



Dário Miguel Valezim Silva

Licenciatura em Bioquímica

Desenvolvimento de novas moléculas para terapia de diferenciação na tumorigénese neural

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Química Bioorgânica

Orientador: Professora Doutora Maria M. M. Santos, FFULisboa

Co-Orientador: Professora Doutora Susana Solá, FFULisboa

Júri

Presidente: Professora Doutora Paula Cristina de Sério Branco

Arguente: Professora Doutora Alexandra Maria Moita Antunes

Vogais: Professora Doutora Maria M. M. Santos

Outubro 2017



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



Dário Miguel Valezim Silva

Licenciatura em Bioquímica

**Desenvolvimento de novas moléculas para terapia de
diferenciação na tumorigénese neural**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Química Bioorgânica

Orientador: Professora Doutora Maria M. M. Santos, FFULisboa

Co-Orientador: Professora Doutora Susana Solá, FFULisboa

Júri

Presidente: Professora Doutora Paula Cristina de Sério Branco

Arguente: Professora Doutora Alexandra Maria Moita Antunes

Vogais:

Outubro 2017

Desenvolvimento de novas moléculas para terapia de diferenciação na tumorigénese neural

Copyright Dário Silva, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Prof. Doutora Maria Santos pela oportunidade concedida e pela orientação ao longo do ano. Agradeço também à Prof. Doutora Susana Solá pela orientação na parte da avaliação biológica.

Agradeço também à Prof. Doutora Noélia Duarte pela realização dos ensaios de LC-MS.

Um agradecimento à Doutora Joana Amaral pela ajuda na realização dos primeiros ensaios biológicos e pela disponibilização das linhas celulares HCT116 e GI-261.

Quero agradecer especialmente à minha família, nomeadamente aos meus pais e avós maternos, porque sem eles nunca poderia estar aqui.

Um agradecimento à Maria Ribeiro e à Marta Fernandes que foram as pessoas que mais me ajudaram e aconselharam (quando eu ainda não era um cell master) relativamente às NSCs.

Por fim, mas não menos importante, agradeço a todos os colegas do grupo de química medicinal, em especial ao Ale, ao Jorge, à Eliza, à Margarida, à Lara, à Valentina e à Rita Pratas pelo ambiente de amizade criado no laboratório e por todos os momentos passados juntos.

Obrigado a todos!

Resumo

Em mais de 50% dos tumores humanos, o gene TP53 está mutado ou deletado enquanto que, em tumores com p53 *wild type*, a função da p53 é inativada pela sobre-expressão dos seus reguladores negativos, como por exemplo, a proteína *murine double minute 2* (MDM2). Posto isto, inibir a interação p53-MDM2, de modo a reativar a p53, surgiu como uma nova estratégia no combate contra a progressão tumoral.

Além dos papéis bem conhecidos da p53, esta mostrou ter um papel chave na diferenciação celular, inibindo o potencial cancerígeno das células estaminais promovendo o processo de diferenciação celular, incluindo a neurogênese.

Várias famílias de spirooxindóis foram desenhadas para inibir a interação p53-MDM2. No entanto, o efeito desses compostos na regulação da diferenciação celular e consequente regulação do fenótipo maligno dos tumores nunca foi explorado e, por isso, nesta tese, foi sintetizada uma nova biblioteca de spiropirazolina oxindóis com o intuito de descobrir novos reativadores da p53 com potencial para induzir diferenciação celular.

Inicialmente, foi realizado um *screening* dos compostos nas linhas celulares cancerígenas HCT116 p53^(+/+) e HCT116 p53^(-/-) de modo a avaliar a citotoxicidade e seletividade dos compostos para a proteína p53. Posteriormente, foi avaliado o potencial diferenciador do composto mais seletivo em células estaminais neurais (NSCs).

Neste trabalho, identificámos a spiropirazolina oxindole **11a** como o composto mais seletivo para a linha celular HCT116 p53^(+/+) apresentando um IC₅₀ de 25 µM, sendo que estas características sugeriam um potencial deste composto na indução de diferenciação em NCSs. De fato, demonstrou-se que o composto induz diferenciação em NSCs através da redução dos níveis da proteína SOX2 e aumento dos níveis da proteína βIII-tubulina, marcadores de multipotência e diferenciação, respetivamente. Notavelmente, este composto demonstrou capacidade na redução do estado de indiferenciação em células cancerígenas de glioma (GI-261), através da redução dos níveis proteicos de SOX2.

Palavras-chave: células estaminais neurais, diferenciação, MDM2, p53, spiropirazolina oxindole.

Abstract

In more than 50% of human cancers, the TP53 gene is mutated or deleted whereas in cancers with wild type p53, this protein function is inactivated by the overexpression of its negative regulator, such as murine double minute 2 (MDM2). Thus, targeting the p53-MDM2 interaction to reactivate p53 has emerged as a promising new cancer therapeutic strategy.

In addition to the well-established role of p53, it has been shown to play a key role in differentiation process in several cell types. In fact, p53 inhibits the carcinogenic potential of stem cells by promoting the process of cell differentiation, including neurogenesis.

Several families of spirooxindoles have been designed to inhibit the p53-MDM2 interaction, but despite this, the effect of these compounds on the regulation of differentiation and consequent regulation of malignant tumor phenotype has never been explored. Therefore, in this thesis, a new library of spiropyrazoline oxindoles was synthesized in order to discover new reactivators of p53 with potential of inducing cell differentiation.

Firstly, a screening study on HTC116 p53^(+/+) and HTC116 p53^(-/-) was performed to evaluate the compound cytotoxicity/selectivity to p53 and, after this, evaluate their differentiation potential in neural stem cells (NSCs).

A spiropirazole oxindole **11a** was identified as a promising and selective molecule, presenting an IC₅₀ of 25 μ M. The selectivity for carcinogenic cell lines with p53 and the non-induction of high cytotoxicity in this cell line suggested a great potential of this compound in the induction of differentiation in NSCs. In fact, our data have shown that this compound induced NSC differentiation through reduction of SOX2 and increase of β III-tubulin levels, markers of multipotency and differentiation, respectively. More importantly, the same compound showed the ability to reduce stemness in glioma cancer cells (GI-261), by reducing SOX2 protein levels.

Key-words: differentiation, MDM2, neural stem cells, p53, spiropyrazoline oxindole.

Índice

Agradecimentos.....	v
Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
Índice de figuras.....	xiii
Índice de tabelas.....	xvii
Índice de esquemas.....	xix
Lista de abreviaturas.....	xxi
1. Introdução.....	1
1.1 Tumorigénese.....	1
1.2 Ciclo celular, p53 e tumorigénese.....	3
1.3 Células estaminais, células cancerígenas e células estaminais cancerígenas.....	4
1.3.1 Células estaminais neurais.....	6
1.3.2 p53 e células estaminais.....	7
1.4 Regulação da p53.....	10
1.5 Inibidores da interação p53-MDM2.....	11
1.5.1 Nutlinas.....	11
1.5.2 Piperidonas.....	12
1.5.3 Benzodiazepinadinonas.....	13
1.5.4 Spirooxindóis.....	14
2. Resultados e Discussão.....	18
2.1 Spiropirazolina oxindole: desenho e síntese.....	18
2.2 Estudos de estabilidade em DMSO.....	23
2.3 Estudos de estrutura/atividade na linha celular HCT116.....	25
2.4 Viabilidade e diferenciação em células estaminais neurais NSCs.....	29
2.5 Viabilidade e diferenciação em GI-261.....	36
3. Conclusões e perspectivas futuras.....	38
4. Materiais e métodos.....	40
4.1 Procedimento geral para síntese das 3-metilenoindolinonas 7a-j	40
4.2 Procedimento geral para a síntese dos cloretos de hidrazonilo 8a-c	43
4.3 Procedimento geral para a síntese das spiropirazolina oxindóis 11a-u	44
4.4 Biologia.....	60
4.4.1 Ensaio de viabilidade.....	61
4.4.2 Extração de proteínas totais.....	62
4.4.3 Western blot.....	63
4.4.4 Análise estatística.....	64
5. Bibliografia.....	65

