhibidor de la AChE, la HupB ($IC_{50} = 1930$ nM) es más débil que la HupA ($IC_{50} = 72,4$ nM) (Szypula y col., 2020), pero posee un mayor índice terapéutico (Hanin y col., 1991). Adicionalmente, es un agente terapéutico más potente que la galantamina, pero más débil que la fisostigmina (Yan y col., 1987).

Fisostigmina

La fisostigmina, también conocida como eserina, es un alcaloide (Figura 5) aislado de las semillas de *Physostigma venenosum*, y constituye un prototipo de inhibidor pseudoirreversible de la AChE ($IC_{50} = 1,0$ nM) (Zhan y col., 2010), con alta selectividad por esta enzima (Adeniyi & Conradie, 2019). A pesar que este fármaco puede atravesar la BHE, carece de índice terapéutico debido a que es altamente tóxico (Dembitsky y col., 2020), su tiempo de vida medio es muy corto, y posee numerosos efectos adversos. Entre estos últimos se encuentran: diarrea, dolor estomacal, incremento de la salivación y sudoración excesiva (Arens & Kearney, 2019). Estas desventajas produjeron que no fuera aprobada para su uso en el tratamiento de la EA (Coelho & Birks, 2001).



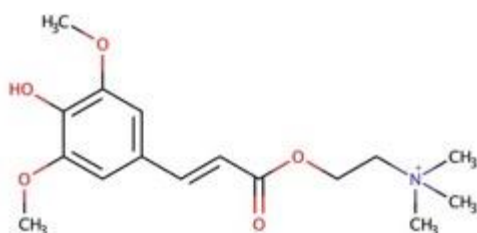
Fisostigmina $IC_{50} = 1,0 \text{ nM}$

Fig. 5. Estructura química de la fisostigmina y el valor de IC_{50} descrito para su actividad inhibitoria sobre la AChE (Zhan y col., 2010).

A pesar de sus efectos adversos, la administración de fisostigmina produce otros efectos positivos, además de incrementar la disponibilidad de ACh en la sinapsis colinérgica. Por ejemplo, Bitzinger y col. (2019) observaron que la administración de fisostigmina en ratas Wistar disminuyó significativamente el estrés oxidativo al inhibir la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, de sus siglas en inglés). Estas propiedades de la fisostigmina resultan de gran interés clínico y potencian la continuidad de las investigaciones relacionadas con este compuesto.

Sinapina

La sinapina es un éster de ácido sinápico y colina (Figura 6) que puede extraerse de las semillas de plantas crucíferas como *Raphanus sativus*. Este compuesto se encuentra estructuralmente muy relacionado con la ACh, y actúa como un inhibidor competitivo de la enzima AChE (Hasan y col., 1981).



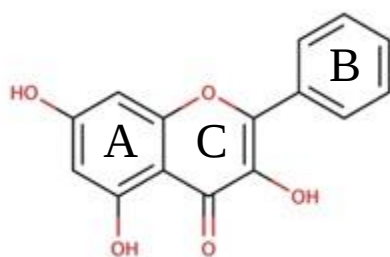
Sinapina $IC_{50} = 3,4 \text{ mg/mL}$

Fig. 6. Estructura química de la sinapina y el valor de IC_{50} descrito para su actividad inhibitoria sobre la AChE (Ferrerres y col., 2009).

La fuerte capacidad inhibitoria de la sinapina sobre la AChE en modelos *in silico* e *in vitro* (Yates y col., 2018), y *ex vivo*; aunque esta inhibición fue más débil en ensayos realizados en plasma (He y col., 2008). Adicionalmente, Ferreres y col. (2009) observaron valores de $IC_{50} = 3,399 \text{ mg/mL}$ en ensayos enzimáticos con extractos secos liofilizados de *Brassica oleraceae* que contenían $22,8 \mu\text{g/mL}$ de sinapina.

Galangina

La galangina es un flavonol (Figura 7) derivado de los rizomas de la planta *Alpiniae officinarum*, que ha mostrado potente actividad inhibitoria de la AChE ($IC_{50} = 120 \mu\text{M}$) (Guo y col., 2010; Shaikh y col., 2014). La naturaleza flavonoide de este compuesto le confieren una superficie de polaridad topológica muy baja y un coeficiente de partición agua-lípido muy alto. Estas características permiten que la galangina atraviese la BHE con relativa facilidad y actividad potencial (Baker, 2022).



Galangina $IC_{50} = 120 \mu M$

Fig. 7. Estructura química de la galangina y el valor de IC_{50} descrito para su actividad inhibitoria sobre la AChE (Guo y col., 2010).

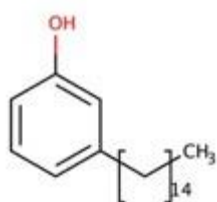
La actividad inhibitoria de la galangina sobre las enzimas colinesterasas está altamente relacionada con sus características estructurales. De hecho, Xie y col. (2014) observaron que la hidroxilación del anillo A de los flavonoides incrementa el potencial inhibitorio de estos compuestos. Esto probablemente se deba a la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo en ese anillo aromático y el centro activo de la enzima.

La actividad anticolinesterásica de la galangina ha sido evaluada en modelos *in vivo*. Por ejemplo, Kilic y col. (2019) observaron que la galangina disminuyó el deterioro de la memoria inducido por la administración de escopolamina y mecamilamina en ratas *Sprague Dawley*. Estos autores sugirieron que la galangina producía dicho efecto debido a que no sólo inhibía la actividad colinesterásica, sino que interactuaba con los receptores nicotínicos y muscarínicos de la acetilcolina. Además, observaron que la administración aguda de galangina aumentó las concentraciones de ACh en el hipocampo de los individuos tratados y no tratados con escopolamina o mecamilamina.

Adicionalmente, Katalinić y col. (2010) observaron que la galangina se une a la BChE con una preferencia 12 veces mayor que a la AChE. Estos autores comentaban que dicha afinidad podía deberse a que el anillo aromático B de este flavonoide no se encuentra hidroxilado. Sus resultados permiten sugerir que la galangina es un compuesto prometedor y relevante en la búsqueda de inhibidores de la BChE. A pesar de las potencialidades que posee la galangina como inhibidor de las enzimas colinesterasas, no se han realizado investigaciones sobre su toxicidad en ensayos preclínicos o clínicos (K. Sharma, 2019).

Cardanol

El cardanol es un lípido fenólico no isoprenoide (Figura 8) obtenido del extracto de la cáscara de *Anacardium occidentale*, que mostró cierto grado de inhibición de la AChE (de Paula y col., 2009). No se han realizado muchos estudios farmacológicos para evaluar sus propiedades anticolinesterásicas, aunque se ha descrito que posee un valor de $IC_{50} = 4,0 \mu M$ (Stasiuk y col., 2014). Adicionalmente, su toxicidad no ha sido investigada en ensayos preclínicos ni clínicos (K. Sharma, 2019).



Cardanol $IC_{50} = 4,0 \mu M$

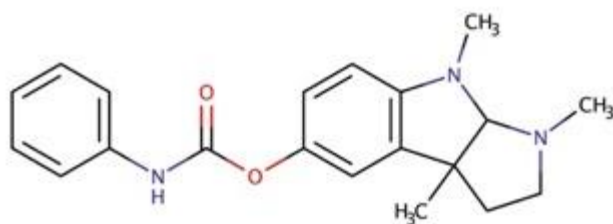
Fig. 8. Estructura química de la cardanol y el valor de IC_{50} descrito para su actividad inhibitoria sobre la AChE (Uliassi y col., 2021).

Inhibidores sintéticos en fase de estudio preclínico

Derivados de la fisostigmina

Fenserina

La fenserina es un fenilcarbamato derivado de la fisostigmina (Figura 9), con actividad inhibitoria selectiva por la AChE (Al-Jafari y col., 1998). Sobre este compuesto, Tabrez y Damanhour (2019) estimaron que posee una $IC_{50} = 13,93 \text{ nM}$, y plantearon que su mecanismo de inhibición sobre la enzima es mixto. Este compuesto se une tanto a la enzima libre como al complejo enzima-sustrato, y con valores de K_i de $0,39 \mu M$ y $0,21 \mu M$, respectivamente.



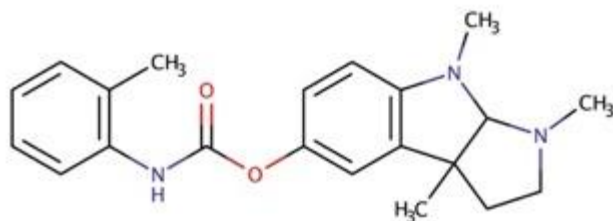
Fenserina $IC_{50} = 13,93 \text{ nM}$

Fig. 8. Estructura química de la fenserina y el valor de IC_{50} descrito para su actividad inhibitoria sobre la AChE (Tabrez y Damanhouri, 2019).

Este fármaco también es capaz de reducir la producción de APP en modelos *in vivo* e *in vitro* (Ahmad y col., 2016), además de mejorar la memoria y el aprendizaje de perros y ratas. Adicionalmente, las pruebas realizadas para su uso en el tratamiento de la EA rindieron resultados exitosos en ensayos clínicos de fase II (K. Sharma, 2019). Su toxicidad es menor que la reportada para otros inhibidores terapéuticos de la actividad colinesterasa como la tacrina y la fisostigmina (N H Greig y col., 2000).

