

Henrique Miguel Marques Bentes

DESENHO DE FÁRMACOS ASSISTIDO POR COMPUTADOR: APLICAÇÃO À PERMEAÇÃO ATRAVÉS DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Luís Miguel Santos Loura e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Henrique Miguel Marques Bentes

Desenho de Fármacos Assistido por Computador — Aplicação à Permeação
Através da Barreira Hematoencefálica

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências
Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Luís Miguel Santos Loura e apresentada à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Henrique Miguel Marques Bentes, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2011148578, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão de outrem, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, setembro de 2016

(Henrique Miguel Marques Bentes)

O Tutor

(Professor Doutor Luís Miguel Santos Loura)

O Aluno

(Henrique Miguel Marques Bentes)

“It is easier to judge the mind of a man by his questions rather than his answers.”

Pierre-Marc-Gaston, duc de Lévis

Os meus sinceros agradecimentos:

Ao Professor Doutor Luís Miguel Santos Loura pela valiosa orientação e por se preocupar em moldar o tema aos meus gostos e interesses;

À Universidade de Coimbra, especialmente à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e seus docentes, pela formação académica e oportunidades que me proporcionaram, assim como os grandes Amigos que levo comigo p'ra vida;

À Phartuna, Tuna de Farmácia de Coimbra, pelo excelente espírito que sempre cultivaram, pela garra de quem sabe almejar o topo e, não menos importante, pela camaradagem que nunca será esquecida;

Ao Grupo de Fados “Mensagem”, especialmente ao Rui Martins, Diogo Fonseca, Diogo Jesus e Rafael Pereira, por preservar a Canção de Coimbra em todo o seu esplendor, sem nunca arredar pé das adversidades;

À minha Família, em especial aos meus Pais e Avós pelo apoio incondicional e voto de confiança; espero um dia ser capaz de retribuir tudo aquilo que me ofereceram.

Índice

Resumo	9
Abstract	9
1. Introdução	10
2. Parâmetros físico-químicos.....	12
2.1. Lipofilia	12
2.2. Solubilidade	12
2.3. Constante de ionização.....	13
2.4. Regras baseadas em parâmetros físico-químicos.....	13
3. Barreira hematoencefálica	15
4. Predição computacional da permeabilidade através da BBB.....	18
4.1. Porquê utilizar métodos computacionais?	18
4.2. QSAR/QSPR	19
4.3. Modelos de QSAR baseados em $\log BB$	20
4.4. Informações a retirar de modelos $\log BB$ QSAR.....	20
4.4.1. Pontes de hidrogénio.....	21
4.4.2. Lipofilia.....	21
4.4.3. Tamanho de partícula	21
4.4.4. Carga molecular	22
4.4.5. Forma molecular e flexibilidade	22
5. Conclusão.....	23
6. Bibliografia	25

Lista de abreviaturas

CADD – Desenho de fármacos assistido por computador (*Computer aided drug design*)

SAR – Relação estrutura-atividade (*Structure-activity relationship*)

QSAR – Relação quantitativa estrutura-atividade (*Quantitative structure-activity relationship*)

ADME/T – Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção (ADME) e toxicidade (T)

HTS – Rastreamento de alto rendimento (*High-Throughput Screening*)

Ro5 – Regra dos cinco de Lipinsky (*Lipinski's Rule of five*)

QED – Estimativa quantitativa de propensabilidade para ser um fármaco (*Quantitative estimate of drug-likeness*)

RDL – Probabilidade relativa de ser um fármaco (*Relative drug likelihood*)

MW – massa molecular

HBA – aceitador de ligações de hidrogénio

HBD – dadores de ligações de hidrogénio

ROTBs – ligações rotacionais

PSA – área de superfície polar

SNC – Sistema nervoso central

BBB – Barreira hematoencefálica (*Blood-brain barrier*)

BCSFB – Barreira sangue-líquido cefalorraquidiano (*Blood cerebrospinal fluid barrier*)

BCEC – células endoteliais capilares cerebrais (*brain capillary endothelial cells*)

BM – Membrana basal (*Basement membrane*)

TJ – Junção oclusiva (*Tight junction*)

AJ – Junção aderente *Adherent junction*

JAM – Moléculas de adesão juncional (*Junctional adhesion molecules*)

PAMPA – *Parallel artificial membrane permeability assay*

MLR – Regressão Linear Múltipla (*Multiple Linear Regression*)

PLS – Mínimos Quadrados Parciais (*Partial Least Square*)

SVM – Máquina de Vetores de Suporte (*Support Vector Machine*)

QSPR – Relação quantitativa estrutura-propriedade (*Quantitative structure-property relationship*)

MIF – campos de interação molecular (*Molecular interaction field*)

Resumo

A barreira hematoencefálica (BBB), devido às suas características únicas, limita a distribuição de fármacos para o cérebro. Para ultrapassar este problema, os investigadores têm vindo a desenvolver uma variedade de abordagens. Desta forma, os métodos *in silico* tentam prever a permeabilidade através da BBB com base numa gama de descritores físico-químicos resultantes das estruturas dos compostos correspondentes. Esta monografia irá fornecer uma visão geral sobre desenho de fármacos assistido por computador, alguns parâmetros-chave utilizados para determinar as propriedades ADME/T, seguido das aplicações sobre a BBB e os métodos utilizados para prever a permeação cerebral.

Palavras-chave: desenho de fármacos assistido por computador, barreira hematoencefálica, modelos *in silico*

Abstract

The blood brain barrier, due to its unique features, limits the delivery of therapeutic drugs into the brain. To overcome this problem, researchers have been developing a variety of approaches. In this way, *in silico* techniques try to predict the brain permeability based on a range of physicochemical descriptors resulting from structures of the corresponding compounds. This monograph will provide an overview of computer aided drug design, some key parameters used to determine the ADME/T properties, followed by the applications on the blood brain barrier and the methods used to predict brain permeation.

Keywords: computer aided drug design, blood-brain barrier, *in silico* models

I. Introdução

A identificação de moléculas que possam satisfazer os critérios necessários para se considerar um fármaco a partir do vasto leque de possibilidades tem sido amiúde comparada a procurar uma agulha num palheiro ^[1]. Nas últimas décadas, o surgimento de técnicas assistidas por computador ampliou o potencial de investigação e estimulou um novo impulso no desenho racional de fármacos ^[2,3]. As abordagens ao desenho de fármacos assistido por computador (CADD) são geralmente classificadas como baseada no alvo (*target-based*) ou baseada no ligando (*ligand-based*) ^[4].

As abordagens baseadas no alvo são usadas quando estão disponíveis dados experimentais sobre o alvo biológico e a sua estrutura ^[5]. Estas abordagens incluem análise estrutural, bioinformática, estudos de *docking*, e simulações de dinâmica molecular ^[6].