Índice de figuras

Figura 1.1 – Células gliais incluem vários tipos de células diferentes todas elas dando origem a diferentes tipos de tumores, denominados gliomas (imagem adaptada de 7).....	2
Figura 1.2 – Sinais de stress que ativam a p53 e suas respostas reguladoras de processos celulares (imagem adaptada de 12)	4
Figura 1.3 – Tratamento tumoral com métodos convencionais e com terapia específica para CECs (imagem adaptada de 15)	5
Figura 1.4 – Processo de diferenciação celular mediado pela proteína p53 e consequentes alterações nos níveis proteicos de SOX2 e β III-tubulina.....	9
Figura 1.5 – Mecanismo de autorregulação da p53 e MDM2. A ativação da p53 aumenta a transcrição de MDM2 que, por sua vez, inibe a p53 (imagem adaptada de 34)	10
Figura 1.6 – Estrutura cristalina da MDM2 complexada com a p53. Os aminoácidos Phe19, Trp23 e Leu26 da p53 são essenciais na ligação à MDM2 (imagem adaptada de 34)	11
Figura 1.7 – Nutlinas que mostraram capacidade em inibir a interação p53-MDM2.....	12
Figura 1.8 – Derivado de piperidona AMG 232 com capacidade de inibir a interação p53-MDM2.....	13
Figura 1.9 – Composto 1 com capacidade de inibir a interação p53-MDM2.....	13
Figura 1.10 – Exemplos de oxindóis presentes na natureza.....	14
Figura 1.11 – Otimização da spirooxindole 2 dando origem à spirooxindole 3 com capacidade de inibir a interação p53-MDM2.....	14
Figura 1.12 – Spirooxindóis resultantes de sucessivas otimizações. MI-77301 está neste momento em ensaios clínicos.	15
Figura 1.13 – Mais recente spirooxindole publicado e em ensaios clínicos.....	16
Figura 1.14 – Spiroisoxazolina 5 com IC_{50} de $26,56 \pm 1,07 \mu M$ em HCT116.....	16
Figura 1.15 – Otimização do anel de 5 membros de isoxazolina para pirazolina.....	17
Figura 1.16 - Spiropirazolina 6 com capacidade de inibir a interação p53-MDM2.....	17
Figura 2.1 – Otimização do núcleo de indole.....	18
Figura 2.2 – Espectro de RMN de 1H do composto 11b	22
Figura 2.3 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto 11b	23
Figura 2.4 – Espectro de RMN de 1H do composto 11a	24
Figura 2.5 – Espectro de RMN de 1H do composto 11a após 4 dias da realização do primeiro espectro.....	24
Figura 2.6 – Sobreposição dos dois espectros das figuras 2.4 e 2.5.....	25
Figura 2.7 – Spiropirazolininas oxindóis sintetizadas 11a-u	28

Figura 2.8 – Consequências das otimizações feitas nas spiropirazolinias oxindóis.....	29
Figura 2.9 – Avaliação da viabilidade celular por MTS em NSCs em condições auto-renovação (A) ou em processo de diferenciação (B), após 24 e 48 horas de incubação com 5, 12,5 ou 25 μ M com o composto 11a . O DMSO foi utilizado como controlo (fold change=1). Os dados representam a média \pm SEM de três experiências independentes.....	30
Figura 2.10 – Efeito do composto 11a , às concentrações de 12,5 e 25 μ M, nos níveis proteicos de SOX2 das NSCs em condições de auto-renovação (A) ou em processo de diferenciação (B). Níveis de SOX2 quantificados a partir do isolamento de proteínas totais de NSCs depois de 24 e 48 horas de incubação com o composto. O DMSO foi utilizado como controlo (fold change=1) e normalização feita com <i>ponceau</i> . Dados representam a média \pm SEM de seis experiências independentes. * p <0.05.....	32
Figura 2.11 – Efeito do composto 11a , às concentrações de 12,5 e 25 μ M, nos níveis proteicos de p53 das NSCs em condições de auto-renovação (A) ou em processo de diferenciação (B). Níveis de p53 quantificados a partir do isolamento de proteínas totais de NSCs depois de 24 e 48 horas de incubação com o composto. O DMSO foi utilizado como controlo (fold change=1) e normalização feita com <i>ponceau</i> . Dados representam a média \pm SEM de seis experiências independentes. ** p <0.01.....	33
Figura 2.12 – Efeito do composto 11a , às concentrações de 12,5 e 25 μ M, nos níveis proteicos de Bax das NSCs em condições de auto-renovação (A) ou em processo de diferenciação (B). Níveis de Bax quantificados a partir do isolamento de proteínas totais de NSCs depois de 24 e 48 horas de incubação com o composto. O DMSO foi utilizado como controlo (fold change=1) e normalização feita com <i>ponceau</i> . Dados representam a média \pm SEM de seis experiências independentes. * p <0.05.....	34
Figura 2.13 – Avaliação da viabilidade celular por MTS em GI-261 após 24 de incubação com 5, 12,5 e 25 μ M do composto 11a . O DMSO foi utilizado como controlo (fold change=1). Os dados representam a média \pm SEM de três experiências independentes.....	35
Figura 2.14 – Efeito do composto 11a , às concentrações de 12,5 e 25 μ M, nos níveis das proteínas SOX2 (A) β III-tubulina (B). Níveis proteicos quantificados a partir do isolamento de proteínas totais de células de glioma (GI261) depois de 24 horas de incubação com o composto. O DMSO foi utilizado como controlo e normalização feita com <i>ponceau</i> . Dados representam a média \pm SEM de três experiências independentes.....	36

Figura 2.15 – Efeito do composto **11a**, às concentrações de 12,5 e 25 μM , nos níveis das proteínas SOX2 (**A**) β III-tubulina (**B**). Níveis proteicos quantificados a partir do isolamento de proteínas totais de células de glioma (GI261) depois de 24 horas de incubação com o composto. O DMSO foi utilizado como controle e normalização feita com *ponceau*. Dados são a média \pm SEM de três experiências independentes.....37

Índice de tabelas

Tabela 2.1 - 3-metilenoindolinonas 7a-7j sintetizadas.....	19
Tabela 2.2 – Cloretos de hidrazonilo 8a-8c sintetizados.....	20
Tabela 2.3 - Spiropirazolina oxindóis 11a-11u sintetizadas.....	21
Tabela 2.4 - Avaliação da viabilidade celular após 72 horas de incubação com o compostos 11a-u , com as concentrações de 12,5 e 25 μ M usando o ensaio de viabilidade MTS. Controlo feito com DMSO. Os dados representam a média dos triplicados de uma experiência. ^a Linha celular HCT116 p53 ^(+/+) ; ^b Linha celular HCT116 p53 ^(-/-)	26
Tabela 4.1 – Caracterização geral das linhas celulares utilizadas	60
Tabela 4.2 – Anticorpos primários utilizados no Western Blot.....	64

Índice de esquemas

Esquema 2.1 – Mecanismo da síntese das 3-metilenoindolinonas 7a-j	19
Esquema 2.2 – Mecanismo da síntese dos cloretos de hidrazonilo 8a-c	20
Esquema 2.3 – Mecanismo da síntese das spiropirazolina oxindóis e respetivo regioisómero formado 11a-u	21
Esquema 4.1 - Procedimento geral a para síntese das 3-metilenoindolinonas 7a-j	40
Esquema 4.2 - Procedimento geral para a síntese dos cloretos de hidrazonilo 8a-c	43
Esquema 4.3 – Procedimento geral para a síntese das spiropirazolina oxindóis 11a-u	44
Esquema 4.4 – Diagrama de plaqueamento celular e incubação das linhas celulares HCT116 e GI-261.....	61
Esquema 4.5 – Diagrama de plaqueamento celular e incubação das NSCs.....	62

Lista de abreviaturas e símbolos:

δ - Desvio químico

% (v/v) – Percentagem volume/volume

ADN – Ácido desoxirribonucleico

Bax – Proteína X associada à Bcl-2

BiFC – Ensaio de complementação de fluorescência biomolecular

BSA – Soro de albumina de bovino

CEC – Célula estaminal cancerígena

DMEM – Meio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO – Dimetilsulfóxido

DTT – Ditioneitol

EGF – Fator de crescimento epidermal

Et₃N – Trietilamina

EtOAc – Acetato de etilo

FBS – Soro de bovino fetal

FGF – Fator de crescimento de fibroblastos

GI-261 – Linha celular 261 de glioma de rato

His – Histidina

HCT116 – Linha celular de cancro colo-retal

HCT116 p53^(-/-) – Linha celular de cancro colo-retal com p53 silenciado

HCT115 p53^(+/+) – Linha celular de cancro colo-retal com p53 na sua forma selvagem

Hz – Hertz

IC₅₀ – 50% da concentração inibitória máxima

JAR – Linha celular de coriocarcinoma humano

kDa – KiloDalton

Leu – Leucina

LNCaP – Linha celular de carcinoma humano

MCF-7 – Linha celular de adenocarcinoma humano

MDM2 – Murine double minute-2

MTS – [3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H tetrazolio]

NSC – Célula estaminal neural

PBS – Tampão fosfato salino

Ph – Fenilo

Phe – Fenilalanina

ppm – Partes por milhão

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SEM – Erro padrão da média

SJSA-1 – Linha celular de osteossarcoma humano

SOX2 – Região determinante do sexo Y – zona 2

Trp – Triptofano

TP53 – Gene que codifica a proteína p53

1. Introdução

1.1 Tumorigénese

A morte celular geneticamente programada, ou apoptose, é um processo vital para o bom desenvolvimento e funcionamento dos organismos multicelulares. Ao eliminar as células redundantes ou danificadas, a apoptose mantém a homeostase dos tecidos sendo o controlo deste processo essencial, uma vez que um nível elevado de morte celular pode contribuir para condições degenerativas e um nível reduzido de morte celular pode conduzir à tumorigénese. Assim, os tumores são originados pelo crescimento celular descontrolado ou redução dos níveis fisiológicos de morte celular, causado por aberrações genéticas.¹

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, o cancro é a segunda principal causa de morte em todo o mundo e representou 8,8 milhões de mortes em 2015.² Evitando fatores de risco importantes, como por exemplo, o consumo de álcool, o sedentarismo ou o consumo de tabaco, poderiam ser evitadas entre 30 a 50% das mortes causadas por cancro.