Tolserina

La tolserina es un fenilcarbamato derivado de la fisostigmina, cuya estructura difiere de la fenserina por la presencia de un grupo metilo en la posición de su fracción fenilcarbamoil (Q. Yu y col., 1999) (Figura 9). Posee potencialidades para su uso en el tratamiento de la EA, ya que es fácilmente absorbido por las membranas y puede ser aplicado tópicamente en la conjuntiva. Además, es capaz de traspasar la BHE y es utilizada para el tratamiento de toxicidad anticolinérgica severa (Ahmad y col., 2016). Su potencia y selectividad en la inhibición de la AChE humana es mayor ($IC_{50} = 10,3 \text{ nM}$) en comparación con las descritas para la fenserina y la fisostigmina (Kamal y col., 2000; Q.-S. Yu y col., 2011).



Tolserina $IC_{50} = 10,3 \text{ nM}$

Fig. 9. Estructura química de la tolserina y el valor de IC_{50} descrito para su actividad inhibitoria sobre la AChE (Q.-S. Yu y col., 2011).

Eserolina

La eserolina es un metabolito de la fisostigmina (Figura 10) que actúa como agonista opioide (Fürst y col., 1982). A diferencia de la fisostigmina, su efecto sobre la inhibición de la AChE es limitado y reversible (Galli y col., 1982), con mayor afinidad por esta enzima que por la BChE (Motel y col., 2013). Adicionalmente, Galli y col. (1996) obtuvieron un valor de $IC_{50} = 1,0 \mu\text{M}$ para este compuesto. El desarrollo de este fármaco fue interrumpido debido a su neurotoxicidad, pues produce la muerte de células neuronales mediante un mecanismo que involucra la pérdida de ATP (Somani y col., 1990).

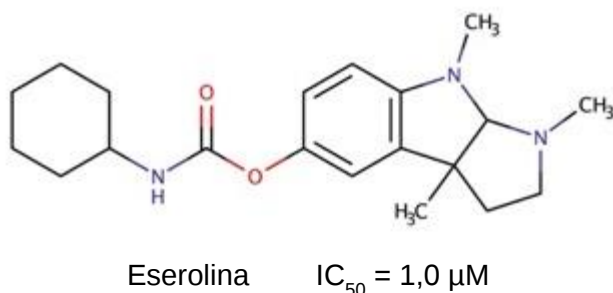


Fig. 10. Estructura química de la eserolina. Se muestra el valor de IC_{50} descrito para la actividad inhibitoria de este compuesto sobre la AChE (Galli y col., 1996).

Cymserina

La cymserina (Figura 11) es un inhibidor reversible de la BChE ($IC_{50} = 51 \text{ nM}$) (Q.-S. Yu y col., 2011), que permite incrementar los niveles de ACh en el cerebro sin producir efectos adversos como temblor, lagrimeo, salivación o afectaciones tróficas (Nigel H. Greig y col., 2002). Este compuesto posee un mecanismo de inhibición no competitivo y mixto sobre la BChE (Kamal y col., 2006), lo cual probablemente sea consecuencia de las múltiples interacciones hidrofóbicas secundarias y los puentes de hidrógenos que forma con el sitio activo de la enzima (Luo y col., 2005). Adicionalmente, la cymserina y algunos de sus derivados y análogos reducen los niveles de APP y A β (Kamal y col., 2008), y poseen propiedades antiinflamatorias (Reale y col., 2014).

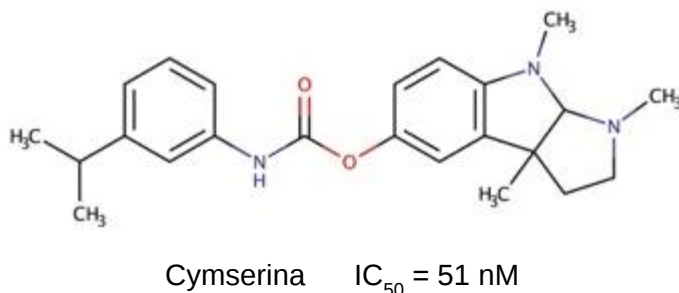


Fig. 11. Estructura química de la cymserina y el valor de IC_{50} descrito para su actividad inhibitoria sobre la BChE (Q.-S. Yu y col., 2011).

Metrifonato

El metrifonato es un inhibidor organofosforado de la AChE con acción prolongada, y se utiliza en el tratamiento de la esquistosomiasis (Nordgren y col., 1981). Este fármaco puede mejorar la neurotransmisión colinérgica mediante un metabolito farmacológicamente activo, el 2,2-diclorovinil-dimetil-fosfato, obtenido por una hidrólisis no enzimática del metrifonato (Figura 12). La administración de metrifonato una vez al día mejora la función cognitiva de pacientes con EA de media a moderada (Cummings y col., 1998). La tolerabilidad de este fármaco es buena, pero su uso produce efectos secundarios adversos a largo plazo, entre los que se incluyen problemas con la transmisión neuromuscular y parálisis respiratoria (López-Arrieta & Schneider, 2010). Por esta razón, el desarrollo de este fármaco fue interrumpido durante los ensayos clínicos de fase III.

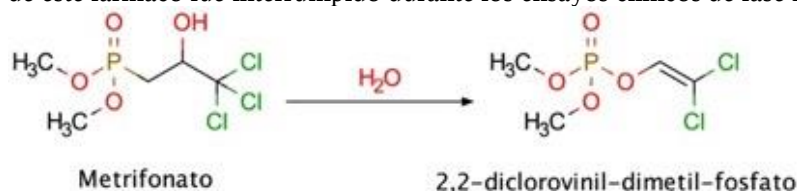


Fig. 12. Obtención del metabolito farmacológicamente activo 2,2-diclorovinil-dimetil-fosfato mediante la hidrólisis no enzimática del metrifonato.

Inhibidores híbridos

Debido a que la EA posee carácter multifactorial, es necesario el diseño de pequeñas moléculas capaces de interactuar con múltiples dianas terapéuticas implicadas en la patología de esta enfermedad. Entre las propiedades ideales que deben presentar estas nuevas entidades se encuentran: [1] un elevado índice terapéutico; [2] la capacidad de atravesar la BHE; [3] tener características neuroprotectoras y antioxidantes, así como propiedades

similares a las de los fármacos con uso clínico aprobado (Bautista-Aguilera y col., 2020). Es por esta razón que es necesario el desarrollo de nuevos compuestos para terapia multiblanco, a partir de farmacóforos promisorios conocidos; especialmente aquellos cuyo uso pueda verse limitado por sus efectos adversos.

Donepezilo-AP2238

AP2238 es un derivado de cumarina (Figura 13) considerado como el primer fármaco desarrollado con la capacidad de interactuar con los dos sitios aniónicos de la AChE humana (Piazzi y col., 2003). Se ha descrito que este compuesto y algunos de sus análogos poseen un grado de actividad similar al donepezilo en cuanto a la inhibición de la AChE (Piazzi y col., 2007), y mayor en cuanto a la inhibición de la toxicidad mediada por los oligómeros A β (Tarozzi y col., 2014).

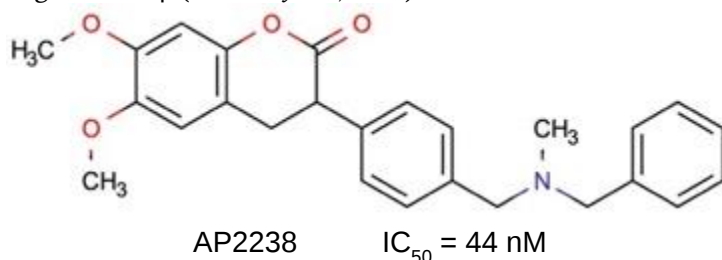


Fig. 13. Estructura química de la cymserina. Se muestra el valor de IC_{50} descrito para la actividad inhibitoria de este compuesto sobre la AChE (Rizzo y col., 2010).

Rizzo y col. (2010) investigaron sobre las características y la actividad de 22 compuestos híbridos de donepezilo y AP2238 (Figura 14). El diseño de estos compuestos perseguía obtener nuevos inhibidores de la AChE, que a su vez inhibiesen la agregación de los oligómeros A β . En su estudio, las dos moléculas con mayor actividad poseían una cadena alquílica de cinco átomos de carbono, y un grupo amino presente en el final de la cadena. Esta estructura permitía una mayor interacción con los sitios aniónicos periféricos de la AChE, lo cual mejoró significativamente la inhibición de la agregación de los oligómeros A β , con respecto a los compuestos de referencia.

