

21. Química

Estudio de modelado molecular de inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa.

Retta, Gino

Orientadores: Garro, Adriana; adrianaagarros@gmail.com; Parravicini, Oscar;

oparravicini.s@gmail.com

Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia

Universidad Nacional de San Luis

Resumen

Entre los fármacos disponibles actualmente para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (EA) se encuentran los inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (AChE). La inhibición de esta enzima evita la hidrólisis de acetilcolina en el espacio sináptico y permite compensar el déficit colinérgico observado en los pacientes que sufren la EA. El principal objetivo de este trabajo fue el estudio del sitio activo de AChE y del tipo y fortaleza de las interacciones que tienen lugar en la formación de los distintos complejos de diversos inhibidores de este importante blanco molecular. Para tal fin se emplearon diferentes técnicas de modelado molecular, como son el docking y métodos de simulación de los complejos enzima-inhibidor (E-I) mediante cálculos de dinámica molecular. Los resultados obtenidos a partir del estudio de modelado molecular permitieron comprender el diferente comportamiento de distintos ligandos alcaloides y carbamatos frente a la enzima AChE. Considerando los perfiles de interacción obtenidos es razonable asumir que los ligandos estudiados como parte de este trabajo podrían interactuar en el mismo sitio activo de la enzima. A partir de los resultados expuestos se pudo proponer una explicación preliminar sobre la elevada afinidad de galantamina, sanguinina, rivastigmina y neostigmina por este receptor. Estos resultados son de gran interés por su potencial aplicación en el diseño de nuevos y más específicos inhibidores de AChE.

Palabras clave: ACETILCOLINESTERASA, INHIBIDORES, CARBAMATOS, ALCALOIDES, ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

Introducción

EL PROBLEMA

La incidencia de las enfermedades neurodegenerativas en el mundo, así como los costos socioeconómicos asociados a las mismas, están en constante crecimiento como consecuencia del incremento paulatino de la esperanza de vida y el consecuente envejecimiento poblacional. Según los últimos informes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), alrededor de 50 millones de personas en todo el mundo padecen demencia, registrándose alrededor de 10 millones de nuevos casos cada año. La enfermedad de Alzheimer es la causa más común de trastorno neurológico del sistema nervioso central y una de las principales causas de discapacidad y dependencia entre las personas mayores en todo el mundo. La EA tiene un gran impacto físico, psicológico, social y económico, no sólo en los pacientes, sino también en sus cuidadores, sus familias y la sociedad en general. Para el año 2050 se estima que más de 100 millones de personas sufrirán de EA (Pisani et al., 2016; Prince et al., 2015). Respecto del tratamiento y pronóstico para los pacientes, aún no existe cura para la EA. Los medicamentos aprobados para el tratamiento de esta patología están restringidos a unos pocos inhibidores de acetilcolinesterasa (Shaikh et al., 2014;

Zemek et al., 2014). Es importante remarcar que estas drogas sólo tienen efectos sintomáticos pero no detienen ni retrasan la progresión de la enfermedad. Al ser los únicos agentes terapéuticos disponibles, el estudio teórico del comportamiento de estos inhibidores a nivel molecular es de suma importancia para comprender su mecanismo de acción. Asimismo, resulta de gran utilidad conocer las diversas contribuciones energéticas que dictan la formación de los complejos inhibidor-receptor de dichas drogas e identificar los residuos del sitio activo de AChE involucrados en la formación de los diferentes complejos. Esta información puede ser empleada como punto de partida para el diseño de compuestos líderes alternativos y así obtener nuevos inhibidores de acetilcolinesterasa más potentes y específicos.

ANTECEDENTES

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo, progresivo e irreversible. Representa la principal causa de demencia y deterioro mental de adultos mayores. A medida que la EA progresa, el paciente pierde sus funciones cognitivas superiores como la capacidad de recordar, de comunicarse, de pensar claramente y de realizar actividades cotidianas. Asimismo, puede ocasionar cambios en el comportamiento, el estado de ánimo y la

personalidad. En estadios avanzados, los pacientes son incapaces de valerse por sí mismos y requieren cuidado permanente. Finalmente, la muerte sobreviene entre 5 a 10 años luego de realizado el diagnóstico clínico (Reitz, Brayne, & Mayeux, 2011).