Por outro lado, as abordagens baseadas no ligando ^[7] analisam as propriedades físico-químicas de moléculas bioativas caracterizadas pelo mesmo mecanismo de ação, e podem também ser utilizadas quando a estrutura do alvo é desconhecida. Este tipo de abordagens leva frequentemente ao desenvolvimento de um farmacóforo modelo definindo as características estruturais responsáveis pela atividade biológica observada. Alternativamente, pode ser derivada uma relação quantitativa estrutura-atividade (QSAR), que correlaciona descritores representativos da estrutura molecular e/ou propriedades da molécula com a sua atividade biológica determinada experimentalmente (incluindo o efeito terapêutico desejável e os efeitos secundários não desejáveis) ^[8].

De qualquer forma, tanto a investigação do alvo biológico como o desenvolvimento de um farmacóforo modelo são ambas voltadas para a racionalização de relações estrutura-atividade (SARs) e o desenho de novos compostos.

Embora os avanços impressionantes em recursos computacionais ^[9] tenham contribuído para o desenvolvimento de estratégias de CADD, estas inevitavelmente apresentam algumas limitações, dependendo das técnicas aplicadas. Para abordar este problema, tem-se notado uma tendência para combinar e integrar as ferramentas computacionais disponíveis ^[10]. Isto inclui a combinação de diferentes abordagens CADD, o uso de métodos empíricos, semi-empíricos e *ab initio* para os cálculos dos parâmetros moleculares, e, por último, mas não menos importante, a integração de dados teóricos e experimentais numa estratégia de pesquisa única.

Assim, vários casos são relatados ^[11-14], onde uma combinação de técnicas experimentais juntamente com CADD foi aplicada com sucesso em meios académicos e industriais. Ao mesmo tempo, as ferramentas computacionais estão a evoluir no sentido de combinar mecânica molecular (MM), dinâmica molecular (DM) e métodos de mecânica quântica (QM), a fim de conseguir uma melhor simulação global do comportamento molecular real ^[15,16].

Idealmente, o método computacional será capaz de prever a afinidade antes de um composto ser sintetizado e, portanto, em teoria, apenas haveria a necessidade de sintetizar um composto, poupando muito tempo e despesas. No entanto, como já foi referido, a realidade é que os métodos *in silico*¹ são imperfeitos e fornecem, na melhor das hipóteses, apenas estimativas qualitativamente precisas de afinidade. Na prática, são necessárias várias iterações de *design*, síntese e estudos *in vivo* e/ou *in vitro* antes de um fármaco ideal ser descoberto. Métodos computacionais aceleraram a descoberta por reduzir o número de iterações necessárias e já proporcionaram estruturas inovadoras ^[17,18].

¹ A designação *in silico* é usada para denotar simulações computacionais que modelam um processo natural ou de laboratório e não para cálculos computacionais genéricos.

2. Parâmetros físico-químicos

Os parâmetros físico-químicos de um composto, relevantes para a sua eventual ação como fármacos, incluem lipofilia, solubilidade, ionização, estrutura molecular tridimensional e massa molecular ^[19]. Por conseguinte, estas propriedades podem afetar o perfil ADME/T (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) de compostos, a sua potência, seletividade e “screenability” em *High-Throughput Screening* (HTS) ^[20]. Em comparação com muitos outros parâmetros ADME/T, os parâmetros físico-químicos são facilmente acessíveis e envolvem mecanismos de menor complexidade, formando a base para o desenvolvimento fiável e robusto de métodos *in silico* ^[21]. Por relevância ao tema, apenas irei abordar alguns parâmetros mais utilizados: a lipofilia, solubilidade e constante de ionização, assim como algumas regras que estão intimamente relacionados com estas propriedades.

2.1. Lipofilia

A lipofilia é um parâmetro importante para a descoberta de fármacos, pois contribui para a solubilidade, permeabilidade, potência, seletividade e promiscuidade de um composto ^[22,23]. A lipofilia de moléculas orgânicas é geralmente quantificada como $\log P_{oct/água}$, sendo P é a razão entre as concentrações de um composto numa mistura de fases – octanol e água – em equilíbrio. A previsão de $\log P$ é um pré-requisito para a indústria farmacêutica otimizar as propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas de *hits* e *leads* ^[21]. Como referem Qiu et al. (2009), a escolha do octanol deve-se a este ser flexível e conter uma parte polar e outra apolar, servindo como um modelo simplificado para as membranas celulares

2.2. Solubilidade

A solubilidade aquosa é um dos fatores mais importantes que afetam a biodisponibilidade do fármaco. Para ser absorvido, um fármaco deve primeiramente ser solúvel em água e depois ter a oportunidade de permear através de membranas biológicas. Existem várias propriedades moleculares que favorecem a solubilidade de um composto e, que são,

em grande parte, utilizadas na avaliação da solubilidade por serem facilmente identificáveis, como são exemplos a carga e a polaridade ^[24].

2.3. Constante de ionização

A constante de ionização, avaliada pelo pK_a , é um parâmetro termodinâmico útil para modular várias propriedades moleculares relevantes ^[24,25]. Especificamente, a distribuição e difusão de fármacos dependem fortemente do seu estado de ionização a pH fisiológico porque os compostos neutros são mais lipófilos, enquanto que os ionizados são polares e solúveis em água. Além disso, o $\log D$, que é uma extensão de $\log P$, considerando todas as formas do composto (ionizada e não ionizada), foi introduzido para considerar as influências da ionização sobre o coeficiente de partição octanol-água ^[21].

2.4. Regras baseadas em parâmetros físico-químicos

Uma das primeiras aplicações de propriedades físico-químicas na descoberta e desenvolvimento de medicamentos é a avaliação da *drug-likeness*². Por exemplo, a conhecida “regra dos cinco” (Ro5), que foi proposta por Lipinski *et al.* (1997), baseia-se na observação de propriedades físico-químicas dos medicamentos mais administrados por via oral. A Ro5 tem sido utilizada para selecionar compostos que são suscetíveis de ser biodisponíveis por via oral baseada em cinco regras simples relacionadas com as propriedades moleculares. Como acontece com a *drug-likeness*, existem regras para *lead-likeness*³. Por exemplo, uma regra para a *lead-likeness* desenvolvida pela AstraZeneca pode ser utilizada para avaliar o potencial de um composto que mereça uma maior otimização estrutural ^[27]. Estas regras são amplamente utilizadas como filtros para dar prioridade a compostos que sejam mais propensos a serem candidatos a fármacos. No entanto, não é feita nenhuma discriminação para além de uma passagem ou chumbo qualitativo para estes filtros, pois todos os compostos que cumpram (ou violem) as regras são considerados iguais. Recentemente, Bickerton *et al.* (2012) relataram uma medida quantitativa da *drug-likeness* com base num conceito de conveniência chamado de estimativa quantitativa de *drug-likeness* (QED). A QED classifica os compostos de acordo com

² propensabilidade de gerar um fármaco
³ propensabilidade de gerar um *lead*

a sua similaridade a medicamentos comercializados através de uma medida contínua de *drug-likeness*. Yusof e Segall (2013) relataram uma métrica de probabilidade relativa de ser um fármaco (RDL) que empregava métodos Bayesianos para incorporar a distinção entre fármacos e não-fármacos na função de conveniência da QED. Algumas das principais regras encontram-se resumidas na Tabela I.