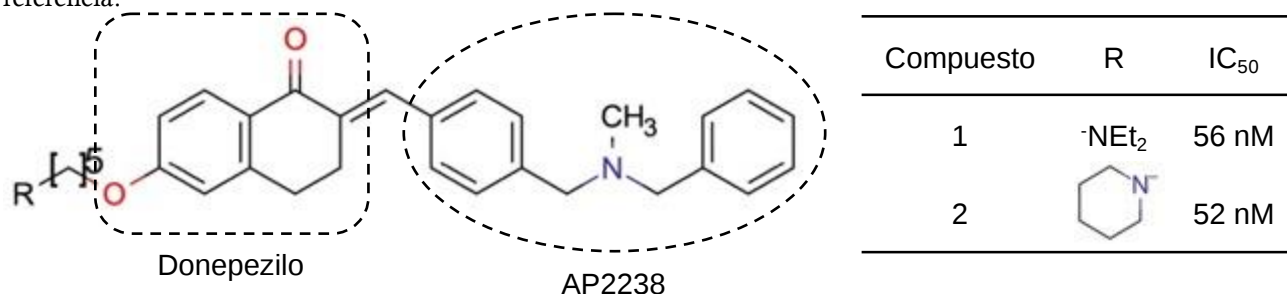


Fig. 14. Estructura química de dos híbridos promisorios de Donepezilo y AP2238 (Rizzo y col., 2010). Se muestran los valores de IC_{50} para su actividad inhibitoria sobre la AChE, y los grupos aportados por los precursores en su diseño. Compuesto 1: (2E)-2-[(4-{[bencil(metil)amino]metil}fenil)metilideno]-6-{[5-(dietilamino)pentil]oxi}-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-ona; Compuesto 2: (2E)-2-[(4-{[bencil(metil)amino]metil}fenil)metilideno]-6-{[5-(piperidin-1-il)pentil]oxi}-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-ona

Donepezilo-Tacrina

A pesar de sus fuertes efectos secundarios, la estructura de la tacrina ha sido ampliamente utilizada en la química medicinal para el diseño de híbridos o compuestos multiblanco sin efectos tóxicos (Oset-Gasque & Marco-Contelles, 2020; Przybyłowska y col., 2021). Eso se debe a que los efectos secundarios producidos por la administración de tacrina pueden ser disminuidos mediante su unión a otros farmacóforos (Spilovska y col., 2017). Entre los farmacóforos utilizados para el diseño de nuevos compuestos híbridos junto a la tacrina se encuentra el donepezilo (Figura 15A). Por ejemplo, Camps y col. (2008) diseñaron una serie de híbridos de tacrina y donepezilo que interactúan simultáneamente con los sitios activos periféricos y mediales de la AChE. Estos híbridos no solo inhiben la actividad de la AChE ($IC_{50} = 0,27 \text{ nM}$) y la BChE ($IC_{50} = 66,3 \text{ nM}$), sino también la deposición A β . Estos compuestos son sintetizados por la combinación de la 6-clorotacrina con la fracción indanona del donepezilo, e inhiben a la AChE con mayor eficiencia que sus compuestos parentales.

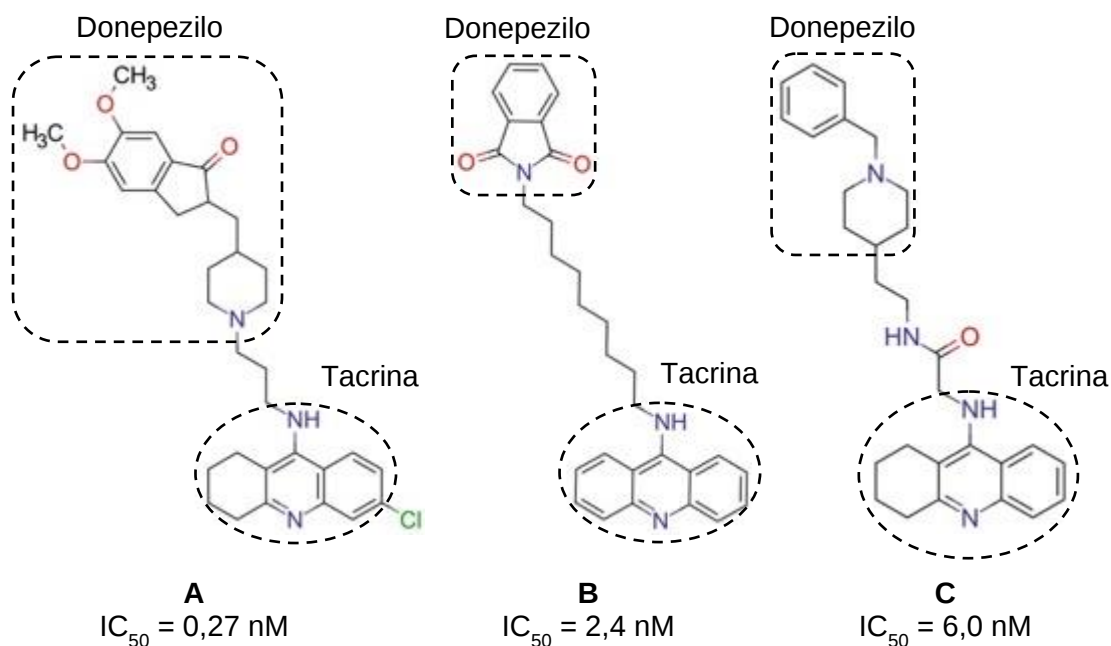


Fig. 15. Estructura química de algunos compuestos híbridos promisorios de Donepezilo y Tacrina con capacidad inhibitoria sobre la actividad colinesterasa. Se muestran los valores de IC_{50} descritos para cada compuesto sobre la AChE, y los grupos aportados por los precursores en su diseño. A: 2-[(1-{3-[(6-cloro-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-il)amino]propil}piperidin-4-il)metil]-5,6-dimetoxi-2,3-dihidro-1H-indeno-1-ona (Camps y col., 2008); B: 2-{9-[(acridina-9-il)amino]nonil}-2,3-dihidro-1H-isoindol-1,3-diona (Alonso y col., 2005); C: N-[2-(1-bencilpiperidin-4-il)etil]-2-[(1,2,3,4-tetrahidroacridina-9-il)amino]acetamida (Shao y col., 2004).

Adicionalmente, Alonso y col. (2005) diseñaron y sintetizaron un compuesto inhibidor potente y selectivo de la AChE ($IC_{50} = 2,4 \text{ nM}$), capaz de desplazar al propidio (inhibidor reversible del PAS) en un ensayo de competencia (Figura 15B). Estos autores sugirieron que la fracción ftalamida presente en este compuesto actuaba como un ligando eficiente del sitio aniónico periférico de la enzima, lo cual permitía una mejor interacción. Además, este híbrido resultó ser mucho más eficiente que sus precursores.

Otro ejemplo de compuestos híbridos de donepezilo y tacrina con potencial inhibitorio de la actividad colinesterasa es el obtenido por Shao y col. (2004). Estos autores lograron sintetizar un inhibidor híbrido de la AChE mucho más potente y selectivo que la tacrina, con una $IC_{50} = 6,0 \text{ nM}$. El estudio *in silico* realizado por estos autores sugirió que este ligando interactuaba con el centro activo de la enzima mediante la formación de puente de hidrógeno.

Huprinas

Las huprinas son compuestos híbridos que combinan la estructura carbocíclica de la HupA con la subestructura 4-aminoquinolina de la tacrina (Camps y col., 2000). La racionalidad de desarrollar esta familia de compuestos híbridos consiste en generar posibles fármacos con mayor selectividad y actividad anticolinesterásica, e incrementar el índice terapéutico de la tacrina. Existen cuatro tipos de huprinas: la huprina X, la huprina Y, la huprina W y la huprina Z (Figura 16).

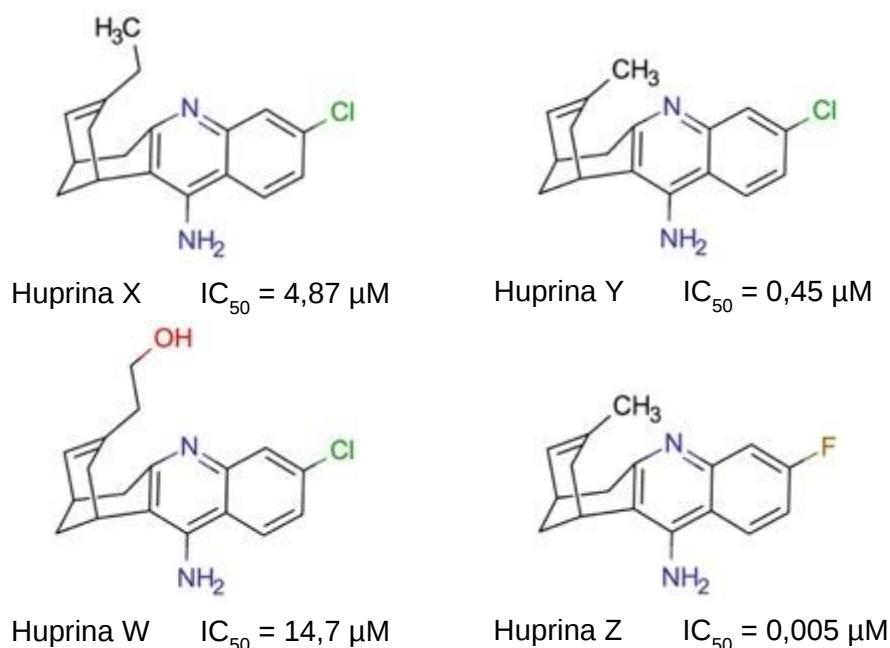


Fig. 16. Estructura química de las huprinas X, Y, W y Z. Se muestran los valores de IC_{50} descritos para la actividad inhibitoria de estos compuestos sobre la AChE (Ros y col., 2001; Alcalá y col., 2003; Son y col., 2019).

La huprina X es un inhibidor reversible de la AChE ($IC_{50} = 4,87 \mu M$) con mayor afinidad que sus compuestos parentales y el donepezilo (Giménez-Llort y col., 2017). Además, es capaz de incrementar los niveles de ACh con mayor eficiencia que la tacrina (Martínez & Castro, 2006). Adicionalmente, este compuesto muestra efectos agonistas sobre los receptores nicotínicos y muscarínicos M1 de la ACh (Roman y col., 2002, 2004). Con respecto a esto, Roman y col. (2005) comentaron que este efecto agonista de los receptores nicotínicos de la ACh parece ser principalmente por la capacidad de este compuesto de inhibir la actividad colinesterasa. Asimismo, en ese mismo artículo plantearon que la huprina X poseía mayor potencial inhibitorio sobre la AChE que la galantamina.