O tratamento tumoral reside essencialmente na radioterapia e na quimioterapia, sendo a radioterapia um tipo de tratamento no qual se faz incidir altas doses de radiação no local do tumor, danificando as células cancerígenas e levando-as à morte. É um tratamento indolor e os efeitos colaterais normalmente são limitados à área do corpo exposta à radiação, como por exemplo, irritação da pele.³

Na quimioterapia, são utilizados medicamentos anti-neoplásicos. Existem vários medicamentos utilizados na quimioterapia e a sua escolha varia em cada caso, dependendo de muitos fatores como o tipo de tumor, o seu estágio ou a idade do doente. A dose administrada a cada doente também deverá ser ajustada em função do seu estado nutricional, do funcionamento renal ou da necessidade de administração de outro medicamento.³

Os medicamentos utilizados na quimioterapia atuam interferindo na estrutura e função do ácido desoxirribonucleico (ADN) levando à morte das células cancerígenas, no entanto, devido à sua baixa seletividade, estes medicamentos demonstram também ter efeito citotóxicos e mutagénicos em células não cancerígenas.⁴

Em alguns casos, nos quais as células cancerígenas se propaguem para outros órgãos, além do órgão onde o tumor se originou, podem ser utilizadas as duas terapias em conjunto.³

Quando os tumores se encontram numa fase avançada, um dos tipos de tumor tratados com as duas terapias em conjunto é o cancro colo-retal. Este é, de facto, um dos tumores com maior incidência e mortalidade em Portugal e na Europa, sendo que, em 2012, era a segunda forma de tumor mais letal na Europa, afetando igualmente mulheres e homens.⁵ A maioria dos tumores

colo-retais começam com um crescimento anormal, chamado pólipos, no revestimento interno do cólon e, dependendo do seu tipo, apenas alguns pólipos podem dar origem ao tumor.

Existem dois tipos de pólipos: adenomas e pólipos inflamatórios, sendo que os adenomas são o tipo de pólipos que podem conduzir ao cancro colo-retal e, por isso, são designados pré-cancerígenos, enquanto que os pólipos inflamatórios são mais comuns, mas, normalmente, não são pré-cancerígenos.³

Outro tipo de tumor é denominado de glioma, que abrange todos os tumores primários do sistema nervoso central de origem em células gliais (Figura 1.1). As células gliais incluem células endimárias, oligodendrócitos e astrócitos, todas derivadas do mesmo progenitor de origem glial, enquanto que os microglíocitos derivam de células estaminais mesenquimais.^{6,7}

Quanto às células endimárias, essas revestem os espaços ventriculares no cérebro e o canal central da medula espinhal e ajudam a regular a difusão do líquido cefalorraquidiano podendo dar origem a tumores conhecidos como endimomas.

Os oligodendrócitos cercam o axónio de cada neurónio com uma bainha de mielina para aumentar a eficiência da condução de impulsos elétricos ao longo do neurónio. Os oligodendrócitos podem dar origem a tumores chamados oligodendrogliomas.

Por último, os astrócitos são as células gliais que fornecem nutrição aos neurónios podendo originar tumores designados astrocitoma.⁷

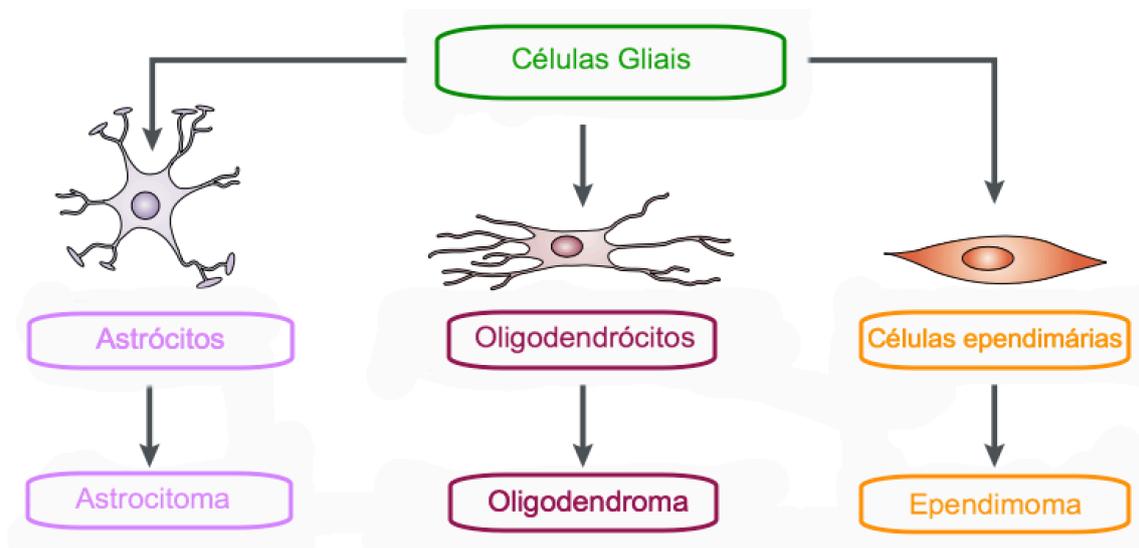


Figura 1.1 – Células gliais incluem vários tipos de células diferentes, as quais podem dar origem a diferentes tipos de tumores, denominados gliomas (imagem adaptada de 7).

1.2 Ciclo celular, p53 e tumorigénese

A divisão celular consiste em dois processos consecutivos, caracterizados principalmente por replicação do ácido desoxirribonucleico (ADN) e segregação dos cromossomas replicados em duas células separadas, denominando-se mitose e interfase, respetivamente.

O processo mitótico inclui prófase, metafase, anafase e telofase. Quanto à interfase, esta inclui ainda as fases G1, S e G2 onde a replicação do ADN ocorre na fase S da interfase sendo esta precedida pela fase G1, durante a qual a célula se prepara para a síntese do ADN. A fase G1 é seguida pela fase G2, na qual a célula se prepara para a mitose.⁸ Estas fases, G1 e G2, funcionam como pontos de controlo, de maneira a que a célula consiga garantir que avança para a próxima fase sem qualquer erro genético.

Na tumorigénese, aparecem alterações fundamentais no controlo genético da divisão celular, resultando numa proliferação celular descontrolada. As mutações ocorrem principalmente em duas classes de genes: proto-oncogenes e genes supressores de tumores. Nas células não-cancerígenas, as proteínas codificadas pelos proto-oncogenes atuam em diferentes níveis ao longo do processo que estimula a proliferação celular. Assim, versões mutadas de proto-oncogenes podem promover o crescimento tumoral.

A inativação ou mutação em genes supressores de tumores, como o TP53, resulta na disfunção de proteínas que normalmente inibem a progressão do ciclo celular, causando uma proliferação celular descontrolada e à tumorigénese.⁸

A p53 é uma proteína supressora de tumores, que responde a diversos sinais de stress e orchestra respostas celulares específicas, incluindo a paragem do ciclo celular, a senescência celular e a apoptose, que são processos associados à supressão tumoral (Figura 1.2).