De acuerdo con las proyecciones demográficas, en los años subsiguientes la esperanza de vida será cada vez mayor y, en consecuencia, la población de adultos mayores irá incrementando. Según el Informe Mundial de la Alzheimer's Disease International (ADI), en la actualidad más de 35 millones de personas en el mundo sufren demencia. Cabe destacar que 1 de cada 20 individuos de más de 65 años y 1 de cada 2 de más de 80 años, padecen EA. De acuerdo con publicaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) esta tendencia aumentará exponencialmente. Se espera que en 20 años el número de pacientes con demencia se duplique y que para el año 2050, la cifra aumente hasta alcanzar los 115 millones de personas afectadas. Estos datos dan cuenta de que el envejecimiento poblacional representa uno de los retos más importantes para la sociedad actual, tanto a nivel sanitario como económico, ya que conducirá a cargas financieras extremadamente difíciles de afrontar para los sistemas de salud (Batsch & Mittleman, 2012; Prince et al., 2015; Prince, Prina, & Guerchet, 2013; Wimo et al., 2013).

Durante las últimas décadas, se realizaron grandes esfuerzos en el campo de la EA, abocados al descubrimiento de nuevas herramientas diagnósticas y terapéuticas. Desafortunadamente, este camino estuvo asociado a una elevada tasa de fracaso (Cummings, Morstorf, & Zhong, 2014), debido principalmente a la etiopatogenia multifactorial de la EA. Entre dichos mecanismos patogénicos, podemos mencionar la pérdida progresiva de neuronas colinérgicas (Bartus, 2000), la acumulación anormal de placas extracelulares de péptido β -amiloide (Hardy & Higgins, 1992), la formación de ovillos intracelulares de acúmulos de la proteína tau hiperfosforilada (Grundke-Iqbal et al., 1986) y otros como la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y la neuroinflamación.

La hipótesis del déficit colinérgico fue la primera teoría elaborada con el objeto de comprender la progresión de la EA. El sistema colinérgico cumple un rol fundamental en la modulación de la transmisión de impulsos neuronales y regula numerosas funciones cognitivas. La acetilcolina (ACh) es un importante neurotransmisor que participa en las sinapsis colinérgicas por lo que está involucrado en numerosos aspectos de la cognición. Las colinesterasas son una familia de enzimas que catalizan la hidrólisis de ACh a colina y acetato. Esta

reacción es esencial para finalizar la comunicación entre células colinérgicas, permitiendo que la neurona regrese a un estado de reposo luego de la transmisión de un impulso nervioso.

La acetilcolinesterasa (AChE) es una serinohidrolasa que actúa tanto a nivel del SNC como del SNP y es responsable de la rápida hidrólisis de la acetilcolina en las sinapsis. Estructuralmente está formada por un sitio aniónico catalítico (SAC) donde se sitúa la tríada catalítica Ser200, Glu327 e His440 (**Figura 1**).

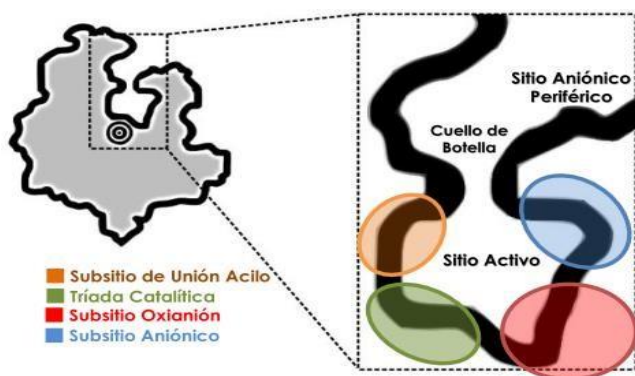


Figura 1. Esquema del sitio activo de la enzima

Esta cavidad se localiza en el fondo de un túnel estrecho, revestido principalmente de residuos aromáticos, de aproximadamente 20 Å de profundidad y que recibe el nombre de "cuello de botella". En la boca de dicha cavidad, sobre la superficie de la enzima, se encuentra el sitio aniónico periférico (SAP) el cual interviene en el reconocimiento de las porciones catiónicas de los inhibidores enzimáticos (Alpan et al.,

2013; Fang, Pan, Muzyka, & Zhan, 2011; Sirin & Zhang, 2014).