La huprina Y es un inhibidor reversible de la AChE más potente ($IC_{50} = 0,45 \mu M$) que la huprina X (Ros y col., 2001). Este compuesto también ha mostrado efecto neuroprotector en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*, de daño por excitotoxicidad (Canudas y col., 2003). En contraste, Jordá y col. (2004) observaron que la administración de huprina Y no revirtió la pérdida de viabilidad neuronal ni previno el incremento de las características apoptóticas inducidas por colchicina. Es por esta razón que dichos autores sugieren que el fármaco no previene la neurodegeneración inducida por las alteraciones del citoesqueleto.

No existen muchos estudios farmacológicos sobre las propiedades de la huprina W y la huprina Z. Sobre la huprina W, Nachon y colaboradores (2013) observaron que la huprina W y la tacrina interactuaban en posiciones muy similares en el centro activo de las enzimas AChE y BChE humana. Asimismo, comentaban que esta peculiaridad podría deberse a la conservación de las interacciones clave entre las enzimas colinesterasas y dichos inhibidores. Sin embargo, también se percataron que la huprina W formaba más interacciones con el centro activo de la AChE humana, en comparación con la tacrina. Este resultado sugiere que la huprina W posee una mayor afinidad por la enzima que su precursor. Adicionalmente, Son y col. (2019) estimaron que este compuesto poseía un valor de $IC_{50} = 14,7 \mu M$.

Por otro lado, la huprina Z es un inhibidor reversible de la enzima con mayor potencial inhibitorio ($IC_{50} = 5,09 nM$) sobre la AChE humana que sus precursores tacrina y HupA (Alcalá y col., 2003). Adicionalmente, Alcalá y col. (2005) observaron que tanto la huprina Y como la huprina Z estimulaban significativamente la acumulación de fosfatos de inositol de manera dependiente a la concentración. Asimismo, plantearon que la reversión de dichos efectos mediante diferentes antagonistas sugería que estos compuestos activaban a los receptores muscarínicos. Sin embargo, advertían que otros mecanismos celulares podrían estar implicados.

CONCLUSIONES

Los inhibidores de la actividad colinesterasa constituyen terapias farmacológicas paliativas que permiten disminuir el deterioro cognitivo generado por la EA. Sin embargo, la mayoría de estos compuestos producen efectos secundarios severos que han limitado su éxito terapéutico para enfrentar dicha enfermedad neurodegenerativa. Es por ello que se hace necesaria la investigación y desarrollo de compuestos novedosos con mayor índice terapéutico

que permitan enfrentar exitosamente las características neuropatológicas presentes en el sistema colinérgico de individuos con EA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adeniyi, A. A., & Conradie, J. (2019). Computational insight into the anticholinesterase activities and electronic properties of physostigmine analogs. *Future Medicinal Chemistry*, 11(15), 1907–1928.
- Agarwal, M., Alam, M. R., Haider, M. K., Malik, Z., & Kim, D.-K. (2021). Alzheimer's Disease: An Overview of Major Hypotheses and Therapeutic Options in Nanotechnology. *Nanomaterials*, 11(59), 1–18.
- Ago, Y., Koda, K., Takuma, K., & Matsuda, T. (2011). Pharmacological Aspects of the Acetylcholinesterase Inhibitor Galantamine. *Journal of Pharmacological Sciences*, 116, 6–17. <https://doi.org/10.1254/jphs.11R01CR>
- Ahmad, S. S., Akhtar, S., Jamal, Q. M. S., Rizvi, S. M. D., Kamal, M. A., Khan, M. K. A., & Siddiqui, M. H. (2016). Multiple targets for management of Alzheimer's disease. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 15, 1279–1289. <https://doi.org/10.2174/1871527315666161003165855>
- Ahmed, M., Rocha, J. B. T., Corrêa, M., Mazzanti, C. M., Zanin, R. F., Morsch, A. L. B., Morsch, V. M., & Schetinger, M. R. C. (2006). Inhibition of two different cholinesterases by tacrine. *Chemico-Biological Interactions*, 162, 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.06.002>
- Al-Jafari, A. A., Kamal, M. A., Greig, N. H., Alhomida, A. S., & Perry, E. R. (1998). Kinetics of Human Erythrocyte Acetylcholinesterase Inhibition by a Novel Derivative of Physostigmine: Phenserine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 248(RC988931), 180–185.
- Alcalá, M. M., Maderuelo, A., Vivas, N. M., Camps, P., Muñoz-Torrero, D., Clos, M. V., & Badia, A. (2005). Effects of (±)-huprine Y and (±)-huprine Z, two new anticholinesterasic drugs, on muscarinic receptors. *Neuroscience Letters*, 379, 106–109. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.12.044>
- Alcalá, M. M., Vivas, N. M., Hospital, S., Camps, P., Muñoz-Torrero, D., & Badia, A. (2003). Characterisation of the anticholinesterase activity of two new tacrine-huperzine A hybrids. *Neuropharmacology*, 44, 749–755. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(03\)00071-6](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(03)00071-6)
- Alonso, D., Dorronsoro, I., Rubio, L., Muñoz, P., García-Palomero, E., Del Monte, M., Bidon-Chanal, A., Orozco, M., Luque, F. J., Castro, A., Medina, M., & Martínez, A. (2005). Donepezil-tacrine hybrid related derivatives as new dual binding site inhibitors of AChE. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13, 6588–6597. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.09.029>
- Alzheimer's Association Report. (2021). 2021 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 17, 327–406. <https://doi.org/10.1002/alz.12328>
- Arens, A. M., & Kearney, T. (2019). Adverse effects of physostigmine. *Journal of Medical Toxicology*, 15, 184–191. <https://doi.org/10.1007/s13181-019-00697-z>
- Bajda, M., Więckowska, A., Hebda, M., Guzik, N., Sottriffer, C. A., & Malawska, B. (2013). Structure-based search for new inhibitors of cholinesterase. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 5608–5632. <https://doi.org/10.3390/ijms14035608>
- Baker, D. H. A. (2022). An ethnopharmacological review on the therapeutical properties of flavonoids and their mechanisms of actions: A comprehensive review based on up to date knowledge. *Toxicology Reports*, 9, 445–469.
- Bautista-Aguilera, Ó. M., Ismaili, L., Iriepa, I., Diez-Iriepa, D., Chabchoub, F., Marco-Contelles, J., & Pérez, M. (2020). Tacrines as therapeutic agents for Alzheimer's disease. V. Recent developments. *The Chemical Record*, 20, 1–14. <https://doi.org/10.1002/tcr.202000107>
- Bear, M. F., Connors, B. W., & Paradiso, M. A. (2007). *Neuroscience: Exploring the Brain* (3rd ed.). Lippincott Williams & Wilkins.
- Bhattacharya, S., Maelicke, A., & Montag, D. (2015). Nasal Application of the Galantamine Pro-drug Memogain Slows Down Plaque Deposition and Ameliorates Behavior in 5X Familial Alzheimer's Disease Mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, 46, 123–136. <https://doi.org/10.3233/JAD-142421>
- Bitner, R. S., Nikkel, A. L., Markosyan, S., Otte, S., Puttfarcken, P., & Gopalakrishnan, M. (2009). Selective $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor activation regulates glycogen synthase kinase3 β and decreases tau phosphorylation in vivo. *Brain Research*, 1265, 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.01.069>
- Bitzinger, D. I., Gruber, M., Tümmler, S., Malsy, M., Seyfried, T., Weber, F., Redel, A., Graf, B. M., & Zausig, Y. A. (2019). In vivo effects of neogstigmine and physostigmine on neutrophil functions and evaluation of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as inflammatory markers during experimental sepsis in rats. *Mediators of Inflammation*, 2019(8274903). <https://doi.org/10.1155/2019/8274903>
- Bowen, D. M., Smith, C. B., White, P., & Davison, A. N. (1976). Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain*, 99, 459–496.
- Breijyeh, Z., & Karaman, R. (2020). Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules*, 25(5789), 1–28.