Category	Rule name	Properties and guidelines
Drug-likeness	Ro5 (Lipinski <i>et al.</i> 1997)	MW (200 ~ 500), ClogP \leq 5, HBAs (0 ~ 10), HBDs (0 ~ 5), ROTBs (0 ~ 10)
	QED (Bickerton <i>et al.</i> 2012)	QED = $\exp(1/n \sum_{i=1}^n \ln d_i)$, where d_i is the desirability function for molecular descriptor i
	RDL (Yusof & Segall, 2013)	RDL = $\exp(1/n \sum_{i=1}^n \ln(d_i(x_i)))$, where $d_i(x_i)$ is the ratio of probabilities of descriptor x in drugs and non-drugs.
Lead-likeness	Teague <i>et al.</i> (1999)	MW < 350 Da, ClogP < 3, and Affinity > 0.1 μ M
	Rule of 3 for fragment-based leads (Congreve <i>et al.</i> 2003)	MW \leq 300, ClogP \leq 3, HBDs \leq 3, HBAs \leq 3, ROTB \leq 3, and PSA \leq 60
Promiscuity-likeness	Leeson & Springthorpe (2007)	Log Promiscuity = $0 \cdot 075\text{Clog} P - 0 \cdot 71A - 0 \cdot 54N - 0 \cdot 47Z + 1 \cdot 00$ (A , N , and Z are indicator variables, set equal to 1 for acids, neutrals, and zwitterions, respectively)
Toxicity-likeness	Hughes <i>et al.</i> (2008)	Compounds with $\log P > 3$ and $\text{PSA} < 75 \text{ \AA}^2$ have a significantly increased safety risk

Tabela I^[21]: Sumário das regras abordadas. Legenda: MW: massa molecular, HBAs: aceitadores de ligações de hidrogénio, HBDs: dadores de ligações de hidrogénio, ROTBs: ligações que permitem rotação livre em seu redor, PSA: área de superfície polar.

3. Barreira hematoencefálica

Um dos problemas que atualmente se vive é o envelhecimento da população, cujas estimativas para o futuro não são promissoras. Como tal, o sistema nervoso central (SNC) é a área mais afetada pelo envelhecimento ^[28]. A esquizofrenia, depressão, ansiedade, insónia, a doença de Alzheimer e de Parkinson são apenas alguns exemplos de doenças que afetam o SNC. No caso da doença de Alzheimer, a prevalência nos Estados Unidos pode praticamente triplicar nos próximos 40 anos, passando de 4.7 milhões de pacientes em 2010 para 13.8 milhões de pacientes em 2050 ^[29].

Para muitas doenças neurológicas, um tratamento satisfatório é quase inexistente devido à permeação insuficiente dos grupos ativos através da barreira hematoencefálica (BBB) e da barreira sangue-líquido cefalorraquidiano (BCSFB) ^[30]. É evidente que, para a grande maioria de fármacos com alvo no SNC, a BBB tem de ser atravessada para se exercer o efeito terapêutico, sendo as únicas exceções compostos administrados por via intranasal ou invasiva. Por outro lado, para fármacos cujo alvo esteja fora do SNC, a passagem através da BBB pode levar a efeitos secundários indesejáveis e deve ser, por isso, minimizada ^[31].

A BBB regula o meio interno do cérebro e mantém a homeostase, garantindo o bom funcionamento do SNC. Isso permite a permeação dos nutrientes necessários para o cérebro enquanto age como uma barreira à passagem de substâncias nocivas presentes no plasma. Com uma homeostase eficiente existem dois problemas críticos no tratamento de doenças neurológicas. Em primeiro lugar, a exclusão de potenciais neuroterápicos (devido à sua entrada insuficiente no cérebro) e, segundo, o acesso limitado de células do sistema imunitário ^[32].

A BBB foi caracterizada pela primeira vez em 1885, quando Paul Ehrlich injetou corantes vitais⁴ em animais e observou que o cérebro não ficou corado como o resto do corpo ^[33]. Desde então, estudos mais aprofundados permitiram um maior entendimento do funcionamento da BBB e identificar elementos-chave da sua estrutura e mecanismos que a tornam tão única [Figura 1].

⁴ Corantes passíveis de serem aplicados em células vivas sem provocar a sua morte.