La hipótesis del déficit colinérgico justifica que los inhibidores de la AChE (AChEI) hayan sido el primer grupo de drogas comercializado como parte del tratamiento de la EA. La interferencia con la actividad de esta enzima representa una estrategia terapéutica prometedora para influir en el transcurso de los procedimientos neuropatológicos de la enfermedad. Por su mecanismo de acción, permiten elevar la concentración y duración de la acción de la ACh al impedir la hidrólisis de este neurotransmisor (Bartus, 2000; Shaikh et al., 2014).

En la actualidad, los únicos medicamentos disponibles para combatir la patología contienen donepezilo, rivastigmina, galantamina y memantina (un antagonista del receptor N-metil-D-aspartato) como principios activos. Las drogas anticolinérgicas se han posicionado como agentes útiles en las primeras etapas de la EA, aunque carecen de efectividad cuando la enfermedad progresa hacia estadios más avanzados.

En el presente trabajo se realizó un estudio exhaustivo de las propiedades dinámicas de los complejos moleculares formados entre la enzima AChE con inhibidores de actividad probada y reportada (**Figura 2**).

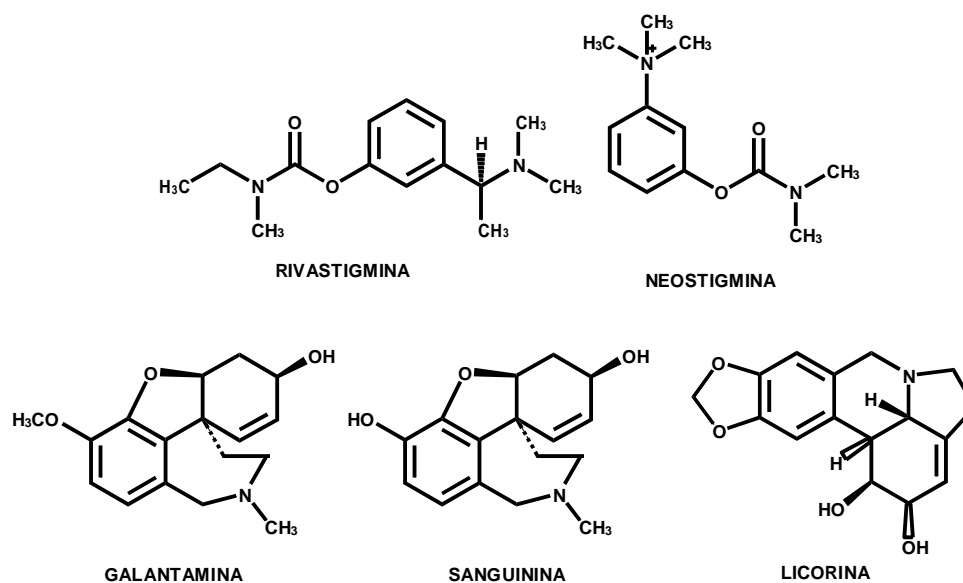


Figura 2. Estructura de los inhibidores de acetilcolinesterasa estudiados.

Por un lado, se consideraron alcaloides derivados de distintas especies pertenecientes a la familia *Amaryllidaceae* como galantamina, sanguinina y licorina. Además se estudiaron compuestos de estructura carbamato, entre ellos rivastigmina y neostigmina. El propósito de este estudio fue conocer en profundidad la estructura tridimensional de AChE, el modo de unión y la fortaleza de las interacciones que se establecen con los diferentes inhibidores.

Objetivos

OBJETIVO GENERAL. El objetivo general de este trabajo fue el estudio del sitio activo de AChE y del tipo y fortaleza de las interacciones que tienen lugar en la formación de los distintos complejos de

diversos inhibidores de este importante blanco molecular. Para tal fin se emplearon técnicas de modelado molecular, como son el docking y métodos de simulación de los complejos enzima-inhibidor (E-I) mediante cálculos de dinámica molecular.

Estos resultados serán de gran interés por su potencial aplicación en el diseño de nuevos y más específicos inhibidores de AChE.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar una búsqueda extensiva y detallada de las estructuras tridimensionales de la enzima acetilcolinesterasa complejada con ligandos de diferente naturaleza. La misma se hará utilizando la base de datos online Protein Data Bank.

- Realizar estudios de Docking en el caso de aquellos compuestos para los cuales no se dispone de información cristalográfica.
- Obtener la descripción de los sistemas bajo estudio en función del tiempo mediante simulaciones de Dinámica Molecular. Una vez obtenida la trayectoria determinar la Energía libre de los complejos.
- Determinar mediante la técnica de descomposición por residuos cuales son los aminoácidos más importantes para la energía de unión de cada complejo analizado.