A importância da proteína p53 na supressão tumoral é inequívoca, uma vez que mais de 50% dos tumores humanos apresentam mutações ou a deleção no gene que codifica a p53 (TP53) e pela suscetibilidade à tumorigénese em indivíduos com síndrome de Li-Fraumeni (herdam alelo mutante TP53). Estes tumores têm características mais malignas, como baixos níveis de diferenciação celular, a instabilidade genética e o aumento da invasividade e potencial metastático.^{9;10}

A atividade bioquímica melhor caracterizada da p53 é a de fator de transcrição, possuindo, tal como outros fatores de transcrição, domínios responsáveis pela ligação a uma sequência específica de ADN. Mais de 80% das mutações no gene TP53 localizam-se no domínio de ligação ao ADN e comprometem a ligação da p53 ao ADN, o que sugere que a função da p53 como fator de transcrição é, de fato, crucial para a supressão tumoral.^{11;12}

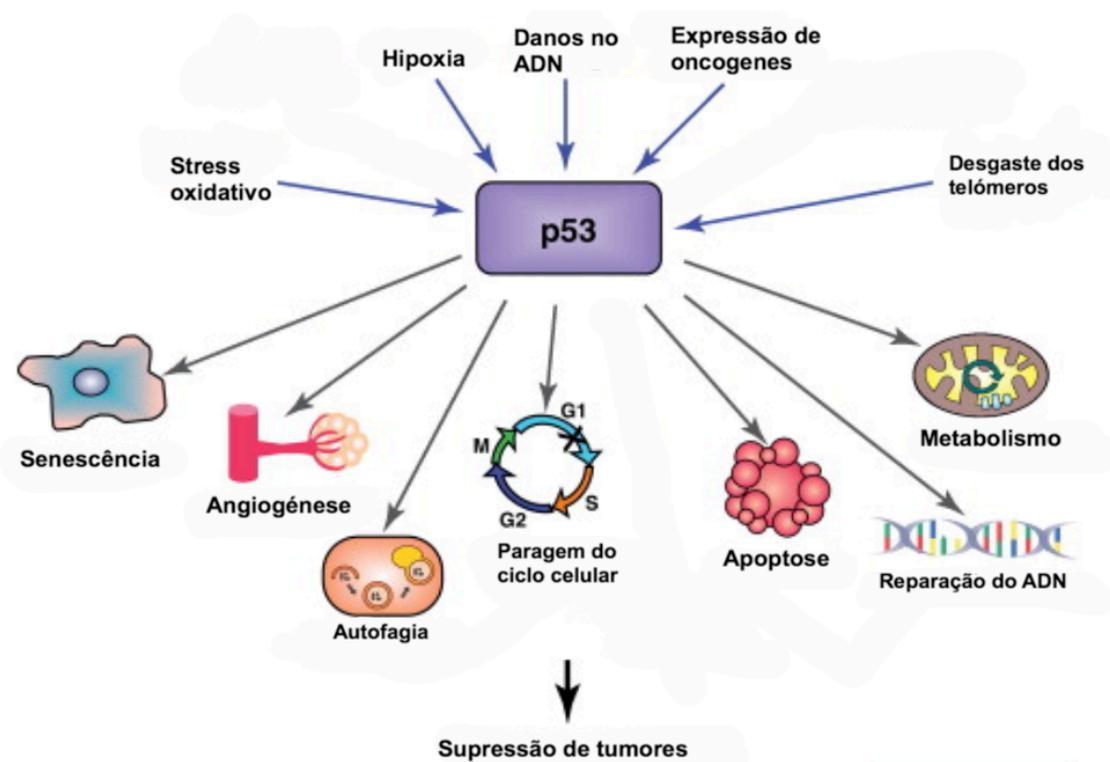


Figura 1.2 – Sinais de stress que ativam a proteína p53 e as suas vias de sinalização celulares (imagem adaptada de 12).

1.3 Células estaminais, células cancerígenas e células estaminais cancerígenas

As células estaminais reúnem a capacidade de perpetuar a sua linhagem, dando origem a células diferenciadas e interagir com seu ambiente para manter um equilíbrio entre quiescência, proliferação e auto-renovação.^{13;14}

À medida que foram realizadas descobertas sobre as características das células estaminais e células cancerígenas, foram sendo expostas evidências que relacionavam semelhanças biológicas nos dois tipos celulares. Na verdade, três destas evidências são as semelhanças nos mecanismos que regulam a auto-renovação de células estaminais e das células cancerígenas, a possibilidade de que células cancerígenas possam surgir de células estaminais e a noção de que os tumores podem conter células estaminais cancerígenas (CECs), células raras que se conseguem auto-renovar, lideram a formação e o crescimento tumoral e são responsáveis pela resistência às terapias convencionais.¹³

Uma das questões mais importantes na biologia das células estaminais é a compreensão dos mecanismos que regulam o seu potencial de auto-renovação e de diferenciação, uma vez que estes processos são cruciais para a função das células estaminais ao longo de toda a vida. Por outro lado, a compreensão da regulação da auto-renovação das células estaminais pode ser fundamental para a compreensão da regulação da proliferação de células cancerígenas. Enquanto que as células estaminais utilizam as características referidas anteriormente quando participam na homeostase do tecido, as CECs comportam-se como equivalentes malignos, exibindo estabilidade em várias circunstâncias, incluindo a manutenção da progressão do tumor (Figura 1.3) e a interação com o meio ambiente em busca de fatores-chave de sobrevivência.¹⁴

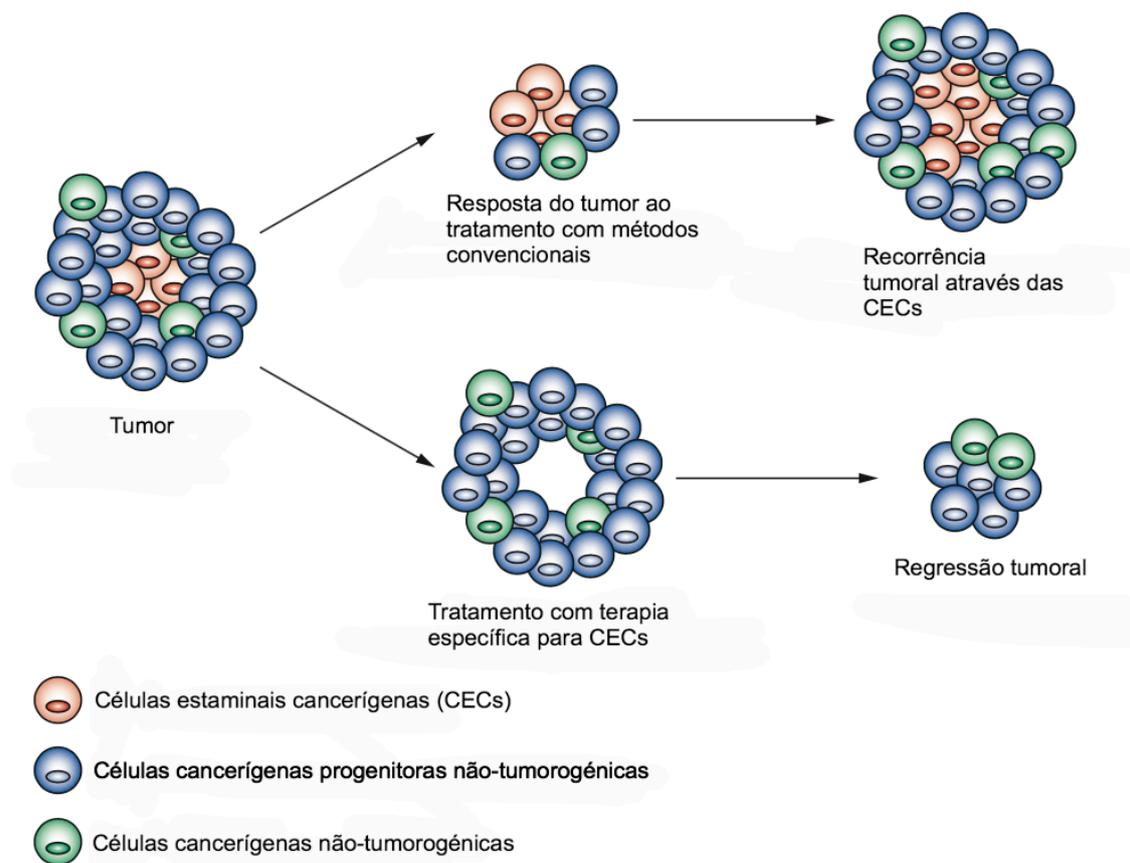


Figura 1.3 – Tratamento tumoral com métodos convencionais e com terapia específica para CECs (imagem adaptada de 15)

Um aspeto muito importante nas células estaminais é o equilíbrio entre os processos de auto-renovação e a diferenciação. A manipulação deste equilíbrio tem sido estudada e, em 2004, constatou-se que a p53 tinha um papel importante na diferenciação de células estaminais embrionárias de rato. De fato, a exposição das células a radiação ultravioleta por quatro horas, induziu um aumento de p53 nas células, mas estas não seguiram um caminho apoptótico,

verificando-se uma diminuição nos níveis de *Nanog* que é um fator de transcrição envolvido na auto-renovação das células estaminais. O mesmo não aconteceu quando realizado o mesmo estudo em células estaminais com o gene TP53 silenciado o que levou à conclusão que a p53 tem um papel na regulação da transcrição de proteínas chave na auto-renovação e, conseqüentemente, na diferenciação celular.¹⁶

1.3.1 Células estaminais neurais (NSCs)

As células estaminais neurais (NSCs) são as células mais primordiais do sistema nervoso capazes de gerar qualquer tipo de neurónio do sistema nervoso central durante o desenvolvimento e ao longo da vida, sendo também fonte de células gliais, como astrócitos e oligodendrócitos e por isso, são consideradas células multipotentes.^{17;18} Os neurónios, componentes funcionais do sistema nervoso, são responsáveis pelo processamento e transmissão da informação, enquanto as células gliais suportam a neurotransmissão e isolam os axónios para acelerar os processos elétricos da comunicação celular.¹⁹