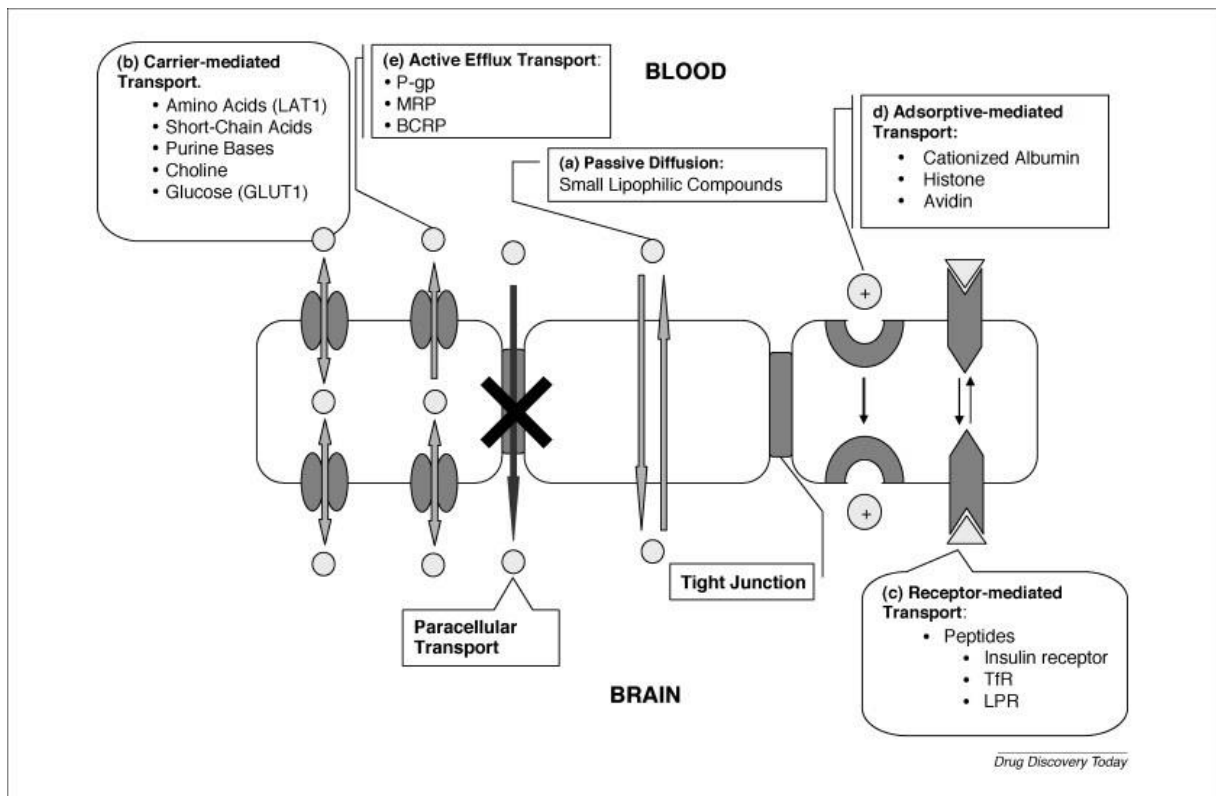


Figura 1^[34]: Representação da BBB: existem vários mecanismos que interferem com a permeabilidade dos compostos através da BBB. (a) A difusão passiva é o mecanismo mais comum pelo qual pequenos compostos lipofílicos penetram a BBB. (b) Transporte mediado por proteínas transportadoras que ocorre normalmente com pequenos compostos hidrofílicos (LAT1: *Large neutral Amino acids Transporter 1*; GLUT1: *Glucose transporter 1*). (c) Transporte mediado por recetores que geralmente ocorre com compostos hidrófilos de grande dimensão como péptidos e proteínas e tem um papel relevante no transporte de biofármacos (TfR: *Transferrin Receptor*; LPR: *LDL-related protein receptor*). (d) A transcitose mediada por adsorção é um mecanismo relativamente não-específico para péptidos com carga positiva. (e) O transporte ativo por efluxo é um sistema *antiporter* que atenua a concentração de muitos fármacos no SNC por efluxo ativo contra o gradiente de concentração, ou seja, do cérebro para o sangue (P-gp: glicoproteína-P; MRP: *Multidrug Resistance Protein*; BCRP: *Breast Cancer Resistance Protein*).

Esta barreira é formada por células endoteliais capilares cerebrais (BCEC) que têm, pelo menos, três características que as distinguem do endotélio periférico: (i) ausência de fenestras devido ao elevado número de *tight junctions* (TJs) de permeabilidade bastante reduzida e *adherent junctions* (AJs); (ii) baixos níveis de endocitose de fase fluida; (iii) transportadores específicos ^[32]. Além disso, os astrócitos e pericitos, juntamente com a membrana basal (BM) tornam a BBB mais específica.

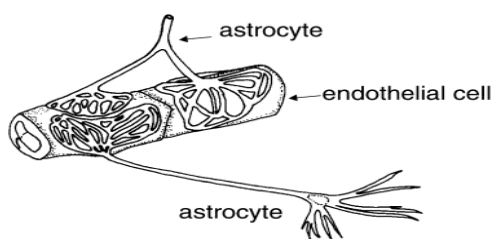


Figura 2 ^[35]: Esquema dos prolongamentos astrocíticos, que formam estruturas em forma de roseta sobre a superfície capilar cerebral.

No cérebro humano, os astrócitos são as células gliais em forma de estrela cujos prolongamentos finais formam um rendilhado de lamelas próximo e aderente à superfície externa do endotélio da BBB e à membrana basal respetiva ^[36], conforme se constata na Figura 2. Os astrócitos regulam a homeostase do cérebro ao manterem os níveis de K^+ , inativando neurotransmissores e regulando a produção de fatores de crescimento e citocinas ^[35]. Os

pericitos são células esféricas com núcleo proeminente com lisossomas primários e secundários no seu citoplasma. Estes estão envolvidos na formação, diferenciação e manutenção da integridade da BBB ^[37,38].

Uma inspeção mais detalhada da anatomia da BBB revela a presença de TJs e AJs, que essencialmente previnem qualquer transporte paracelular através da vasculatura e concedem a permeabilidade seletiva da BBB a fármacos. As AJs dão apoio estrutural às células endoteliais vasculares. Estas TJs contrastam com a vasculatura periférica, onde a falta de TJs permite o transporte paracelular livre através de aberturas ou fenestrações entre as células endoteliais ^[39]. As TJs da BBB podem ser abertas sob condições específicas, permitindo temporariamente a introdução de compostos no cérebro ^[40-42] bem como em condições patológicas, por exemplo, após acidente vascular cerebral isquémico ^[43]. Várias proteínas estão associadas com as TJs, incluindo a ocludina e a claudina, bem como moléculas de adesão juncional (JAM). As TJs encontradas na BBB conferem uma resistência elétrica elevada à vasculatura característica (1500–2000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$) ^[44]. Devido ao transporte paracelular/permeabilidade de compostos restritivos através da vasculatura endotelial cerebral, a maioria dos compostos ganha acesso ao cérebro quer através de difusão transcelular quer através de captação mediada por transportador.

4. Predição computacional da permeabilidade através da BBB

4.1. Porquê utilizar métodos computacionais?

A permeabilidade da BBB pode ser determinada por métodos *in vivo* ou *in vitro*. Os métodos *in vivo* envolvem a determinação da fração de fármaco transportada diretamente nos tecidos cerebrais ou em amostras de sangue a fim de estudar o desaparecimento do fármaco [45]. É comum em métodos *in vivo* a determinação do logaritmo do coeficiente de partição cérebro-sangue ($\log BB$). No entanto, estes métodos *in vivo* são trabalhosos e de baixo rendimento por natureza. Portanto, é frequente serem utilizados métodos *in vitro* de alto rendimento [46].

Os métodos computacionais de previsão estão a ganhar popularidade nos processos de descoberta de fármacos pois são baratos e mais rápidos. Salienta-se que os métodos experimentais para determinar a permeabilidade através da BBB são muito caros e métodos *in vitro* como o PAMPA (*parallel artificial membrane permeability assay*) não mimetizam eficazmente a BBB *in vivo*, portanto, várias abordagens computacionais com base em relações estrutura-atividade (SAR), análise probabilística, a análise estatística e aprendizagem automática para classificação baseada em inteligência artificial (*artificial intelligence based machine learning classification*) estão a ser usados recentemente pela comunidade científica, empenhada no desenvolvimento de neuroterápicos. Destacam-se vários métodos computacionais que têm sido frequentemente utilizados pelos investigadores para a geração de modelos BBB, sendo estes Regressão Linear Múltipla (MLR) e por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) [47].