Materiales y Métodos

Estructura del receptor y compuestos seleccionados para este plan de tesis.

En el presente estudio se realizó un estudio teórico sobre inhibidores de acetilcolinesterasa (AChE), empleando diferentes técnicas de modelado molecular y simulaciones de dinámica molecular. Para tal fin, la estructura del receptor de acetilcolina se obtuvo a partir de aquellas disponibles en Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>). Particularmente, se empleó la estructura correspondiente al código 1DX6 (TcAChE) (Greenblatt, Kryger, Lewis, Silman, & Sussman, 1999). Por otra parte, como ligandos, se seleccionaron una serie de compuestos cuyas estructuras generales se observan en la **Figura 2**.

Se estudiaron las interacciones moleculares que ocurren en los complejos E-I de inhibidores de AChE conocidos: a)- compuestos alcaloides como galantamina, sanguinina y licorina; y b)- derivados de tipo carbamato como rivastigmina y neostigmina.

Para los estudios de modelado molecular se emplearon diversas técnicas combinadas. De este modo el estudio comprendió tres etapas: a) docking molecular; b) refinamiento de los estudios de docking mediante simulaciones de Dinámica Molecular; y c) análisis por residuo mediante el cálculo de la energía libre.

Métodos de cálculo

Docking molecular

Para poder encontrar las conformaciones más relevantes para las interacciones E-I se realizó un estudio de docking. Este análisis permitió establecer, al menos en forma preliminar, la configuración espacial del complejo y la correspondiente energía de unión.

El estudio de docking flexible se llevó a cabo utilizando el programa Autodock 4.0 (Morris et al., 2009). Las modificaciones y visualizaciones gráficas se realizaron empleando AutoDock Tools 1.5.4 y UCSF Chimera Molecular Modeling System (<http://www.rbvi.ucsf.edu/chimera>) (Pettersen et al., 2004).

Las conformaciones resultantes fueron agrupadas en diferentes familias en función de la rmsd del backbone. Las conformaciones de menor energía fueron consideradas como las de orientación más favorable y empleadas en los cálculos subsiguientes.

Simulaciones empleando cálculos de Dinámica Molecular

Este análisis permitió establecer de manera teórica cuáles compuestos presentan mayor interacción con el sitio activo de AChE y qué grupos funcionales están implicados en las mismas. El programa Antechamber, presente en el paquete AmberTools, fue empleado para generar los parámetros de los ligandos necesarios para realizar las simulaciones de dinámica molecular (DM). Para todas las simulaciones de DM se empleó el paquete de programas AMBER (D.A. Case et al., 2014). Las simulaciones se realizaron por triplicado a 300 K y el tiempo de simulación se extendió a un total de 10 ns. Los análisis posteriores se desarrollaron con el programa PTRAJ (David A Case et al., 2005).

Cálculo de la Energía Libre (ΔG)

Las diversas contribuciones energéticas que dictan la formación de los complejos E-I fueron analizadas y evaluadas utilizando la aproximación MM-PBSA. Este

constituye un método de post-procesamiento para evaluar la energía libre absoluta o de unión para moléculas o complejos en solución. Los conjuntos de estructuras a analizar se obtuvieron de las trayectorias de DM.

A fin de identificar los residuos del sitio activo de AChE involucrados en las interacciones intermoleculares de los diferentes complejos, se realizó un análisis de descomposición de la energía libre por residuo. Éste cálculo permitió analizar la energía de interacción de cada residuo en forma individual, considerando la mecánica molecular y la energía de solvatación (Hou, Li, Li, & Wang, 2012). Cada par inhibidor-residuo incluye cuatro términos de energía: la contribución de van der Waals (E_{vdW}), la contribución electrostática (E_{ele}), la desolvatación polar (GPB) y la desolvatación no polar (GSA). Todos ellos quedan resumidos en la siguiente expresión:

$$\Delta G_{\text{inhibidor-residuo}} = \Delta E_{vdW} + \Delta E_{ele} + \Delta G_{PB} + \Delta G_{SA}$$

Resultados y Discusión

Se realizó un estudio de modelado molecular para diferentes inhibidores conocidos de acetilcolinesterasa. En la primera etapa se llevó a cabo un análisis de docking empleando el programa Autodock. El mismo sugirió que los diferentes compuestos se unirían a la

misma región de la enzima en el sitio activo catalítico de AChE.