No sistema nervoso adulto, estas células encontram-se em zonas específicas chamadas nichos neurogénicos. Um nicho é definido como um microambiente que abriga anatomicamente as NSCs e controla funcionalmente o seu desenvolvimento *in vivo*, regulando a quiescência, a auto-renovação, bem como a diferenciação destas células. Estes nichos neurogénicos são compostos por vários componentes, incluindo as próprias NSCs, a matriz extracelular e canais externos provenientes de fontes distantes de dentro ou fora do tecido.²⁰ No embrião, as NSCs e os seus nichos existem apenas por períodos relativamente breves, à medida que o cérebro se desenvolve. Por outro lado, no cérebro adulto, as NSCs e os seus nichos são mantidos em regiões restritas ao longo da vida.²¹

A neurogênese é um processo neurobiológico complexo pelo qual os neurónios funcionais são gerados a partir das NSCs e tem sido observada em duas principais regiões do cérebro adulto: na zona subgranular do giro dentado (SGZ) do hipocampo e na zona subventricular dos ventrículos laterais (SVZ). Ao longo da vida, as células nascidas na SVZ migram para o bulbo olfatório através do fluxo migratório rostral, onde se diferenciam em interneurónios (neurónios que possibilitam a comunicação entre neurónios e o sistema nervoso central). Os neurónios do hipocampo, nascem localmente na SGZ e migram para o giro dentado do hipocampo.^{22;23}

Para melhorar as terapias de neuroregeneração, é necessário levar em conta muitas questões, como por exemplo, as diferenças entre os microambientes dos sistemas nervosos centrais, uma vez que o microambiente recém-formado pode não fornecer as condições corretas essenciais para a sobrevivência e diferenciação celular. Por outro lado, a incapacidade de migração das células até às zonas das lesões, que podem estar longe do local onde é feito o transplante celular, é outro grande problema.

1.3.2 p53 e células estaminais

Uma vez que a auto-renovação e a diferenciação de células estaminais podem contribuir para distúrbios hiperproliferativos, um controlo rígido da auto-renovação e diferenciação das células estaminais é fundamental para a manutenção da homeostase nos tecidos e órgãos. A proteína p53 contribui para esse controlo, regulando a proliferação, auto-renovação e diferenciação das células estaminais embrionárias e adultas e, com o crescente interesse na biologia das células estaminais nos últimos anos, esta função da p53 ganhou significativamente mais atenção.

A proteína p53 representa uma força motriz importante para a diferenciação de células estaminais devido ao fato da diferenciação espontânea de células estaminais ser significativamente reduzida quando os níveis de p53 diminuem.²⁴ Além da supressão da transcrição do gene *Nanog*, já referida anteriormente, a p53 mostra também a capacidade de se ligar ao promotor do gene que transcreve a proteína Oct4 sendo esta, a par da *Nanog*, um marcador de pluripotência pois é essencial para a manutenção do estado indiferenciado das células estaminais.¹⁶

Outras evidências quanto à importância da p53 na diferenciação surgiram da análise da diferenciação mediada pelo ácido retinóico. O tratamento com este ácido é um método amplamente utilizado para diferenciar células estaminais em cultura suprimindo, também, a transcrição de *Nanog*. No entanto, quando utilizado o tratamento com o ácido retinóico em células com o gene TP53 silenciado, a supressão da transcrição de *Nanog* não foi tão evidente, indicando que a p53 desempenha um papel fulcral na diferenciação celular mediada pelo ácido retinóico.¹⁶

Nas células estaminais neurais (NSCs), a primeira indicação de que a p53 poderia regular a sua auto-renovação ocorreu quando o gene que a codifica foi silenciado, observando-se nos ratos *knockout* para o gene p53 (p53 KO), um crescimento celular excessivo no cérebro.²⁵ Comparando os ratos *wild-type* (Wt) e p53 KO, notou-se um aumento na auto-renovação celular

nas regiões SVZ dos ratos p53 KO. Estas observações sugerem que a p53 é um regulador negativo da auto-renovação das NSCs.

Assim como nas células estaminais, a p53 é um fator importante na diferenciação das NSCs onde existem dois processos celulares inter-relacionados: progressão dos estágios do crescimento de neurites e paragem do ciclo celular.²⁶ Utilizando culturas primárias de neurónios de ratos, demonstrou-se que, durante a diferenciação, a p53 é transportada para o núcleo, enquanto que nas células maduras diferenciadas, está presente principalmente no citoplasma. A inibição da atividade da p53, pela introdução de uma proteína reguladora da mesma, inibiu a diferenciação dos neurónios primários sugerindo que a p53 desempenha um papel regulador na direção de neurónios primários para a diferenciação.²⁶

No momento em que o processo de diferenciação neural ocorre, a atividade da p53 aumenta.²⁷ Também em culturas de NSCs, a expressão de p53 aumenta durante a diferenciação, o que pode ter origem numa regulação positiva gradual da proteína responsável pela paragem do ciclo celular, p19Arf, uma vez que este se liga ao domínio central do regulador negativo da p53, *murine double minute 2* (MDM2) e inibe a degradação da p53 mediada por MDM2. Neste caso, ocorre, assim, uma acumulação de p53 na célula de uma maneira dependente da dose de p19Arf.²⁸ De fato, foi demonstrado que as NSCs em estágio inicial, expressam baixos níveis de p19Arf e mantêm uma elevada capacidade de auto-renovação enquanto que, NCSs em estágio tardio, têm uma menor capacidade de auto-renovação e diferenciam-se em células gliais. Além disto, a indução da diferenciação nas NSCs leva à fosforilação da p53 na serina 15 e aumenta a sua atividade de ligação ao ADN.²⁹

Foi também observado que a desmetilase da lisina 27 da histona 3 (JMJD3) induz a expressão de p19Arf que, por sua vez, estabiliza a p53. Posto isto, os resultados obtidos no estudo mostraram que, numa fase inicial da diferenciação, há aumento de JMJD3 que coincide também com o aumento de p53, mostrando, novamente, evidências quanto ao papel da p53 na diferenciação e, neste caso, da JMJD3 como estabilizadora da p53.³⁰

O processo de diferenciação celular pode ser estudado através da avaliação dos níveis de proteínas características de diferentes estados de diferenciação como por exemplo, as proteínas (*sex determining region Y*)-*box 2* (SOX2) e β III-tubulina (Figura 1.4). A proteína SOX2 é um fator de transcrição essencial para a manutenção da capacidade de auto-renovação, pluripotência e multipotência e, por isso, é um marcador de indiferenciação, enquanto que a proteína β III-tubulina é um microtúbulo encontrado quase exclusivamente nos neurónios e, por isso, é um marcador de diferenciação.

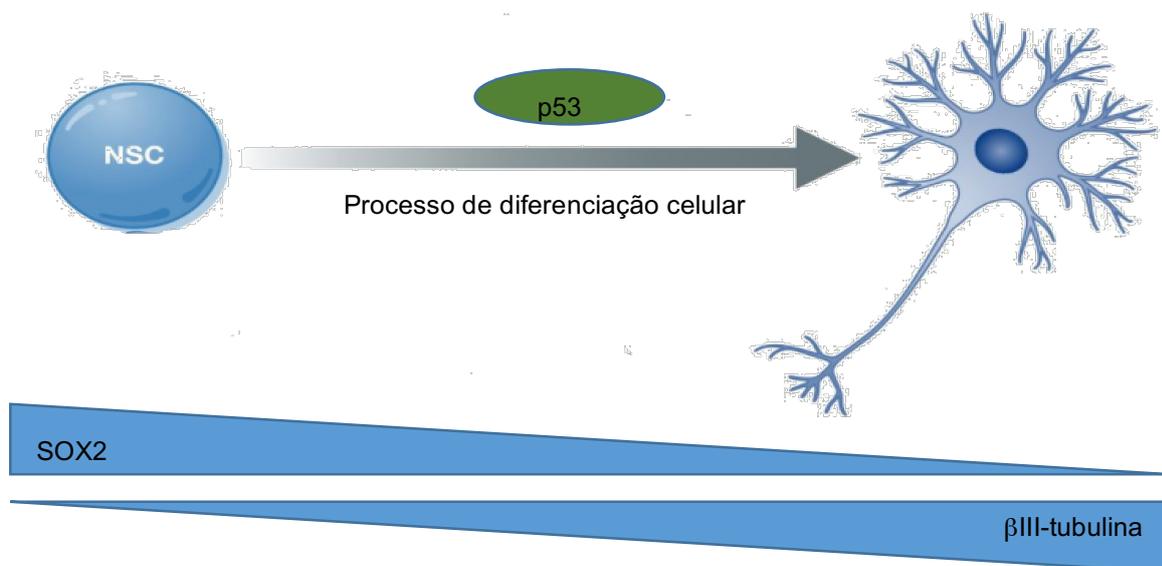


Figura 1.4 – Processo de diferenciação celular mediado pela proteína p53 e consequente alterações nos níveis proteicos.