Recentemente, também foram gerados modelos de permeabilidade através da BBB usando Algoritmos Genéticos, Redes Neurais, Relações Quantitativas Estrutura-Atividade (QSAR) e Máquinas de Vetores de Suporte (SVM) [48]. Embora estas abordagens computacionais tenham certos fatores limitantes em termos de exatidão e de precisão, várias tentativas têm sido feitas nos últimos anos para gerar modelos computacionais aprimorados que prevejam a permeabilidade das moléculas através da BBB.

4.2. QSAR/QSPR

Um dos subcampos mais estudados da quimiometria, considerando o número de publicações e investigadores interessados, são as QSAR/QSPR. Uma QSAR é um método quantitativo que visa estabelecer um modelo que relacione características químicas estruturais de compostos – descritores – às suas atividades biológicas definitivas. A modelação da atividade biológica foi alargada a outras propriedades físico-químicas, que se designa relação quantitativa estrutura-atividade (QSPR). Diferentes propriedades ou comportamentos de moléculas químicas têm sido investigadas no campo da QSPR. Alguns exemplos são relações quantitativas estrutura-reatividade (QSRRs), relações quantitativas estrutura-cromatografia (QSCRs), relações quantitativas estrutura-toxicidade (QSTRs), relações quantitativas estrutura-eletrouímica (QSERs) e relações quantitativas estrutura-biodegradabilidade (QSEBRs) [49].

Num estudo QSAR/QSPR, recolher ou conceber um subconjunto de compostos químicos ou biológicos, gerar descritores potentes capazes de refletir a estrutura dos compostos, selecionar descritores relevantes para incluir no modelo, construir um modelo de regressão e verificar a validade e estabilidade do modelo sugerido constituem cinco passos essenciais. Apenas serão focadas as três últimas etapas, ou seja, (i) seleção de variáveis, (ii) construção do modelo e (iii) avaliação de validação, isto porque as ferramentas quimiométricas foram envolvidas de uma forma mais significativa [49].

Esta área sofreu um crescimento considerável durante o século XX, aproveitando descobertas envolvendo descritores e categorias estruturais, culminando em marcos históricos importantes. Alguns autores consideram o nascimento oficial em 1962, com o trabalho de Hansch et al. que originou o primeiro modelo QSAR multiparamétrico [49].

Outro ponto histórico em estudos de estrutura-atividade foi a publicação de Free e Wilson (1964), cuja ideia foi a modelagem de uma atividade biológica (ou propriedade química) olhando para a presença/ausência de um grupo funcional substituinte num esqueleto estrutural comum [49].

Na década de 1980, propondo e utilizando diferentes categorias de descritores topológicos e geométricos, a estrutura 3D de moléculas entrou na QSAR/QSPR e derivados melhoramentos na predictibilidade dos modelos, bem como a sua capacidade de descrição. Outra etapa brilhante e muito importante para a QSAR foi o desenvolvimento de descritores

moleculares baseados em campos de interação molecular (MIFs) que levou para a área bem conhecida da 3D QSAR [49].

4.3. Modelos de QSAR baseados em log BB

No topo da hierarquia de modelos de permeação cerebral estão os modelos QSAR, com base em dados log BB. Muitos modelos foram construídos utilizando o que se tornou conhecido como o conjunto de dados de Abraham (originalmente compilado e recentemente aumentado pelo grupo de Mike Abraham na University College, em Londres [50]). É interessante notar que, ao longo do tempo, têm sido detetados erros nas estruturas químicas e nos dados log BB que são relatados em algumas publicações. Assim, se se tiver um novo projeto para gerar um modelo log BB QSAR em mãos, as estruturas e os dados a serem utilizados devem ser verificadas com cuidado, com referência à literatura primária sempre que possível [31].

4.4. Informações a retirar de modelos log BB QSAR

Uma análise dos descritores (e dos seus coeficientes associados) que constam nos modelos log BB QSAR (resumidos na Tabela 2) fornece uma visão sobre as propriedades moleculares que determinam a permeação através da BBB [31].

Table 2. Summary of recently published logBB QSAR models

Molecular descriptors	n_{train}	r^2_{train}	s_{train}	n_{test}	Test set predictive performance
Abraham solute descriptors	148	0.75	0.34	74	$r^2_{\text{test}} = 0.72$, $s = 0.38$ (mean of 2 test sets)
Molecular properties derived from Monte Carlo simulations in water	76	0.94	0.17	4	RMS = 0.48
Volsurf	79	0.76	N/A	N/A	$q^2_{\text{train}} = 0.65$
Electrotopological state indices	102	0.66	0.45	20	RMS = 0.38, MAE = 0.32
Computed molecular properties including membrane-interaction descriptors	56	0.85	-	7	MAE = 0.39
Computed molecular properties from Cerius ² and ACD/Labs software	48	0.84	0.19	17	$r^2_{\text{test}} = 0.68$, MAE = 0.41

n_{train} = the number of compounds in the training set

r^2_{train} , s_{train} , and q^2_{train} = the r^2 value, the standard deviation and the cross-validated r^2 value, respectively, for the model derived from the training set

n_{test} = the number of compounds in the test set used to assess the model's predictive power

r^2_{test} = the r^2 value for test set predictions

Abbreviations: RMS, Root Mean Square; MAE, Mean Absolute Error of prediction on the test set compounds.

4.4.1. Pontes de hidrogénio

Todos os modelos contêm um descritor relacionado com polaridade ou capacidade de estabelecer pontes de hidrogénio, por exemplo, a PSA, número de HBAs e HBDs ou a acidez/alcalinidade das pontes de hidrogénio. Em todos os casos, estes descritores correlacionam-se negativamente com o $\log BB$; por outras palavras, aumentar a força ou a capacidade das ligações de hidrogénio geralmente conduz a uma redução da permeação através da BBB. Isso reflete a observação de que compostos altamente polares/que estabeleçam pontes de hidrogénio de ligação forte não permeiam membranas facilmente^[31].

4.4.2. Lipofilia

Quatro dos seis modelos contêm um descritor que se relaciona com a lipofilia, por exemplo, o $\log P$ ou os descritores hidrofóbicos de Volsurf. Tais descritores correlacionam-se positivamente com o $\log BB$, isto é, o aumento de lipofilia tende a aumentar a permeação através da BBB. Mais uma vez, isto está de acordo com o facto de que os compostos lipofílicos tendem a atravessar membranas mais facilmente do que os ligandos hidrofílicos. Curiosamente, o modelo Volsurf sugere que a lipofilia tem um menor impacto que a polaridade na determinação da permeação através da BBB^[31].