En la segunda etapa, se realizaron simulaciones de dinámica molecular a fin de estimar las energías de unión de los diferentes complejos (MM-PBSA). Las mismas indicaron que estas moléculas están organizadas espacialmente de diferentes maneras interactuando con distintos aminoácidos. En la **Figura 3**, se puede observar la vista espacial de las

interacciones entre AChE con los ligandos considerados. A partir de estos cálculos se estimó que las energías de unión para los compuestos de tipo carbamato serían de -36.37 Kcal/mol para rivastigmina y de -28.02 Kcal/mol para neostigmina. Por otra parte, los valores obtenidos para los derivados de tipo alcaloides fueron de -39.32 Kcal/mol para galantamina; -44.30 Kcal/mol para sanguinina; y -29.67 Kcal/mol para licorina.

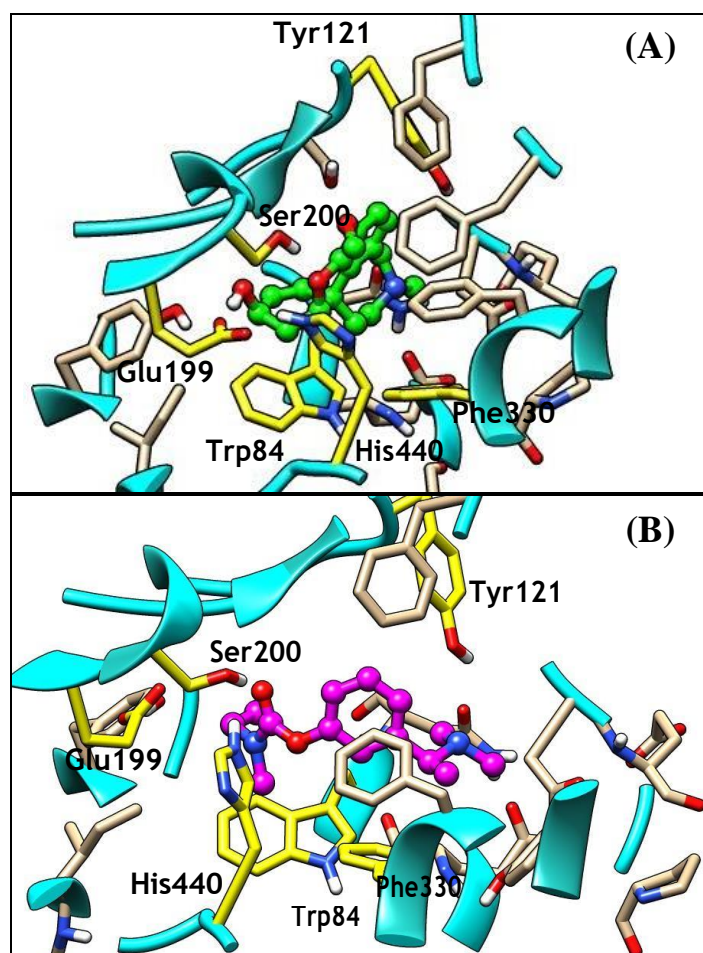


Figura 3. Vista espacial del sitio activo de AChE (celeste) en complejo con (A) galantamina (verde) y (B) rivastigmina (violeta). En amarillo se muestran los átomos de los residuos de aminoácidos que originan las principales interacciones.