No lado oposto à indução da diferenciação, as células somáticas podem ser reprogramadas em células pluripotentes por indução de sobre-expressão de combinações de diferentes fatores de pluripotência.

Em 2006, foram criadas as primeiras células pluripotentes induzidas (iPSCs) através da sobre-expressão de oct4, sox2, klf4 e c-myc em fibroblastos adultos e embrionários.³¹ No entanto, a tendência destas células induzirem transformações malignas através da sobre-expressão de proto-oncogenes, suscitam dúvidas sobre a aplicabilidade clínica dessa abordagem.

A reprogramação ocorre apenas numa percentagem muito pequena de células transfetadas, sugerindo a existência de barreiras de reprogramação. Uma vez que a diminuição dos níveis de p53 foram observados em iPSCs, assumiu-se que a p53 pode desempenhar um papel repressor no processo de reprogramação de células somáticas, confirmando-se este fato quando a diminuição dos níveis de p53 por (*small interfering RNA*) siRNA levou a uma melhoria drástica da eficiência na formação das iPSCs.^{31;32}

Embora a supressão da p53 possa parecer ser uma maneira viável de melhorar a eficiência da reprogramação, a sua supressão permanente poderá interferir na regulação celular, permitindo a continuidade do crescimento celular com lesões permanentes no ADN.

1.4 Regulação da p53

Como referido anteriormente, em mais de metade dos tumores humanos, a p53 está inativa devido a uma mutação ou deleção no gene que a codifica. Nos restantes casos de tumores humanos, que têm a p53 ativa, existe uma sobre-expressão dos reguladores negativos da p53, tais como a *murine double minute 2* (MDM2).³³

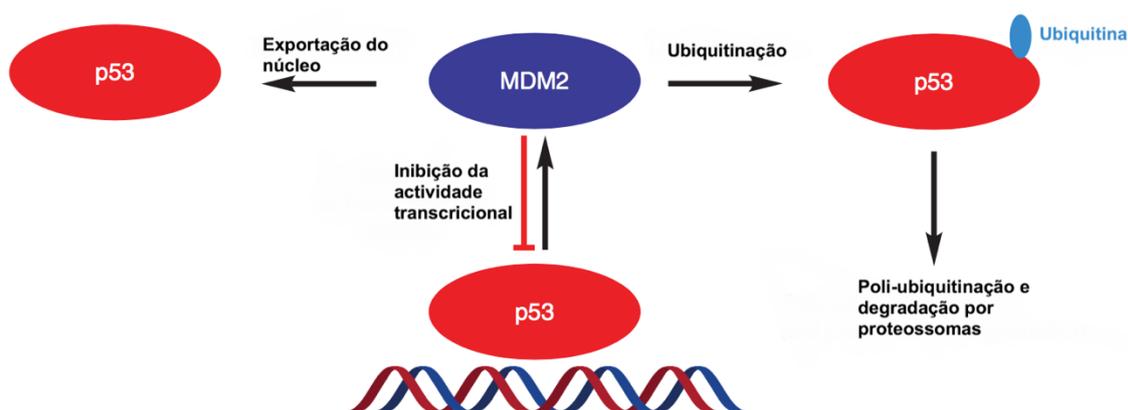


Figura 1.5 – Mecanismo de autorregulação da p53 e MDM2. A ativação da p53 aumenta a transcrição de MDM2 que, por sua vez, inibe a p53 (imagem adaptada de 34).

A MDM2 e a p53 regulam-se mutuamente através de um mecanismo de *feedback* negativo (Figura 1.5). Em células com a p53 ativa, quando sujeitas a determinados estímulos, a p53 transcreve o gene que codifica a MDM2, levando a um aumento nos níveis deste inibidor que, por sua vez, se liga à p53 através do seu terminal amino e inibe a sua função através de três mecanismos principais: ubiquitinação através da sua atividade de ligase E3, promovendo a sua degradação por proteossomas; interação p53-MDM2 bloqueia a capacidade da p53 se ligar ao ADN, tornando-a ineficaz como fator de transcrição; exportação da p53 para fora do núcleo da célula, tornando-a inacessível ao ADN.³⁴

Em 1996, determinou-se a estrutura cristalina da MDM2 complexada com a p53, fornecendo assim, os detalhes da interação p53-MDM2, surgindo assim, a possibilidade de desenho de inibidores desta interação. Especificamente, a estrutura cristalina mostra que a p53 adota uma configuração α -helicoidal e interage com a MDM2 principalmente através de três resíduos hidrofóbicos, Phe19, Trp23 e Leu26,³⁵ que se agrupam num bolso hidrofóbico bem definido (Figura 1.6). Atualmente já foram descobertos novos aminoácidos importantes na interação p53-

MDM2, como a Leu22 e a His96³⁴ e a investigação de novos inibidores da interação é alvo de grande estudo quer na academia, quer na indústria farmacêutica.

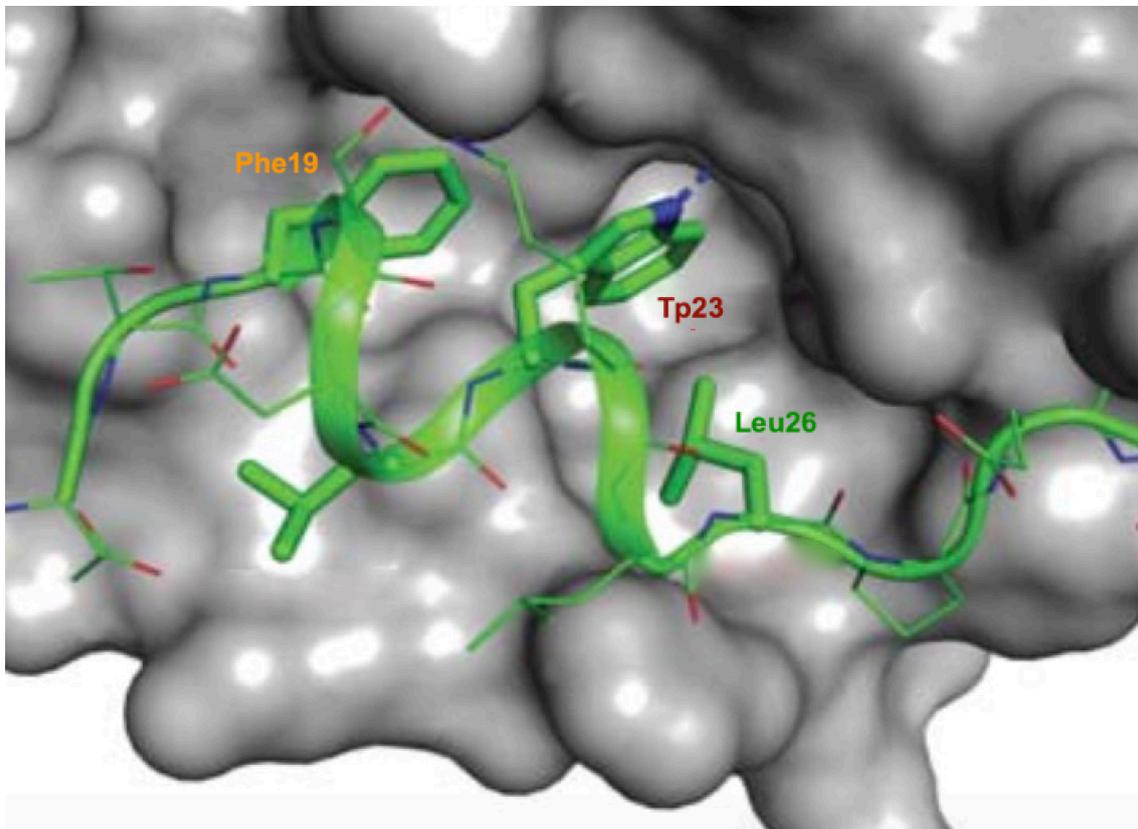


Figura 1.6 – Estrutura cristalina da MDM2 complexada com a p53. Os aminoácidos Phe19, Trp23 e Leu26 da p53 são essenciais na ligação à MDM2 (imagem adaptada de 34).

1.5 Inibidores da interação p53-MDM2

1.5.1 Nutlinas

Apesar da investigação feita em laboratórios académicos e/ou empresas farmacêuticas, o desenho de moléculas não-peptídicas específicas para a inibição da interação p53-MDM2, com um mecanismo de ação bem definido, provou ser muito mais difícil do que o previsto inicialmente. O primeiro avanço ocorreu em 2004, com a descoberta das nutlinas pela empresa farmacêutica Hoffman-La Roche.³⁶ Entre as nutlinas desenvolvidas inicialmente, foi a **Nutlin-3a** (Figura 1.7) que mostrou uma atividade mais promissora com um IC₅₀ de 1,5 µM na linha celular SJS-1 e uma constante de afinidade de ligação para a MDM2 de 90 nM apresentando, assim, um mecanismo de ação consistente inibindo a interação p53-MDM2.