4.4.3. Tamanho de partícula

Dois dos modelos incluem um termo de volume molecular e, em ambos os casos, este tem um coeficiente positivo (isto é, o volume molecular crescente parece estar correlacionada com o aumento de permeação cerebral). À primeira vista, esta conclusão parece estar em conflito com uma compreensão geral da difusão (classicamente, de acordo com a relação de Stokes-Einstein, o coeficiente de difusão de um objeto é inversamente proporcional ao seu raio). No entanto, a relação de Stokes-Einstein refere-se apenas à difusão numa solução homogénea; não é claro se isto se aplica à permeação através da BBB, em especial quando esta é medida com o $\log BB$, que é uma propriedade de equilíbrio, ou, pelo menos, de quasi-equilíbrio. Além disso, verificou-se que, devido às interações coesivas solvente-solvente

(geralmente água-água) terem que ser interrompidas para fazer uma cavidade que acomode o soluto, há uma força motriz proporcional ao volume molecular que empurra solutos hidrofóbicos para a fase menos polar – efeito hidrofóbico^[31].

4.4.4.Carga molecular

Apenas um dos modelos considera a carga molecular explicitamente, tirando as seguintes conclusões:

1. Uma carga positiva a um pH entre 7 e 8 tende a favorecer a permeação cerebral (isto precisa de ser qualificado pela observação de Fischer et al. (1998) que as moléculas com um valor de pKa > 10 não atravessam a BBB por difusão passiva). Inicialmente, esta conclusão parece estar em desacordo com a hipótese pH-partição, que assume que apenas espécies neutras se fracionam pelas membranas. No entanto, demonstrou-se que as espécies carregadas positivamente podem entrar pelas membranas a um limite maior do que o sugerido pela hipótese pH-partição. Além disso, compostos que possuam um grupo amina terciária (uma característica de vários fármacos do SNC) mostram um maior grau de permeação cerebral do que seria esperado a partir do seu valor de pKa aparente (~ 8), possivelmente porque a sua forma ionizada é destabilizada na membrana, o que resulta numa diminuição eficaz dos valores de pKa^[31].
2. A presença de uma carga negativa a pH ≤ 5 correlaciona-se negativamente com o log BB. Novamente, isto está de acordo com observações anteriores de que as moléculas com valores de pKa < 4 têm dificuldade em penetrar o cérebro. Isto reflete-se ainda pela presença de uma variável indicadora de ácido carboxílico (com um coeficiente negativo) no modelo relatado por Platts et al. (2001).

Em geral, estas duas conclusões apoiam o facto de que os ácidos têm geralmente maior dificuldade do que as bases em permear membranas^[31].

4.4.5.Forma molecular e flexibilidade

Os papéis da forma molecular e flexibilidade na manutenção da permeação cerebral são menos claros a partir dos modelos considerados na Tabela 2. Dois dos modelos sugerem que as moléculas em forma esférica são preferíveis às moléculas em forma de haste para a

permeação do cérebro. No entanto, o modelo com base nos índices do estado eletrotológico indica que o aumento da ramificação molecular correlaciona-se negativamente com $\log BB$ - uma aparente contradição com esta conclusão^[31].

Apenas um modelo estudou a flexibilidade molecular e concluiu que o aumento da flexibilidade do soluto se correlaciona positivamente com $\log BB$. Isto parece estar em desacordo com um estudo recente que investigou o papel da flexibilidade molecular na taxa de permeação através de membranas artificiais. A conclusão do trabalho foi que o aumento da taxa de permeação foi contrabalançado pela diminuição da contagem de ROTBs^[31].

5. Conclusão

Apesar de vários anos de esforços, o desenho de fármacos para o SNC continua a ser a “ovelha negra” do processo de desenvolvimento de fármacos principalmente devido à barreira hematoencefálica. Este desafio provocou uma grande variedade de estudos para ultrapassar o problema da penetração no cérebro. Deste modo, as abordagens computacionais mostraram uma tendência promissora para ultrapassar a BBB. Neste contexto, diferentes métodos *in silico* têm sido desenvolvidos. No entanto, existe um desafio incessante entre interpretabilidade e capacidade preditiva dos modelos tendo em conta o facto de que os modelos simples, geralmente derivados por regressão linear, proporcionam uma boa visão sobre o processo de permeação, embora não sendo geralmente preditores de alta qualidade. Por outro lado, a modelagem inovadora como redes neurais geram previsões muito precisas, enquanto que a sua elucidação seria quase uma tarefa impossível. Consequentemente, modelos complexos não podem ser utilizados na otimização de *leads*, porque a questão principal do *designer* para o próximo passo é “que composto devo fazer a seguir?”^[51]

Além disso, o problema principal parece ser completamente ignorado “que parâmetro deve ser usado na modelagem como substituto de permeabilidade cerebral de fármacos?”, embora nos últimos anos tenham sido realizados alguns esforços para tornar a resposta clara. Desta forma, a maioria dos trabalhos de literatura com base na análise experimental chegam à conclusão que os parâmetros derivados da concentração total como $\log BB$ são medidas muito imperfeitas de penetração da BBB^[52,53]. Apesar desta conclusão, parece que as divisões computacionais fecham os olhos a este facto e até agora quase toda a literatura ainda usa o $\log BB$. Por outro lado, embora baseado na “hipótese fármaco não-ligado”, a mudança de

$\log BB$ para parâmetros relacionados com concentrações de fármaco não-ligado pode dar uma melhor ideia, mas contando com apenas esses parâmetros seria a próxima tendência enganadora porque apenas um parâmetro não pode dar detalhes completos sobre a permeabilidade da BBB e esta consiste em, pelo menos, três partes de apuramento da permeabilidade: *clearance*, fração não ligada ao cérebro e a distribuição intracerebral ^[52]. Finalmente, as mudanças rápidas nos processos de descoberta de fármacos para o SNC nos últimos anos chamam a atenção para esta realidade que se focar-se apenas na modelagem das concentrações e dados farmacocinéticos relacionados não criam uma boa percepção da atividade do SNC nem dos fármacos, pois são altamente dependentes da biologia e da farmacologia dos compostos e do cérebro ^[53]. Assim, seria inevitável combinar os dados farmacodinâmicos e farmacocinéticos incluindo todas as informações sobre os processos celulares/moleculares da permeabilidade da BBB a fármacos paralelamente às suas ações sobre o SNC, o que me leva a constatar que um desafio futuro será conseguir uma integração que contemple a diferente influência dos vários fatores moleculares sobre a velocidade de cada um dos processos relevantes na permeação, de modo a modelar o processo global.