- Brewster II, J. T., Dell'Acqua, S., Thach, D. Q., & Sessler, J. L. (2018). Classics in Chemical Neuroscience: Donepezil. *ACS Chemical Neuroscience*, 10(1), 155–167. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.8b00517>
- Cacabelos, R. (2007). Donepezil in Alzheimer's disease: From conventional trials to pharmacogenetics. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 3(3), 303–333.
- Campanari, M.-L., García-Ayllón, M.-S., Belbin, O., Galcerán, J., Lleó, A., & Sáez-Valero, J. (2014). Acetylcholinesterase modulates Presenilin-1 levels and γ -secretase activity. *Journal of Alzheimer's Disease*, 41, 911–924.
- Camps, P., Achab, R. El, Morral, J., Muñoz-Torrero, D., Badia, A., Baños, J. E., Vivas, N. M., Barril, X., Orozco, M., & Luque, F. J. (2000). New Tacrine - Huperzine A Hybrids (Huprines): Highly Potent Tight-Binding Acetylcholinesterase Inhibitors of Interest for the Treatment of Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.*, 43, 4657–4666.
- Camps, P., Formosa, X., Galdeano, C., Gómez, T., Muñoz-Torrero, D., Scarpellini, M., Viayna, E., Badia, A., Clos, M. V., Camins, A., Pallàs, M., Bartolini, M., Mancini, F., Andrisano, V., Estelrich, J., Lizondo, M., Bidon-Chanal, A., & Luque, F. J. (2008). Novel Donepezil-Based Inhibitors of Acetyl- and Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase-Induced β -Amyloid Aggregation. *J. Med. Chem.*, 51, 3588–3598.
- Canudas, A. M., Pubill, D., Sureda, F. X., Verdager, E., Camps, P., Muñoz-Torrero, D., Jiménez, A., Camins, A., & Pallàs, M. (2003). Neuroprotective effects of ($\pm$)-huprine Y on in vitro and in vivo models of excitotoxicity damage. *Experimental Neurology*, 180, 123–130. [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(02\)00029-8](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(02)00029-8)
- Cavedo, E., Grothe, M. J., Colliot, O., Lista, S., Chupin, M., Dormont, D., Houot, M., Lehericy, S., Teipel, S., Dubois, B., Hampel, H., & Hippocampus Study Group. (2017). Reduced basal forebrain atrophy progression in a randomized Donepezil trial in prodromal Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, 7(11706), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09780-3>
- Chawla, P. A., & Parikh, V. (2020). Alzheimer's Disease: The Unwanted Companion of Elderly. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 19(9), 646–647.
- Cheng, D. H., & Tang, X. C. (1998). Comparative studies of huperzine A, E2020, and tacrine on behavior and cholinesterase activities. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 60, 377–386.
- Cheng, Y.-J., Lin, C.-H., & Lane, H.-Y. (2021). Involvement of Cholinergic, Adrenergic, and Glutamatergic Network Modulation with Cognitive Dysfunction in Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2283). <https://doi.org/10.3390/ijms22052283>
- Coelho, F., & Birks, J. (2001). Physostigmine for dementia due to Alzheimer's disease (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2(CD001499). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001499>.
- Cummings, J. L., Cyrus, P. A., Bieber, F., Mas, J., Orazem, J., Gulanski, B., & The Metrifonate Study Group. (1998). Metrifonate treatment of the cognitive deficits of Alzheimer's disease. *Neurology*, 50, 1214–1221.
- Davies, P., & Maloney, A. J. F. (1976). Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *The Lancet*, 308(8000), 1403.
- de Paula, A. A. N., Martins, J. B. L., dos Santos, M. L., Nascente, L. de C., Romeiro, L. A. S., Areas, T. F. M. A., Vieira, K. S. T., Gambôa, N. F., Castro, N. G., & Gargano, R. (2009). New potential AChE inhibitor candidates. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44, 3754–3759. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.03.045>
- Dembitsky, V. M., Dzhemileva, L., Gloriovova, T., & D'yakonov, V. (2020). Natural and synthetic drugs used for the treatment of the dementia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 524, 772–783. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.01.123>
- Dooley, M., & Lamb, H. M. (2000). Donepezil: A Review of its use in Alzheimer's disease. *Drugs & Aging*, 16(3), 199–226.
- Drachman, D. A., & Leavitt, J. (1974). Human Memory and the Cholinergic System. A Relationship to Aging? *Archives of Neurology*, 30, 113–121.
- Dubois, B., Chupin, M., Hampel, H., Lista, S., Cavedo, E., Croisile, B., Tisserand, G. L., Touchon, J., Bonafe, A., Ousset, P. J., Ameur, A. A., Rouaud, O., Ricolfi, F., Vighetto, A., Pasquier, F., Delmaire, C., Ceccaldi, M., Girard, N., Dufouil, C., ... Hippocampus Study Group. (2014). Donepezil decreases annual rate of hippocampal atrophy in suspected prodromal Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2014.10.003>
- Epperly, T., Dunay, M. A., & Boice, J. L. (2017). Alzheimer Disease: Pharmacologic and Nonpharmacologic Therapies for Cognitive and Functional Symptoms. *American Family Physician*, 95(11), 771–778.
- Ferreres, F., Fernandes, F., Sousa, C., Valentão, P., Pereira, J. A., & Andrade, P. B. (2009). Metabolic and Bioactivity Insights into Brassica oleracea var. acephala. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 8884–8892.
- Fgaier, H., Mustafa, I. H. I., Awad, A. A. R., & Elkamel, A. (2015). Modeling the Interaction between β -Amyloid Aggregates and Choline Acetyltransferase Activity and Its Relation with Cholinergic Dysfunction

through Two-Enzyme/Two-Compartment Model. Computational and Mathematical Methods in Medicine, 2015(923762). <https://doi.org/10.1155/2015/923762>

Fisher, A. (2012). Cholinergic modulation of amyloid precursor protein processing with emphasis on M1 muscarinic receptor: perspectives and challenges in treatment of Alzheimer's disease. Journal of Neurochemistry, 120(1), 22–33. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07507.x>

Foster, M., & Sherrington, C. S. (1897). The Central Nervous System. In A Text Book of Physiology (7th ed., pp. 915–1252). Macmillan and Co., Limited.

Freeman, S. E., & Dawson, R. M. (1991). Tacrine: A pharmacological review. Progress in Neurobiology, 36, 257–277. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(91\)90002-I](https://doi.org/10.1016/0301-0082(91)90002-I)

Fürst, S., Friedmann, T., Bartolini, A., Bartolini, R., Aiello-Malmberg, P., Galli, A., Somogyi, G. T., & Knoll, J. (1982). Direct evidence that eseroline possesses morphine-like effects. European Journal of Pharmacology, 83, 233–241.

Galli, A., Ranaudo, E., Giannini, L., & Costagli, C. (1996). Reversible inhibition of cholinesterases by opioids: Possible pharmacological consequences. J. Pharm. Pharmacol., 48, 1164–1168.

Galli, A., Renzi, G., Grazzini, E., Bartolini, R., Aiello-Malmberg, P., & Bartolini, A. (1982). Reversible inhibition of acetylcholinesterase by eseroline, an opioid agonist structurally related to physostigmine (eserine) and morphine. Biochemical Pharmacology, 31(7), 1233–1238.

Giménez-Llort, L., Ratia, M., Pérez, B., Camps, P., Muñoz-Torrero, D., Badia, A., & Clos, M. V. (2017). Behavioural effects of novel multitarget anticholinesterasic derivatives in Alzheimer's disease. Behavioural Pharmacology, 28, 124–131. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000292>

Goedert, M. (1999). Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases: tauopathies and α -synucleinopathies. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, 354, 1101–1118.

Gómez-Ramos, A., Díaz-Hernández, M., Cuadros, R., Hernández, F., & Avila, J. (2006). Extracellular tau is toxic to neuronal cells. FEBS Letters, 580, 4842–4850. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.07.078>

Greig, N H, De Micheli, E., Holloway, H. W., Yu, Q. S., Utsuki, T., Perry, T. A., Brossi, A., Ingram, D. K., Deutsch, J., Lahiri, D. K., & Soncrant, T. T. (2000). The experimental Alzheimer drug pheneserine: preclinical pharmacokinetics and pharmacodynamics. Acta Neurologica Scandinavica, 176, 74–84.

Greig, Nigel H., Lahiri, D. K., & Sambamurti, K. (2002). Butyrylcholinesterase: An important new target in Alzheimer's Disease therapy. International Psychogeriatrics, 14, 77–91. <https://doi.org/10.1017/S1041610203008676>

Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.-C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M., & Bindert, L. I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau in Alzheimer cytoskeletal pathology. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 4913–4917.

Guo, A. J. Y., Xie, H. Q., Choi, R. C. Y., Zheng, K. Y. Z., Bi, C. W. C., Xu, S. L., Dong, T. T. X., & Tsim, K. W. K. (2010). Galangin, a flavonol derived from rhizoma Alpiniae officinarum, inhibits acetylcholinesterase activity in vitro. Chemico-Biological Interactions, 187, 246–248. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.05.002>

Haake, A., Nguyen, K., Friedman, L., Chakkamparambil, B., & Grossberg, G. T. (2020). An update on the utility and safety of cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. Expert Opinion on Drug Safety, 19(2), 147–157. <https://doi.org/10.1080/14740338.2020.1721456>

Hahm, E.-T., Nagaraja, R. Y., Waro, G., & Tsunoda, S. (2018). Cholinergic Homeostatic Synaptic Plasticity Drives the Progression of A β -Induced Changes in Neural Activity. CellReports, 24(2), 342–354. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.029>

Hampel, H., Mesulam, M.-M., Cuello, A. C., Farlow, M. R., Giacobini, E., Grossberg, G. T., Khachaturian, A. S., Vergallo, A., Cavedo, E., Snyder, P. J., & Khachaturian, Z. S. (2018). The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. Brain, 141, 1917–1933. <https://doi.org/10.1093/brain/aww132>

Hanin, I., Tang, X. C., & Kozikowski, A. P. (1991). Clinical and preclinical studies with huperzine. In R. E. Becker & E. Giacobini (Eds.), Cholinergic Basis for Alzheimer Therapy. Advances in Alzheimer Disease Therapy (pp. 305–313). https://doi.org/10.1007/978-1-4899-6738-1_32

Hansen, R. A., Gartlehner, G., Webb, A. P., Morgan, L. C., Moore, C. G., & Jonas, D. E. (2008). Efficacy and safety of donepezil, galantamine, and rivastigmine for the treatment of Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. Clinical Interventions in Aging, 3(2), 211–225.

Harilal, S., Kumar, R., Mathew, G. E., Jose, J., Uddin, M. S., & Mathew, B. (2020). Neurochemicals in Nervous System and Exploring the Chemical Make-Up of Human Brain. In B. Mathew & D. G. T. Parambi (Eds.), Principles of Neurochemistry: Fundamentals and Applications (1st ed., pp. 19–40). Springer Nature. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-15-5167-3_2

Hasan, F. B., Elkind, J. L., Cohen, S. G., & Cohen, J. B. (1981). Cationic uncharged substrates and reversible inhibitors in hydrolysis by acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7). The Trimethyl subsite. The Journal of Biological Chemistry, 256(15), 7781–7785.