A estrutura cristalina da **Nutlin-2** (análogo da **Nutlin-3a**) complexada com a MDM2 mostrou claramente que as nutlinas mimetizam os três principais locais de ligação da p53 à MDM2 (Phe19, Trp23 e Leu26).

Otimizações feitas na **Nutlin-3a** para melhorar a sua afinidade de ligação à MDM2, citotoxicidade, farmacocinética e estabilidade química resultaram na descoberta de **RG7112** (RO5045337), o primeiro inibidor da interação a chegar a ensaios clínicos (Figura 1.7).³⁷ O **RG7112** apresentou melhorias em relação à **Nutlin-3a**, tendo uma constante de afinidade de ligação para a MDM2 de 18nM e um IC₅₀ com uma média de 0,4μM em linhas celulares cancerígenas sem p53 mutado (HCT116, SJS-1 e RKO)

Nos resultados dos ensaios clínicos (fase I) o composto demonstrou atividade anti-tumoral em pacientes com lipossarcoma; 14 dos 20 pacientes apresentaram estabilidade no crescimento do lipossarcoma após o tratamento com **RG7112**. Todos os pacientes tratados tiveram pelo menos um evento adverso e 12 eventos adversos graves foram observados em oito pacientes, incluindo neutropenia e trombocitopenia e, por isso, o composto foi retirado dos ensaios clínicos.

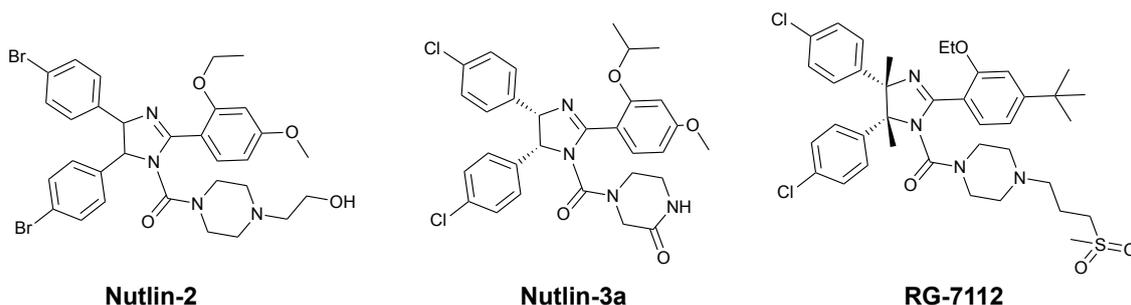
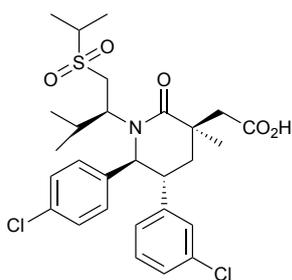


Figura 1.7 – Nutlinas que mostraram capacidade em inibir a interação p53-MDM2.

1.5.2 Piperidinonas

Compostos derivados de piperidinona foram concebidos como inibidores da interação p53-MDM2 com base numa análise estrutural de inibidores já conhecidos, para também mimetizar os três resíduos de ligação chave da p53. O primeiro composto contendo piperidinona testado mostrou uma constante de afinidade de ligação para a MDM2 de 34nM e serviu como um excelente ponto de partida para otimizações.

Em 2012, cientistas da Amgen, sintetizaram um composto derivado de piperidinona, o **AMG232** que apresentou uma constante de afinidade de ligação para a MDM2 de 0,6 nM e um IC₅₀ de 10nM quando testado na linha celular cancerígena HCT116 (Figura 1.8)³⁸ encontrando-se ainda em ensaios clínicos.

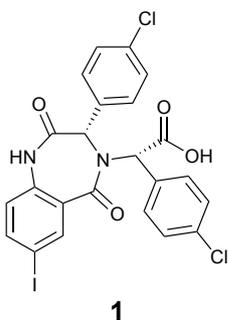


AMG 232

Figura 1.8 – Derivado de piperidona **AMG 232** com capacidade de inibir a interação p53-MDM2.

1.5.3 Benzodiazepinadinonas

Cientistas da empresa americana Johnson & Johnson criaram uma biblioteca de 1,4-benzodiazepina-2,5-dionas (BDP) para inibir a interação p53-MDM2 onde o composto **1** (Figura 1.9) foi o mais ativo e foi cristalizado complexado com a MDM2 para determinar o modo de ligação das BDPs. O composto, como a maioria dos outros inibidores, encaixa-se nos locais da Phe19, Trp23 e Leu26 e faz pontes de hidrogénio com três moléculas de água diferentes. As pontes de hidrogénio podem ser removidas sem afetar substancialmente a afinidade da molécula com a MDM2. O composto **1** apresentou uma constante de afinidade de ligação para a MDM2 de 80 nM e um IC₅₀ de 30 µM quando testado numa linha celular cancerígena da placenta com p53 *wild type* (linha celular JAR).³⁹



1

Figura 1.9 – Composto **1** com capacidade de inibir a interação p53-MDM2.

1.5.4 Spirooxindóis

Shaomeng Wang, da Universidade de Michigan, descreveu uma classe de compostos conhecidos como spirooxindóis usando uma estratégia computacional *de novo desing* baseada na estrutura onde o ponto de partida para estes estudos computacionais foi o Trp23 da p53.⁴⁰ Descobriu-se que o oxindole mimetizava na perfeição o Trp23 tanto na realização de pontes de hidrogénio, como na interação hidrofóbica com a MDM2. Numa primeira fase, iniciou-se a pesquisa de produtos naturais derivados de oxindole permitindo identificar alguns, como a spirotrprostatina A ou a alstonisina (Figura 1.10), embora, depois de conhecidas as suas estruturas, fosse claro que o impedimento estéreo não permitiria a ligação destes produtos naturais com a MDM2. No entanto, estes serviram como ponto de partida para o desenho de uma nova classe de inibidores da interação p53-MDM2.

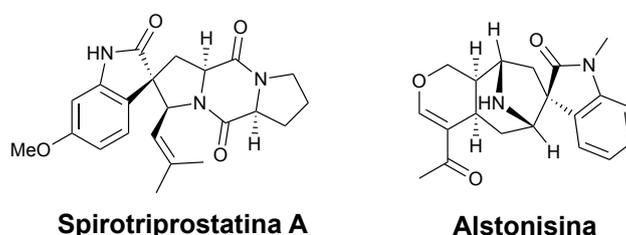


Figura 1.10 – Exemplos de oxindóis presentes na natureza.

Depois da descoberta dos produtos naturais da Figura 1.10 e depois de mais estudos computacionais, observou-se que o anel spiro poderia fornecer uma estrutura rígida na qual os grupos hidrofóbicos se podiam projetar para mimetizar a Leu26 e a Phe19.

A partir desta estrutura de spirooxindole foram feitos estudos de *docking* onde foi descoberto o composto **2** e que, depois de várias otimizações, deu origem ao composto **3** (Figura 1.11) que apresentou uma constante de afinidade de ligação para a MDM2 de 86 nM e um IC₅₀ de 0,83 μM em células cancerígenas da próstata humana com p53 *wild type* (LNCaP).⁴¹

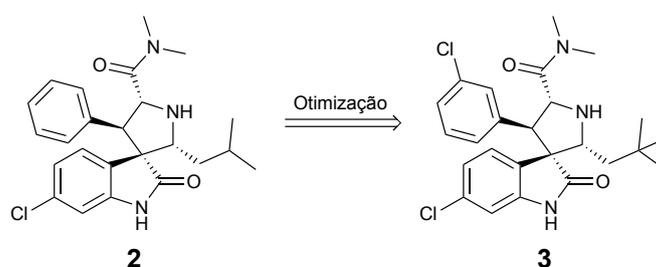


Figura 1.11 – Otimização do spirooxindole **2** dando origem ao spirooxindole **3** com capacidade de inibir a interação p53-MDM2.

De maneira a aumentar a constante de ligação à MDM2 e melhorar as suas propriedades farmacocinéticas, os compostos foram otimizados para que também mimetizassem a Leu22 da p53. O fato da Leu22 não se encontrar completamente no local da ligação da p53 com a MDM2 e estar parcialmente exposta, permitiu explorar a adição de uma parte polar aos compostos servindo assim este novo substituinte não apenas para mimetizar a Leu22, mas também para melhorar as suas propriedades físico-químicas, tais como a solubilidade aquosa.³⁴

Uma otimização extensiva destes compostos resultou na descoberta de **MI-77301**⁴² e **MI-888**⁴³ (Figura 1.12) apresentando constantes de afinidade de ligação para a MDM2 de 0,88 e 0,44 nM, respetivamente, sendo estas 50 vezes mais potentes do que **Nutlin-3a**. Quando testados na linha celular SJS-1, o **MI-77301** e o **MI-888** apresentaram um IC₅₀ de 0,092µM e 0,08µM, respetivamente sendo estes compostos 10 vezes mais potentes do que a **Nutlin-3a** na inibição do crescimento celular em linhagens celulares cancerígenas com p53 *wild type* mostrando também uma seletividade 100 vezes superior para linhas celulares com p53 *wild type* versus linhas sem p53.