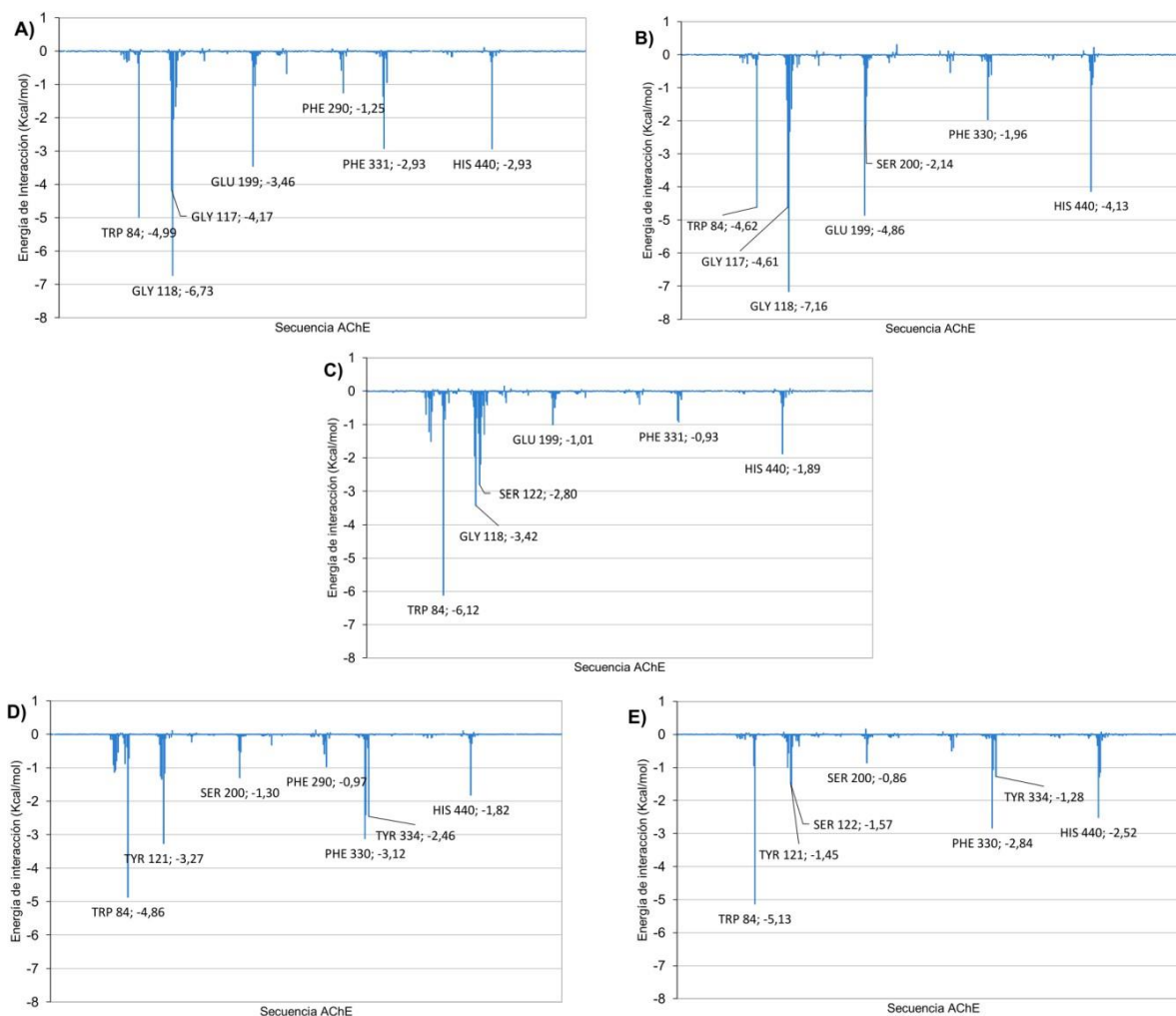


Figura 4. Histogramas de energía de interacción por residuos para complejos de AChE A) Galantamina; B) Sanguinina; C) Licorina; D) Rivastigmina; E) Neostigmina.

Finalmente, de las trayectorias obtenidas de las simulaciones de dinámica molecular, se realizó un análisis por residuo de la energía de los diferentes complejos E-I obtenidos. Este tipo de cálculo permitió determinar los aminoácidos que estarían

involucrados en la formación de cada uno de los complejos enzima-inhibidor. Los histogramas resultantes para cada ligando se observan en la **Figura 4**. Nuestras simulaciones de dinámica molecular mostraron que las drogas comerciales

presentarían interacciones similares entre sí, ejerciendo su acción sobre la tríada catalítica ubicada en el sitio aniónico catalítico de la enzima. Las principales interacciones que estabilizan los diferentes complejos son: Trp84, Tyr121, Glu199, Ser200, Phe330, Tyr334 e His440. En las **Figuras 3 y 4** se puede observar que los ligandos pertenecientes a esta serie de compuestos se ubicarían en el mismo sitio activo e interactuarían con los residuos del subsitio aniónico de AChE (Trp84 y Glu199), del cuello de botella (Tyr121 y Phe330) y con la tríada catalítica (Ser200, Glu327 y His440).