He, L., Li, H.-T., Guo, S.-W., Liu, L.-F., Qiu, J.-B., Li, F., & Cai, B.-C. (2008). Inhibitory effects of sinapine on activity of acetylcholinesterase in cerebral homogenate and blood serum rats. China Journal of Chinese Materia Medica, 24, 813–815.

Hicks, D. A., Makova, N. Z., Gough, M., Parkin, E. T., Nalivaeva, N. N., & Turner, A. J. (2013). The Amyloid Precursor Protein Represses Expression of Acetylcholinesterase in Neuronal Cell Lines. The Journal of Biological Chemistry, 288(36), 26039–26051. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.461269>

Hing, J. P., Piotrovsky, V., Kimko, H., Brashear, H. R., & Zhao, Q. (2005). Pharmacokinetic simulation for switching from galantamine immediate-release to extended-release formulation. Current Medical Research and Opinion, 21(4), 283–287. <https://doi.org/10.1185/030079905X38213>

Holzgrabe, U., Kapková, P., Alptüzün, V., Scheiber, J., & Kugelmann, E. (2007). Targeting acetylcholinesterase to treat neurodegeneration. Expert Opin. Ther. Targets, 11(2), 161–179. <https://doi.org/10.1517/14728222.11.2.161>

Howard, R., McShane, R., Lindesay, J., Ritchie, C., Baldwin, A., Barber, R., Burns, A., Denning, T., Findlay, D., Holmes, C., Jones, R., Jones, R., McKeith, I., Macharouthu, A., O'Brien, J., Sheehan, B., Juszcak, E., Katona, C., Hills, R., ... Phillips, P. P. J. (2015). Nursing home placement in the Donepezil and Memantine in Moderate to Severe Alzheimer's Disease (DOMINO-AD) trial: secondary and post-hoc analyses. Lancet Neurology, 14, 1171–1181. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00258-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00258-6)

Inestrosa, N. C., Alvarez, A., Pérez, C. A., Moreno, R. D., Vicente, M., Linker, C., Casanueva, O. I., Soto, C., & Garrido, J. (1996). Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid- β -peptides into Alzheimer's fibrils: Possible role of the peripheral site of the enzyme. Neuron, 16, 881–891.

Jordá, E. G., Verdaguer, E., Jiménez, A., Canudas, A. M., Rimbau, V., Camps, P., Muñoz-Torrero, D., Camins, A., & Pallàs, M. (2004). ($\pm$)-huprine Y, (–)-huperzine A and tacrine do not show neuroprotective properties in an apoptotic model of neuronal cytoskeletal alteration. Journal of Alzheimer's Disease, 6, 577–583.

Kabir, M. T., Uddin, M. S., Mamun, A. Al, Jeandet, P., Aleya, L., Mansouri, R. A., Ashraf, G. M., Mathew, B., Bin-Jumah, M. N., & Abdel-Daim, M. M. (2020). Combination Drug Therapy for the Management of Alzheimer's Disease. International Journal of Molecular Sciences, 21(3272). <https://doi.org/10.3390/ijms21093272>

Kamal, M. A., Al-Jafari, A. A., Yu, Q.-S., & Greig, N. H. (2006). Kinetic analysis of the inhibition of human butyrylcholinesterase with cymserine. Biochimica et Biophysica Acta, 1760, 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.10.003>

Kamal, M. A., Greig, N. H., Alhomida, A. S., & Al-Jafari, A. A. (2000). Kinetics of Human Acetylcholinesterase Inhibition by the Novel Experimental Alzheimer Therapeutic Agent, Tolserine. Biochemical Pharmacology, 60, 561–570.

Kamal, M. A., Qu, X., Yu, Q.-S., Tweedie, D., Holloway, H. W., Li, Y., Tan, Y., & Greig, N. H. (2008). Tetrahydrofurobenzofuran cymserine, a potent butyrylcholinesterase inhibitor and experimental Alzheimer drug candidate, enzyme kinetic analysis. J Neural Transm (Vienna), 115(6), 889–898. <https://doi.org/10.1007/s00702-008-0022-y>

Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A., & Hudspeth, A. J. (Eds.). (2013). Overview of Synaptic Transmission. In Principles of Neural Sciences (5th ed., pp. 177–188). McGraw-Hill Companies, Inc.

Katalinić, M., Rusak, G., Bavorić, J. D., Šinko, G., Jelić, D., Antolović, R., & Kovarik, Z. (2010). Structural aspects of flavonoids as inhibitors of human butyrylcholinesterase. European Journal of Medicinal Chemistry, 45, 186–192.

Khoury, R., Rajamanickam, J., & Grossberg, G. T. (2018). An update on the safety of current therapies for Alzheimer's disease: focus on rivastigmine. Therapeutic Advances in Drug Safety, 9(3), 171–178. <https://doi.org/10.1177/2042098617750555>

Kilic, F. S., Kaygisiz, B., Aydin, S., Yildirim, E., Oner, S., & Eroglu, K. (2019). The effects and mechanisms of the action of galangin on spatial memory in rats. Bratisl Lek Listy, 120(12), 881–886. https://doi.org/10.4149/BLL_2019_148

Kimura, M., Akasofu, S., Ogura, H., & Sawada, K. (2005). Protective effect of donepezil against A β (1-40) neurotoxicity in rat septal neurons. Brain Research, 1047, 72–84. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.04.014>

Kimura, M., Komatsu, H., Ogura, H., & Sawada, K. (2005). Comparison of donepezil and memantine for protective effect against amyloid-beta(1 – 42) toxicity in rat septal neurons. Neuroscience Letters, 391, 17–21. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.08.036>

Koola, M. M. (2020). Galantamine-Memantine combination in the treatment of Alzheimer's disease and beyond. Psychiatry Research, 293(113409). <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2020.113409>

- Koola, M. M., Nikiforuk, A., Pillai, A., & Parsaik, A. K. (2018). Galantamine-memantine combination superior to donepezil- memantine combination in Alzheimer's disease: critical dissection with an emphasis on kynurenic acid and mismatch negativity. *J. Geriatr. Care Res.*, 5(2), 57–67.
- Kumar, R., Nordberg, A., & Darreh-Shori, T. (2016). Amyloid- β peptides act as allosteric modulators of cholinergic signalling through formation of soluble BA β ACs. *Brain*, 139, 174–192. <https://doi.org/10.1093/brain/awv318>
- Kurt, M. A., Davies, D. C., Kidd, M., Duff, K., Rolph, S. C., Jennings, K. H., & Howlett, D. R. (2001). Neurodegenerative Changes Associated with β -Amyloid Deposition in the Brains of Mice Carrying Mutant Amyloid Precursor Protein and Mutant Presenilin-1 Transgenes. *Experimental Neurology*, 171, 59–71. <https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7717>
- Kuwahata, S., Takenaka, T., Motoya, T., Masuda, K., Yonezawa, H., Shinchi, S., Kawashima, Y., Mohri, S., & Ohishi, M. (2021). Effect of QT Prolongation in Patients Taking Cholinesterase Inhibitors (Donepezil) for Alzheimer's Disease. *Circulation Reports*, 1–7. <https://doi.org/10.1253/circrep.CR-20-0115>
- Lalli, G., Schott, J. M., Hardy, J., & Strooper, B. De. (2021). Aducanumab: a new phase in therapeutic development for Alzheimer's disease? *EMBO Molecular Medicine*, 13(e14781), 2–4. <https://doi.org/10.15252/emmm.202114781>
- Lane, R. M., Potkin, S. G., & Enz, A. (2006). Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 9, 101–124. <https://doi.org/10.1017/S1461145705005833>
- Lefèvre, G., Büche, M., Sèdek, G., Maton, S., Enz, A., Lorch, U., Sagan, C., & Appel-Dingemanse, S. (2009). Similar Rivastigmine Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Japanese and White Healthy Participants Following the Application of Novel Rivastigmine Patch. *Journal of Clinical Pharmacology*, 49, 430–443. <https://doi.org/10.1177/0091270008330161>
- Lefèvre, G., Sèdek, G., Huang, H.-L. A., Saltzman, M., Rosenberg, M., Kiese, B., & Fordham, P. (2007). Pharmacokinetics of a Rivastigmine Transdermal Patch Formulation in Healthy Volunteers: Relative Effects of Body Site Application. *Journal of Clinical Pharmacology*, 47, 471–478. <https://doi.org/10.1177/0091270006297748>
- Liu, J.-S., Zhu, Y.-L., Yu, C.-M., Zhou, Y.-Z., Han, Y.-Y., Wu, F.-W., & Qi, B.-F. (1986). The structures of huperzine A and B, two new alkaloids exhibiting marked anticholinesterase activity. *Canadian Journal of Chemistry*, 4, 837–839.
- Liu, J., Zhang, H.-Y., Wang, L.-M., & Tang, X.-C. (1999). Inhibitory effects of huperzine B on cholinesterase activity in mice. *Acta Pharmacologica Sinica*, 20(2), 141–145.
- López-Arrieta, J., & Schneider, L. (2010). Metrifonate for Alzheimer's disease (Review). *The Cochrane Library*, 1, 1–88.
- Luo, W., Yu, Q., Zhan, M., Parrish, D., Deschamps, J. R., Kulkarni, S. S., Holloway, H. W., Alley, G. M., Lahiri, D. K., Brossi, A., & Greig, N. H. (2005). Novel Anticholinesterases Based on the Molecular Skeletons of Furobenzofuran and Methanobenzodioxepine. *J. Med. Chem.*, 48, 986–994.
- Majdi, A., Sadigh-Eteghad, S., Aghsan, S. R., Farajdokht, F., Vatandoust, S. M., Namvaran, A., & Mahmoudi, J. (2020). Amyloid- β , tau, and the cholinergic system in Alzheimer's disease: seeking direction in a tangle of clues. *Reviews in the Neurosciences*, aop, 1–23. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2019-0089>
- Marco-Contelles, J., Carreiras, M. do C., Rodríguez, C., Villaroya, M., & García, A. G. (2006). Synthesis and Pharmacology of Galantamine. *Chem. Rev.*, 106, 116–133.
- Martinez, A., & Castro, A. (2006). Novel cholinesterase inhibitors as future effective drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 15(1), 1–12.
- Matsunaga, S., Kishi, T., & Iwata, N. (2015). Combination Therapy with Cholinesterase Inhibitors and Memantine for Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 1–11. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyu115>
- Miziak, B., Błaszczuk, B., & Czuczwar, S. J. (2021). Some Candidate Drugs for Pharmacotherapy of Alzheimer's Disease. *Pharmaceuticals*, 14(458), 1–34. <https://doi.org/10.3390/ph14050458>
- Motel, W. C., Coop, A., & Cunningham, C. W. (2013). Cholinergic Modulation by Opioid Receptor Ligands: Ptential Application to Alzheimer's Disease. *Mini Rev Med Chem*, 13(3), 456–466.
- Müller, T. (2007). Rivastigmine in the treatment of patients with Alzheimer's disease. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 3(2), 211–218.
- Mulugeta, E., Karlsson, E., Islam, A., Kalaria, R., Mangat, H., Winblad, B., & Adem, A. (2003). Loss of muscarinic M4 receptors in hippocampus of Alzheimer patients. *Brain Research*, 960, 259–262.
- Nachon, F., Carletti, E., Ronco, C., Trovaslet, M., Nicolet, Y., Jean, L., & Renard, P.-Y. (2013). Crystal structures of human cholinesterases in complex with huprine W and tacrine: elements of specificity for anti-