6. Bibliografia

- [1] PERSICO, Marco *et al.* - Use of Integrated Computational Approaches in the Search for New Therapeutic Agents. **Molecular informatics**. . ISSN 1868-1751. 35:8–9 (2016) 309–325. doi: 10.1002/minf.201501028.
- [2] SLIWOSKI, Gregory *et al.* - Computational methods in drug discovery. **Pharmacological reviews**. 66:1 (2014) 334–395. doi: 10.1124/pr.112.007336.
- [3] LIAO, Chenzhong *et al.* - Software and resources for computational medicinal chemistry. **Future medicinal chemistry**. 3:8 (2011) 1057–1085. doi: 10.4155/fmc.11.63.
- [4] PÉREZ-NUENO, Violeta I. *et al.* - Comparison of Ligand-Based and Receptor-Based Virtual Screening of HIV Entry Inhibitors for the CXCR4 and CCR5 Receptors Using 3D Ligand Shape Matching and Ligand–Receptor Docking. **Journal of Chemical Information and Modeling**. 48:3 (2008) 509–533. doi: 10.1021/ci700415g.
- [5] CALLAWAY, Ewen - The revolution will not be crystallized: a new method sweeps through structural biology. **Nature**. 525:7568 (2015) 172–174. doi: 10.1038/525172a.
- [6] JHOTI, Harren; LEACH, Andrew R. - **Structure-Based Drug Discovery**. Dordrecht : Springer Netherlands, 2007. ISBN 978-1-4020-4406-9.
- [7] LEE, Chia-Hsien; HUANG, Hsuan-Cheng; JUAN, Hsueh-Fen - Reviewing Ligand-Based Rational Drug Design: The Search for an ATP Synthase Inhibitor. **International Journal of Molecular Sciences**. 12:12 (2011) 5304–5318. doi: 10.3390/ijms12085304.
- [8] MERZ, Kenneth M.; RINGE, Dagmar.; REYNOLDS, Charles H. - Drug design: structure- and ligand-based approaches. Cambridge, UK. 2010) 151–164.
- [9] VILLOUTREIX, Bruno O. *et al.* - One hundred thousand mouse clicks down the road: selected online resources supporting drug discovery collected over a decade. **Drug discovery today**. 18:21–22 (2013) 1081–1089. doi: 10.1016/j.drudis.2013.06.013.
- [10] WILSON, Gregory L.; LILL, Markus A. - Integrating structure-based and ligand-based approaches for computational drug design. **Future medicinal chemistry**. 3:6 (2011) 735–750. doi: 10.4155/fmc.11.18.
- [11] KUHN, Bernd *et al.* - A Real-World Perspective on Molecular Design. **Journal of Medicinal Chemistry**. 59:9 (2016) 4087–4102. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b01875.
- [12] ALLEN, Bryce K. *et al.* - Large-Scale Computational Screening Identifies First in Class Multitarget Inhibitor of EGFR Kinase and BRD4. **Scientific reports**. 5:2015) 16924. doi: 10.1038/srep16924.
- [13] REYNOLDS, Charles H. - Impact of computational structure-based methods on drug discovery. **Current pharmaceutical design**. 20:20 (2014) 3380–3386.
- [14] TALELE, Tanaji T.; KHEDKAR, Santosh A.; RIGBY, Alan C. - Successful applications of computer aided drug discovery: moving drugs from concept to the clinic. **Current topics in medicinal chemistry**. 10:1 (2010) 127–141.
- [15] MICHEL, Julien - Current and emerging opportunities for molecular simulations in structure-based drug design. **Phys. Chem. Chem. Phys.** 16:10 (2014) 4465–4477. doi: 10.1039/C3CP54164A.
- [16] WANG, Lingle *et al.* - Accurate and Reliable Prediction of Relative Ligand Binding Potency in Prospective Drug Discovery by Way of a Modern Free-Energy Calculation Protocol and Force Field. **Journal of the American Chemical Society**. 137:7 (2015) 2695–2703. doi: 10.1021/ja512751q.
- [17] SINGH, Juswinder *et al.* - Successful shape-based virtual screening: the discovery of a potent inhibitor of the type I TGFbeta receptor kinase (TbetaRI). **Bioorganic & medicinal chemistry letters**. 13:24 (2003) 4355–4359. doi: 10.1016/j.bmcl.2003.09.028.
- [18] BECKER, Oren M. *et al.* - An integrated in silico 3D model-driven discovery of a novel, potent, and selective amidosulfonamide 5-HT1A agonist (PRX-00023) for the treatment of anxiety and depression. **Journal of medicinal chemistry**. 49:11 (2006) 3116–3135. doi:

- 10.1021/jm0508641.
- [19] LEESON, Paul D.; OPREA, Tudor I. - Chapter 2 Drug-Like Physicochemical Properties. Em **Drug Design Strategies: Quantitative Approaches**. [S.l.] : The Royal Society of Chemistry, 2012. ISBN 978-1-84973-166-9. p. 35–59.
- [20] LEESON, Paul D.; SPRINGTHORPE, Brian - The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry. **Nat Rev Drug Discov.** . ISSN 1474-1776. 6:11 (2007) 881–890.
- [21] WANG, Yulan *et al.* - In silico ADME/T modelling for rational drug design. **Quarterly Reviews of Biophysics.** 48:4 (2015) 488–515. doi: 10.1017/S0033583515000190.
- [22] ARNOTT, John A.; PLANEY, Sonia Lobo - The influence of lipophilicity in drug discovery and design. **Expert opinion on drug discovery.** 7:10 (2012) 863–875. doi: 10.1517/17460441.2012.714363.
- [23] WARING, Michael J. - Lipophilicity in drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery.** . ISSN 1746-0441. 5:3 (2010) 235–248. doi: 10.1517/17460441003605098.
- [24] STEGEMANN, S. *et al.* - When poor solubility becomes an issue: from early stage to proof of concept. **European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences.** 31:5 (2007) 249–261. doi: 10.1016/j.ejps.2007.05.110.
- [25] CHARIFSON, Paul S.; WALTERS, W.Patrick - Acidic and basic drugs in medicinal chemistry: a perspective. **Journal of medicinal chemistry.** 57:23 (2014) 9701–9717. doi: 10.1021/jm501000a.
- [26] MANALLACK, David T. *et al.* - The significance of acid/base properties in drug discovery. **Chemical Society reviews.** 42:2 (2013) 485–496. doi: 10.1039/c2cs35348b.
- [27] TEAGUE, Simon J. *et al.* - The Design of Leadlike Combinatorial Libraries. **Angewandte Chemie International Edition.** 38:24 (1999) 3743–3748. doi: 10.1002/(SICI)1521-3773(19991216)38:24<3743::AID-ANIE3743>3.0.CO;2-U.
- [28] GHOSE, Arup K. *et al.* - Knowledge-Based, Central Nervous System (CNS) Lead Selection and Lead Optimization for CNS Drug Discovery. **ACS chemical neuroscience.** 3:1 (2012) 50–68. doi: 10.1021/cn200100h.
- [29] HEBERT, Liesi E. *et al.* - Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. **Neurology.** 80:19 (2013) 1778–1783. doi: 10.1212/WNL.0b013e31828726f5.
- [30] REDZIC, Zoran - Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences. **Fluids and Barriers of the CNS.** . ISSN 2045-8118. 8:2011) 3. doi: 10.1186/2045-8118-8-3.
- [31] CLARK, David E. - In silico prediction of blood-brain barrier permeation. **Drug discovery today.** 8:20 (2003) 927–933.
- [32] GLOOR, Sergio M. *et al.* - Molecular and cellular permeability control at the blood–brain barrier. **Brain Research Reviews.** 36:2 (2001) 258–264. doi: 10.1016/S0165-0173(01)00102-3.
- [33] RIBATTI, Domenico *et al.* - Development of the blood-brain barrier: a historical point of view. **Anatomical record. Part B, New anatomist.** 289:1 (2006) 3–8. doi: 10.1002/ar.b.20087.
- [34] MEHDIPOUR, Ahmad Reza; HAMIDI, Mehrdad - Brain drug targeting: a computational approach for overcoming blood–brain barrier. **Drug Discovery Today.** 14:21 (2009) 1030–1036. doi: 10.1016/j.drudis.2009.07.009.
- [35] ABBOTT, N.Joan - Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability*. **Journal of Anatomy.** 200:6 (2002) 629–638. doi: 10.1046/j.1469-7580.2002.00064.x.
- [36] CARDOSO, Filipa Lourenço; BRITES, Dora; BRITO, Maria Alexandra - Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. **Brain research reviews.** 64:2 (2010) 328–363. doi: 10.1016/j.brainresrev.2010.05.003.
- [37] BALABANOV, Roumen; DORE-DUFFY, Paula - Role of the CNS microvascular pericyte in the blood-brain barrier. **Journal of Neuroscience Research.** 53:6 (1998) 637–644. doi: 10.1002/(SICI)1097-4547(19980915)53:6<637::AID-JNRI>3.0.CO;2-6.
- [38] BLASI, Paolo *et al.* - Solid lipid nanoparticles for targeted brain drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews.** 59:6 (2007) 454–477. doi: 10.1016/j.addr.2007.04.011.
- [39] CORREALE, Jorge; VILLA, Andrés - Cellular elements of the blood-brain barrier. **Neurochemical research.** 34:12 (2009) 2067–2077. doi: 10.1007/s11064-

009-0081-y.

- [40] KONOFAGOU, Elisa E. - Optimization of the ultrasound-induced blood-brain barrier opening. **Theranostics**. 2:12 (2012) 1223–1237. doi: 10.7150/thno.5576.
- [41] MARTIN, Jacob A. *et al.* - Rat model of blood-brain barrier disruption to allow targeted neurovascular therapeutics. **Journal of visualized experiments: JoVE**. 69 (2012) e50019. doi: 10.3791/50019.
- [42] STAMATOVIC, Svetlana M.; KEEP, Richard F.; ANDJELKOVIC, Anuska V - Brain endothelial cell-cell junctions: how to “open” the blood brain barrier. **Current neuropharmacology**. 6:3 (2008) 179–192. doi: 10.2174/157015908785777210.
- [43] NAGARAJA, Tavarekere N. *et al.* - Identification of variations in blood-brain barrier opening after cerebral ischemia by dual contrast-enhanced magnetic resonance imaging and T₁sat measurements. **Stroke; a journal of cerebral circulation**. 39:2 (2008) 427–432. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.496059.
- [44] BOADO, Ruben J. *et al.* - IgG-enzyme fusion protein: pharmacokinetics and anti-drug antibody response in rhesus monkeys. **Bioconjugate chemistry**. 24:1 (2013) 97–104. doi: 10.1021/bc3005123.
- [45] SMITH, Quentin R. - A review of blood-brain barrier transport techniques. **Methods in molecular medicine**. 89:2003) 193–208. doi: 10.1385/1-59259-419-0:193.
- [46] GUMBLETON, M.; AUDUS, K. L. - Progress and limitations in the use of in vitro cell cultures to serve as a permeability screen for the blood-brain barrier. **Journal of pharmaceutical sciences**. 90:11 (2001) 1681–1698.
- [47] KUMAR, Rajnish; SHARMA, Anju; TIWARI, Rajesh Kumar - Can we predict blood brain barrier permeability of ligands using computational approaches? **Interdisciplinary sciences, computational life sciences**. 5:2 (2013) 95–101. doi: 10.1007/s12539-013-0158-9.
- [48] DONIGER, Scott; HOFMANN, Thomas; YEH, Joanne - Predicting CNS permeability of drug molecules: comparison of neural network and support vector machine algorithms. **Journal of computational biology: a journal of computational molecular cell biology**. 9:6 (2002) 849–864. doi: 10.1089/10665270260518317.
- [49] YOUSEFINEJAD, Saeed; HEMMATEENEJAD, Bahram - Chemometrics tools in QSAR/QSPR studies: A historical perspective. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**. 149:2015) 177–204. doi: 10.1016/j.chemolab.2015.06.016.
- [50] PLATTS, James A. *et al.* - Correlation and prediction of a large blood–brain distribution data set— an LFER study. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 36:9 (2001) 719–730. doi: 10.1016/S0223-5234(01)01269-7.
- [51] GOODWIN, Jay T.; CLARK, David E. - In Silico Predictions of Blood-Brain Barrier Penetration: Considerations to «Keep in Mind». **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 315:2 (2005) 477–483. doi: 10.1124/JPET.104.075705.
- [52] HAMMARLUND-UDENAES, Margareta *et al.* - On The Rate and Extent of Drug Delivery to the Brain. **Pharmaceutical Research**. 25:8 (2008) 1737. doi: 10.1007/s11095-007-9502-2.
- [53] JEFFREY, P.; SUMMERFIELD, S. G. - Challenges for blood–brain barrier (BBB) screening. <http://dx.doi.org/10.1080/00498250701570285>. 2008). doi: 10.1080/00498250701570285.

Imagem da capa: [Consult. 15 set. 2016], disponível em <http://www.cabinet-neuropsychologie.com/wp-content/uploads/2014/03/neurones-alexis.jpg>