En el caso de los derivados alcaloides, galantamina y sanguinina que poseen mayor actividad inhibitoria de AChE (Ortiz et al., 2018) presentan interacciones similares principalmente con Trp84, Gly117, Gly118 Glu199. Por el contrario, licorina con menor actividad anticolinesterásica presenta un perfil de interacción marcadamente diferente, siendo las principales Tyr70, Val71, Asp72, Trp84, Tyr121 y Ser122. Cabe destacar que las interacciones obtenidas para sanguinina son mayores a las observadas en el complejo AChE-galantamina. La única diferencia estructural entre ambos alcaloides es la presencia de un grupo -OH en sanguina en lugar del grupo -OCH₃ de galantamina. La presencia de este oxhidrilo extra produce una fuerte interacción con

Ser200, la cual no ocurre para galantamina. La presencia de este grupo funcional explicaría, al menos parcialmente, la mayor actividad de sanguinina respecto de otros alcaloides.

En cuanto a los derivados de tipo carbamato, ambos ligandos exhibieron patrones de interacción similares. Las principales interacciones ocurren a nivel de Trp84, Tyr121, Ser200, Phe330, Phe331, Tyr334 e His440. Es notoria la aparición de una fuerte interacción con el residuo de Ser200. Estos resultados concuerdan con el mecanismo de acción propuesto para este tipo de inhibidores y con la evidencia cristalográfica (Bar-On et al., 2002). Según esta última la inhibición pseudo-irreversible de este tipo de ligandos se debe a la carbamitación de la enzima con formación de un enlace covalente entre el C del grupo carbamato y el O del grupo hidroxilo del residuo Ser200 (**Figura 5**). A partir de estos resultados se puede comprobar que la interacción de rivastigmina y neostigmina con Ser200 juega un papel fundamental en el mecanismo de inhibición de AChE.

Conclusiones

Los resultados obtenidos a partir del estudio de modelado molecular permitieron comprender el diferente comportamiento de distintos ligandos alcaloides y carbamatos frente a la enzima AChE. Considerando los perfiles de interacción

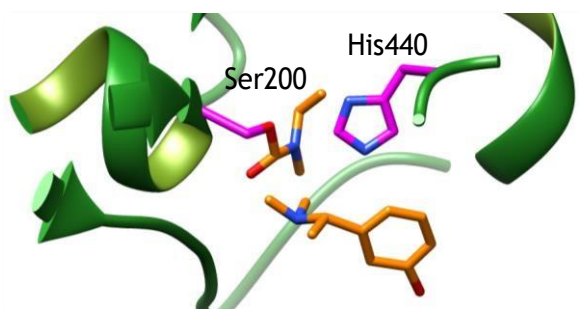


Figura 5. Sitio activo de la enzima TcAChE luego de la inhibición con rivastigmina. Se muestran en color magenta los residuos Ser200 e His440; en color naranja el intermediario carbamoilo y el grupo aromático saliente provenientes de la hidrólisis del inhibidor.

similares obtenidos es razonable asumir que los ligandos estudiados como parte de este trabajo podrían interactuar en el mismo sitio activo de la enzima. A partir de los resultados expuestos se pudo proponer una explicación preliminar sobre la elevada afinidad de galantamina, sanguinina, rivastigmina y neostigmina por este receptor. Esta información puede resultar de gran utilidad en la búsqueda y el diseño de nuevos inhibidores de AChE.

Bibliografía

Alpan, A. S., Parlar, S., Carlino, L., Tarikogullari, A. H., Alptüzün, V., & Güneş, H. S. (2013). Synthesis, biological activity and molecular modeling studies on 1H-benzimidazole derivatives as acetylcholinesterase inhibitors.

Bioorganic & Medicinal Chemistry, 21(17), 4928–4937.

<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.06.065>

Bar-On, P., Millard, C. B., Harel, M., Dvir, H., Enz, A., Sussman, J. L., & Silman, I. (2002). Kinetic and structural studies on the interaction of cholinesterases with the anti-Alzheimer drug rivastigmine.

Biochemistry, 41(11), 3555–3564.

Bartus, R. T. (2000). On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Experimental Neurology*, 163(2), 495–529.

<https://doi.org/10.1006/exnr.2000.7397>

Batsch, N. L., & Mittleman, M. S. (2012). *World Alzheimer Report 2012. Overcoming the stigma of dementia*.

London. Retrieved from

https://www.alz.org/documents_custom/world_report_2012_final.pdf

Case, D. A., Babin, V., Berryman, J. T., Betz, R. M., Cai, Q., Cerutti, D. S., ... Kollman, P. A. (2014). *AMBER 14*. San Francisco: University of California.