Alzheimer's drugs targeting acetyl- and butyryl-cholinesterase. *Biochemical Journal*, 453(3), 393–399. <https://doi.org/10.1042/BJ20130013>

Nguyen, K., Hoffman, H., Chakkampambil, B., & Grossberg, G. T. (2021). Evaluation of rivastigmine in Alzheimer's disease. *Neurodegenerative Disease Management*, 11(1), 35–48. <https://doi.org/10.2217/nmt-2020-0052>

Nordberg, A. (2001). Nicotinic Receptor Abnormalities of Alzheimer's Disease: Therapeutic Implications. *Biological Psychiatry*, 49, 200–210.

Nordgren, I., Bengtson, E., Holmstedt, B., & Petterson, B. M. (1981). Levels of Metrifonate and Dichlorvos in Plasma and Erythrocytes during Treatment of Schistosomiasis with BiIarci®. *Acta Pharmacol. et Toxicol.*, 49(V), 79–86.

Ordentlich, A., Barak, D., Kronman, C., Ariel, N., Segall, Y., Velan, B., & Shafferman, A. (1998). Functional characteristics of the oxyanion hole in human acetylcholinesterase. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(31), 19509–19517. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.31.19509>

Oset-Gasque, M. J., & Marco-Contelles, J. L. (2020). Tacrine-Natural-Product Hybrids for Alzheimer's Disease Therapy. *Current Medicinal Chemistry*, 27(26), 4392–4400. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180403151725>

Panek, D., Wichur, T., Godyn, J., Pasiaka, A., & Malawska, B. (2017). Advances toward multifunctional cholinesterase and β -amyloid aggregation inhibitors. *Future Medicinal Chemistry*, 9(15), 1835–1854. <https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0094>

Perry, E. K., Perry, R. H., Blessed, G., & Tomlinson, B. E. (1978). Changes in brain cholinesterase in senile dementia of Alzheimer type. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 4, 273–277.

Piazzzi, L., Cavalli, A., Belluti, F., Bisi, A., Gobbi, S., Rizzo, S., Bartolini, M., Andrisano, V., Recanatini, M., & Rampa, A. (2007). Extensive SAR and Computational Studies of 3-{4-[(Benzylmethylamino)methyl]phenyl}-6,7-dimethoxy-2H-2-chromenone (AP2238) Derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50, 4250–4254. <https://doi.org/10.1021/jm070100g>

Piazzzi, L., Rampa, A., Bisi, A., Gobbi, S., Belluti, F., Cavalli, A., Bartolini, M., Andrisano, V., Valenti, P., & Recanatini, M. (2003). 3-(4-{[Benzyl(methyl)amino]methyl}-phenyl)-6,7-dimethoxy-2H-2-chromenone (AP2238) Inhibits Both Acetylcholinesterase and Acetylcholinesterase-Induced γ -Amyloid Aggregation: A Dual Function Lead for Alzheimer's Disease Therapy. *J. Med. Chem.*, 46, 2279–2282.

Przbylowska, M., Dzierzbicka, K., Kowalski, S., Chmielewska, K., & Inkielewicz-Stepniak, I. (2021). Therapeutic Potential of Multifunctional Derivatives of Cholinesterase Inhibitors. *Current Neuropharmacology*, 19(8), 1323–1344.

Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A.-S., Mooney, R. D., Platt, M. L., & White, L. E. (Eds.). (2018). *Synaptic Transmission*. In *Neuroscience* (6th ed., pp. 85–112). Sinauer Associates.

Quinn, D. M. (1987). Acetylcholinesterase: Enzyme Structure, Reaction Dynamics, and Virtual Transition States. *Chem. Rev.*, 87, 955–979.

Radić, Z., Pickering, N. A., Vellom, D. C., Camp, S., & Taylor, P. (1993). Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochemistry*, 32(45), 12074–12084.

Rajendran, V., Saxena, A., Doctor, B. P., & Kozikowski, A. P. (2002). Synthesis of more potent analogues of the acetylcholinesterase inhibitor, Huperzine B. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 12, 1521–1523.

Ramos-Rodriguez, J. J., Pacheco-Herrero, M., Thyssen, D., Murillo-Carretero, M. I., Berrocoso, E., Spires-Jones, T. L., Bacskai, B. J., & Garcia-Alloza, M. (2013). Rapid β -Amyloid Deposition and Cognitive Impairment After Cholinergic Denervation in APP/PS1 Mice. *J Neuropathol Exp Neurol*, 72(4), 272–285.

Reale, M., Di Nicola, M., Velluto, L., D'Angelo, C., Costantini, E., Lahiri, D. K., Kamal, M. A., Yu, Q., & Greig, N. H. (2014). Selective acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors reduce amyloid- β ex vivo activation of peripheral chemo-cytokines from Alzheimer's disease subjects: exploring the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Curr Alzheimer Res*, 11(6), 608–622.

Rizzo, S., Bartolini, M., Ceccarini, L., Piazzzi, L., Gobbi, S., Cavalli, A., Recanatini, M., Andrisano, V., & Rampa, A. (2010). Targeting Alzheimer's disease: Novel indanone hybrids bearing a pharmacophoric fragment of AP2238. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(5), 1749–1760. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.01.071>

Roman, S., Badia, A., Camps, P., & Clos, M. V. (2004). Potentiation effects of ($\pm$)huprine X, a new acetylcholinesterase inhibitor, on nicotinic receptors in rat cortical synaptosomes. *Neuropharmacology*, 46, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2003.08.005>

Roman, S., Badia, A., Camps, P., Muñoz-Torrero, D., & Clos, M. V. (2005). Nicotinic-receptor potentiators, huprine X and galantamine, increase ACh release by blocking AChE activity but not acting on nicotinic receptors. *Brain Research*, 1061, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.07.042>