Case, D. A., Cheatham, T. E. 3rd, Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz, K. M. J., ... Woods, R. J. (2005). The

- Amber biomolecular simulation programs. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16), 1668–1688.
<https://doi.org/10.1002/jcc.20290>
- Cummings, J. L., Morstorf, T., & Zhong, K. (2014). Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. *Alzheimer's Research & Therapy*, 6(4), 37.
<https://doi.org/10.1186/alzrt269>
- Fang, L., Pan, Y., Muzyka, J. L., & Zhan, C.-G. (2011). Active Site Gating and Substrate Specificity of Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase: Insights from Molecular Dynamics Simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115(27), 8797–8805.
<https://doi.org/10.1021/jp112030p>
- Greenblatt, H. M., Kryger, G., Lewis, T., Silman, I., & Sussman, J. L. (1999). Structure of acetylcholinesterase complexed with (-)-galanthamine at 2.3 Å resolution. *FEBS Letters*, 463(3), 321–326.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01637-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01637-3)
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M., & Binder, L. I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(13), 4913–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3088567>
- Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science (New York, N. Y.)*, 256(5054), 184–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1566067>
- Hou, T., Li, N., Li, Y., & Wang, W. (2012). Characterization of domain-peptide interaction interface: prediction of SH3 domain-mediated protein-protein interaction network in yeast by generic structure-based models. *Journal of Proteome Research*, 11(5), 2982–2995.
<https://doi.org/10.1021/pr3000688>
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791.
<https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Ortiz, J. E., Garro, A., Pigni, N. B., Agüero, M. B., Roitman, G., Slanis, A., ... Tapia, A. (2018). Cholinesterase-

- inhibitory effect and in silico analysis of alkaloids from bulbs of *Hieronymiella* species. *Phytomedicine*, 39, 66–74.
<https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2017.12.020>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–12.
- Pisani, L., Farina, R., Catto, M., Iacobazzi, R. M., Nicolotti, O., Cellamare, S., ... Carotti, A. (2016). Exploring Basic Tail Modifications of Coumarin-Based Dual Acetylcholinesterase-Monoamine Oxidase B Inhibitors: Identification of Water-Soluble, Brain-Permeant Neuroprotective Multitarget Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(14), 6791–6806.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00562>
- Prince, M., Prina, M., & Guerchet, M. (2013). *World Alzheimer Report 2013. Journey of Caring. An analysis of long-term care for dementia*. London. Retrieved from <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2013.pdf>
- Prince, M., Wimo, A., Guerchet, M., Ali, G.-C., Wu, Y.-T., & Prina, M. (2015). *World Alzheimer Report 2015. The Global Impact of Dementia. An analysis of prevalence, incidence, cost and trends*. London. Retrieved from <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2015.pdf>
- Reitz, C., Brayne, C., & Mayeux, R. (2011). Epidemiology of Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, 7(3), 137–152.
<https://doi.org/10.1038/nrneurol.2011.2>
- Shaikh, S., Verma, A., Siddiqui, S., Ahmad, S. S., Rizvi, S. M. D., Shakil, S., ... Kamal, M. A. (2014). Current acetylcholinesterase-inhibitors: a neuroinformatics perspective. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 13(3), 391–401.
- Sirin, G. S., & Zhang, Y. (2014). How Is Acetylcholinesterase Phosphorylated by Soman? An *Ab Initio* QM/MM Molecular Dynamics Study. *The Journal of Physical Chemistry A*, 118(39), 9132–9139.
<https://doi.org/10.1021/jp502712d>
- Wimo, A., Jönsson, L., Bond, J., Prince, M., Winblad, B., & Alzheimer Disease International. (2013). The worldwide economic impact of dementia 2010. *Alzheimer's & Dementia*, 9(1), 1–11.e3.
<https://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.11.>

006

Zemek, F., Drtinova, L., Nepovimova, E.,
Sepsova, V., Korabecny, J., Klimes,
J., & Kuca, K. (2014). Outcomes of
Alzheimer's disease therapy with
acetylcholinesterase inhibitors and
memantine. *Expert Opinion on Drug
Safety*, 13(6), 759–774.

<https://doi.org/10.1517/14740338.2014.914168>

Financiamiento Este trabajo se realizó en el marco del PROICO 02-1418 de la UNSL. Los autores agradecen a CONICET y la UNSL por el apoyo técnico y financiero.