- Roman, S., Vivas, N. M., Badia, A., & Clos, M. V. (2002). Interaction of a new potent anticholinesterasic compound ($\pm$)huprine X with muscarinic receptors in rat brain. *Neuroscience Letters*, 325, 103–106.
- Ros, E., Aleu, J., Gómez de Aranda, I., Muñoz-Torrero, D., Camps, P., Badia, A., Marsal, A., Marsal, J., & Solsona, C. (2001). The pharmacology of novel acetylcholinesterase inhibitors, (+)-huprines Y and X, on the Torpedo electric organ. *European Journal of Pharmacology*, 421, 77–84. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(01\)01028-7](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(01)01028-7)
- Scott, L. J., & Goa, K. L. (2000). Galantamine: A review of its use in Alzheimer's disease. *Drugs*, 60(5), 1095–1122.
- Shaikh, S., Ahmad, S. S., Ansari, M. A., Shakil, S., Rizvi, S. M. D., Shakil, S., Tabrez, S., Akhtar, S., & Kamal, M. A. (2014). Prediction of Comparative Inhibition Efficiency for a Novel Natural Ligand, Galangin Against Human Brain Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase and 5-Lipoxygenase: A Neuroinformatics Study. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 13, 452–459.
- Shao, D., Zou, C., Luo, C., Tang, X., & Li, Y. (2004). Synthesis and evaluation of tacrine-E2020 hybrids as acetylcholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14, 4639–4642. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.07.005>
- Sharma, K. (2019). Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics (Review). *Molecular Medicine Reports*, 20, 1479–1487. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10374>
- Sharma, P., Tripathi, M. K., & Shrivastava, S. K. (2020). Cholinesterase as a Target for Drug Development in Alzheimer's Disease. In N. E. Labrou (Ed.), *Targeting Enzymes for Pharmaceutical Development: Methods and Protocols* (1st ed., pp. 257–286). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0163-1>
- Shi, J., & Seltzer, B. (2011). Galantamine: an update. *Neurodegenerative Disease Management*, 1(3), 227–234.
- Somani, S. M., Kutty, R. K., & Krishna, G. (1990). Eseroline, a Metabolite of Physostigmine, induces Neuronal Cell Death. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 106, 28–37.
- Son, M., Park, C., Rampogu, S., Zeb, A., & Lee, K. W. (2019). Discovery of Novel Acetylcholinesterase Inhibitors as Potential Candidates for the Treatment of Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1000). <https://doi.org/10.3390/ijms20041000>
- Spilovska, K., Korabecny, J., Nepovimova, E., Dolezal, R., Mezeiova, E., Soukup, O., & Kuca, K. (2017). Multitarget Tacrine Hybrids with Neuroprotective Properties to Confront Alzheimer's Disease. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 17, 1006–1026. <https://doi.org/10.2174/1568026605666160927152728>
- Stasiuk, M., Janiszewska, A., & Kozubek, A. (2014). Phenolic Lipids Affect the Activity and Conformation of Acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus* (Electric eel). *Nutrients*, 6, 1823–1831. <https://doi.org/10.3390/nu6051823>
- Sussman, J. L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L., & Silman, I. (1991). Atomic structure of Acetylcholinesterase from Torpedo californica: A prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, 253, 872–879.
- Szypula, W. J., Wileńska, B., Misiicka, A., & Pietrosiuk, A. (2020). Huperzine A and Huperzine B Production by Prothallus Cultures of *Huperzia selago* (L.) Bernh. ex Schrank et Mart. *Molecules*, 25(3262). <https://doi.org/10.3390/molecules25143262>
- Tabrez, S., & Damanhour, G. A. (2019). Computational and kinetic studies of acetylcholine esterase inhibition by phenserine. *Current Pharmaceutical Design*, 25(18), 2108–2112.
- Tanaka, M., Török, N., & László, V. (2021). Novel Pharmaceutical Approaches in Dementia. In *NeuroPsychopharmacotherapy* (1st ed., pp. 1–18). Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56015-1_444-1
- Tarozzi, A., Bartolini, M., Piazzzi, L., Valgimigli, L., Amorati, R., Bolondi, C., Djemil, A., Mancini, F., Andrisano, V., & Rampa, A. (2014). From the dual function lead AP2238 to AP2469, a multi-target-directed ligand for the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacology Research & Perspectives*, 2(2), e00023. <https://doi.org/10.1002/prp2.23>
- Uliassi, E., de Oliveira, A. S., Nascente, L. de C., Romeiro, L. A. S., & Bolognesi, M. L. (2021). Cashew Nut Shell Liquid (CNSL) as a Source of Drugs for Alzheimer's Disease. *Molecules*, 26(5441). <https://doi.org/10.3390/molecules26185441>
- Upadhyay, S. D., Ahmad, Y., Kohli, S., & Sharma, R. K. (2019). Evaluation of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of Huperzine-A; in silico and in vitro studies. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 56, 224–229.
- Upadhyay, S. D., Ahmad, Y., Sharma, R. K., & Kohli, S. (2020). Huperzine A: Pharmacological and Therapeutic Potential. *Pharmacognosy Communications*, 10(4), 146–149. <https://doi.org/10.5530/pc.2020.4.31>
- Vellom, D. C., Radić, Z., Li, Y., Pickering, N. A., Camp, S., & Taylor, P. (1993). Amino acid residues controlling acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase specificity. *Biochemistry*, 32(1), 12–17.

Wahba, S. M. R., Darwish, A. S., & Kamal, S. M. (2016). Ceria-containing uncoated and coated hydroxyapatite-based galantamine nanocomposites for formidable treatment of Alzheimer's disease in ovariectomized albino-rat model. *Materials Science & Engineering C*, 65, 151–163. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.04.041>

Wang, H.-Y., Lee, D. H. S., D'Andrea, M. R., Peterson, P. A., Shank, R. P., & Reitz, A. B. (2000). β -Amyloid1–42 Binds to $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor with High Affinity. Implications for Alzheimer's Disease Pathology. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(8), 5626–5632. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5626>

Warpman, U., Alafuzoff, I., & Nordberg, A. (1993). Coupling of muscarinic receptors to GTP proteins in postmortem human brain - alterations in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 150, 39–43.

Warpman, U., & Nordberg, A. (1995). Epibatidine and ABT 418 reveal selective losses of $\alpha 4 \beta 2$ nicotinic receptors in Alzheimer brains. *NeuroReport*, 6(17), 2419–2423.

Watkins, P. B., Zimmerman, H. J., Knapp, M. J., Gracon, S. I., & Lewis, K. W. (1994). Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with alzheimer's disease. *Journal of the American Medical Association*, 271(13), 992–998.

Weiner, L., Shnyrov, V. L., Konstantinovskii, L., Roth, E., Ashani, Y., & Silman, I. (2009). Stabilization of Torpedo californica acetylcholinesterase by reversible inhibitors. *Biochemistry*, 48(3), 563–574. <https://doi.org/10.1021/bi801196y>

Weinstock, M. (1995). The Pharmacotherapy of Alzheimer's Disease Based on the Cholinergic Hypothesis: an Update. *Neurodegeneration*, 4, 349–356.

Whitehouse, P. J., Price, D. L., Clark, A. W., Coyle, J. T., & DeLong, M. R. (1981). Alzheimer Disease: Evidence for Selective Loss of Cholinergic Neurons in the Nucleus Basalis. *Annals of Neurology*, 10(2), 122–126.

Woo, F. Y., Basri, M., Masoumi, H. R. F., Ahmad, M. B., & Ismail, M. (2015). Formulation optimization of galantamine hydrobromide loaded gel drug reservoirs in transdermal patch for Alzheimer's disease. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 3879–3886. <https://doi.org/10.2147/IJN.S80253>

Woodruff-Pak, D. S., Lander, C., & Geerts, H. (2002). Nicotinic Cholinergic Modulation: Galantamine as a Prototype. *CNS Drug Reviews*, 8(4), 405–426.

Woodruff-Pak, D. S., Vogel III, R. W., & Wenk, G. L. (2001). Galantamine: Effect on nicotinic receptor binding, acetylcholinesterase inhibition, and learning. *PNAS*, 98(4), 2089–2094.

Xie, Y., Yang, W., Chen, X., & Xiao, J. (2014). Inhibition of flavonoids on acetylcholine esterase: binding and structure-activity relationship. *Food & Function*, 5(10), 2582–2589.

Xu, H., Garcia-Ptacek, S., Jönsson, L., Wimo, A., Nordström, P., & Eriksdotter, M. (2021). Long-term Effects of Cholinesterase Inhibitors on Cognitive Decline and Mortality. *Neurology*, 96(17), e2220–e2230. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000011832>

Yan, X. F., Lu, W. H., Lou, W. J., & Tang, X. C. (1987). Effects of huperzine A and B on skeletal muscle and the electroencephalogram. *Acta Pharmacologica Sinica*, 8(2), 117–123.

Yates, K., Pohl, F., Busch, M., Mozer, A., Watters, L., Shiryaev, A., & Lin, P. K. T. (2018). Determination of Sinapine in Rapeseed Pomace Extract: its antioxidant and acetylcholinesterase inhibition properties. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.045>

Yi, J. H., Whitcomb, D. J., Park, S. J., Martinez-Perez, C., Barbati, S. A., Mitchell, S. J., & Cho, K. (2020). M1 muscarinic acetylcholine receptor dysfunction in moderate Alzheimer's disease pathology. *Brain Communications*, 1–13. <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcaa058>

Yin, Y., Wang, Y., Gao, D., Ye, J., Wang, X., Fang, L., Wu, D., Pi, G., Lu, C., Zhou, X.-W., Yang, Y., & Wang, J.-Z. (2016). Accumulation of human full-length tau induces degradation of nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 4$ via activating calpain-2. *Nature Publishing Group*, 6(27283), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep27283>

Yu, Q.-S., Holloway, H. W., Luo, W., Lahiri, D. K., Brossi, A., & Greig, N. H. (2011). Long-acting anticholinesterases for myasthenia gravis: synthesis and activities of quaternary phenylcarbamates of neostigmine, pyridostigmine and physostigmine. *Bioorg. Med. Chem.*, 18(13), 4687–4693. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.05.022>

Yu, Q., Holloway, H. W., Utsuki, T., Brossi, A., & Greig, N. H. (1999). Synthesis of Novel Phenserine-Based-Selective Inhibitors of Butyrylcholinesterase for Alzheimer's Disease. *Journal of Medical Chemistry*, 42, 1855–1861.

Zhan, Z.-J., Bian, H.-L., Wang, J.-W., & Shan, W.-G. (2010). Synthesis of physostigmine analogues and evaluation of their anticholinesterase activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20(5), 1532–1534. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.01.097>

Zhang, Y., Kua, J., & McCammon, J. A. (2002). Role of the catalytic triad and oxyanion hole in acetylcholinesterase catalysis: An ab initio QM/MM Study. *Journal of the American Chemical Society*, 124(35), 10572–10577. <https://doi.org/10.1021/ja020243m>

Zhao, L., Chu, C. B., Li, J. F., Yang, Y. T., Niu, S. Q., Qin, W., Hao, Y. G., Dong, Q., Guan, R., Hu, W. L., & Wang, Y. (2013). Glycogen Synthase Kinase-3 reduces Acetylcholine level in striatum via disturbing cellular distribution of choline acetyltransferase in cholinergic interneurons in rats. *Neuroscience*, 255, 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.10.001>