A estrutura cristalina do **MI-77301** complexado com a MDM2 mostra que este mimetiza os três resíduos principais de ligação da p53 e ainda está envolvido em interações adicionais onde, por exemplo, o grupo fenilo substituído tem uma interação π - π com a His96 da MDM2. O composto **MI-77301** está neste momento em ensaios clínicos (fase I).

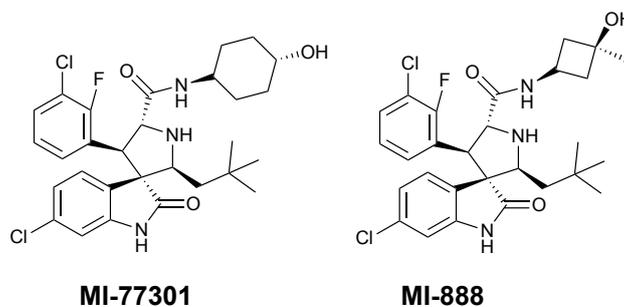
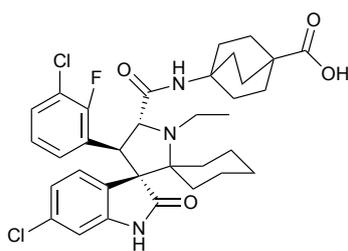


Figura 1.12 – Spirooxindóis resultantes de sucessivas otimizações. **MI-77301** está neste momento em ensaios clínicos.

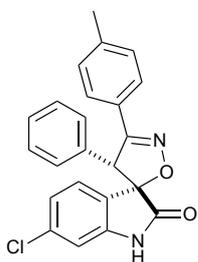
Muito recentemente, foi descoberto um novo spirooxindole (Figura 1.13) com uma constante de afinidade de ligação para a MDM2 menor que 1nM, com um IC₅₀ de 104 ± 36 nM em HCT116 e com excelentes propriedades farmacocinéticas. Este composto também se encontra em ensaios clínicos (fase I).⁴⁴



4

Figura 1.13 – Mais recente spirooxindole publicado e em ensaios clínicos.

Nos últimos anos têm vindo a ser desenvolvidos no nosso grupo de investigação novos spirooxindóis com diferentes anéis de 5 membros.^{45;46;47} Inicialmente foram sintetizadas spiroisoxazolina oxindóis, tendo o composto **5** (Figura 1.14) sido o mais ativo (IC_{50} de $26,56 \pm 1,07 \mu M$ em HCT116). Adicionalmente, esta família mostrou a capacidade de inibir a interação p53-MDM2 através de um ensaio de fluorescência (BiFC) mas, no entanto, testes em linhas celulares com a p53 silenciada mostraram que estes compostos também têm efeitos independentes da p53.



5

Figura 1.14 – Spiroisoxazolina **5** com IC_{50} de $26,56 \pm 1,07 \mu M$ em HCT116.

A alteração do anel de 5 membros de isoxazolina por um anel de pirazolina permitiu adicionar mais um substituinte no anel de 5 membros para uma possível nova interação com a MDM2 (Figura 1.15). Além desta vantagem, as pirazolininas são anéis de 5 membros muito privilegiados na química medicinal uma vez que apresenta vários tipos de atividades como, por exemplo, anticancerígena, anti-inflamatória, antidepressiva, antioxidante e anti-alzheimer.^{48;49;50;51}

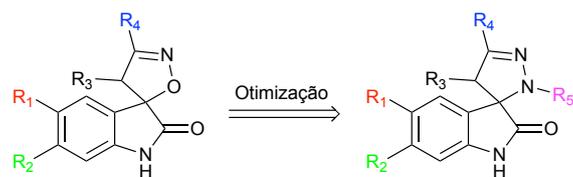
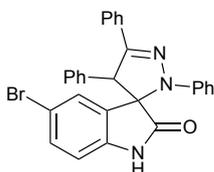


Figura 1.15 – Substituição do anel de 5 membros de isoxazolina por um anel de pirazolina.

O composto **6** (Figura 1.16) demonstrou ter uma boa atividade em linhas celulares cancerígenas HCT116 e MCF-7, apresentando um IC_{50} de $13,1 \pm 1 \mu M$ em HCT116 e um IC_{50} de $7,3 \pm 1,4 \mu M$ em MCF-7, sendo que também mostrou capacidade de inibir a interação p53-MDM2 através de um ensaio de fluorescência (BiFC).⁴⁶⁴⁷



6

Figura 1.16 - Spiropirazolinone **6** com capacidade de inibir a interação p53-MDM2.

2. Resultados e Discussão

2.1 Spiropirazolina oxindole: desenho e síntese

O grupo da professora Maria Santos (iMed.U LISboa) tem vindo a investigar o potencial anticancerígeno de várias famílias de spirooxindóis com anéis de 5 membros.^{45;46;47}

Com base nos resultados obtidos anteriormente pelo grupo e tendo como estrutura base o composto MI-219, foram desenhados novos derivados de spiropirazolina oxindóis, contendo fluor e cloro nas posições 5 e 6 do núcleo indole (Figura 2.1), respetivamente, uma vez que a inserção de halogéneos no indole melhora a capacidade de mimetizar o Trp23 da p53.⁵²

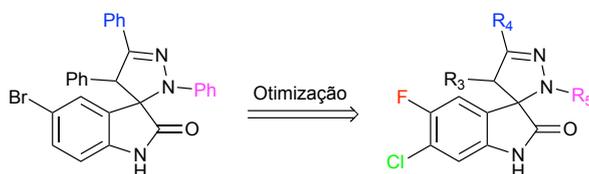
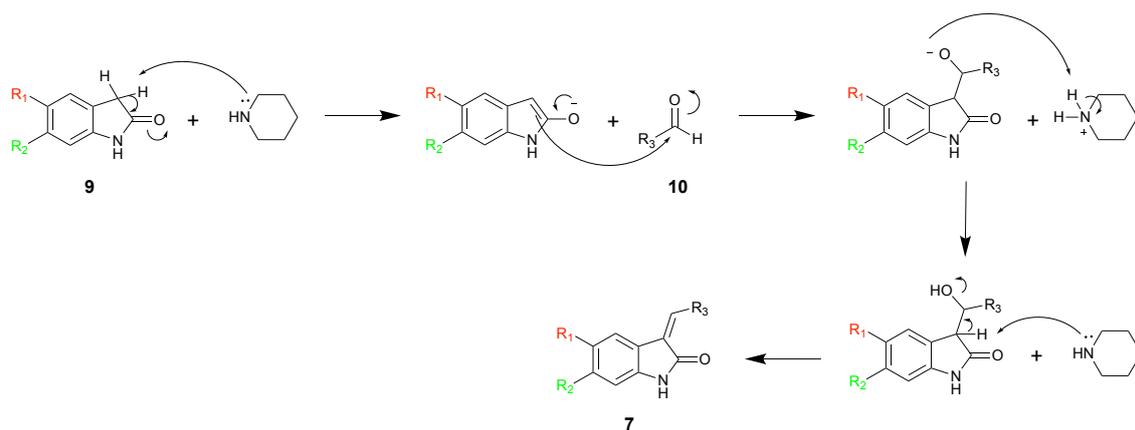


Figura 2.1 – Otimização do núcleo do indole.

De forma a mimetizar a Leu26,⁵³ foi também feita outra otimização, substituindo na maioria dos compostos o grupo fenilo por um *terc-butilo* no substituinte R₄.

Visto que os aminoácidos mais importantes na ligação p53-MDM2 são Phe19, Trp23 e Leu26, foram sintetizados 3-metilenoindolinonas **7** e cloretos de hidrazonilo **8** contendo substituintes para mimetizar estes aminoácidos (Tabela 2.1 e 2.2) sendo estes os intermediários para a síntese das spiropirazolina oxindóis. Este intermediários foram sintetizados com diferentes substituintes tendo em conta a capacidade de anéis aromáticos de 5 membros halogenados se inserirem no sítio de ligação da Phe19 e substituintes alifáticos ramificados conseguirem mimetizar a Leu26.⁵³

As 3-metilenoindolinonas **7** contendo grupos aromáticos R₃ foram sintetizadas por condensação aldólica entre 2-indolinonas substituídas **9** e diferentes aldeídos aromáticos **10** na presença de piperidina com rendimentos entre 58-92%. No esquema 2.1 está representado o mecanismo da reação.

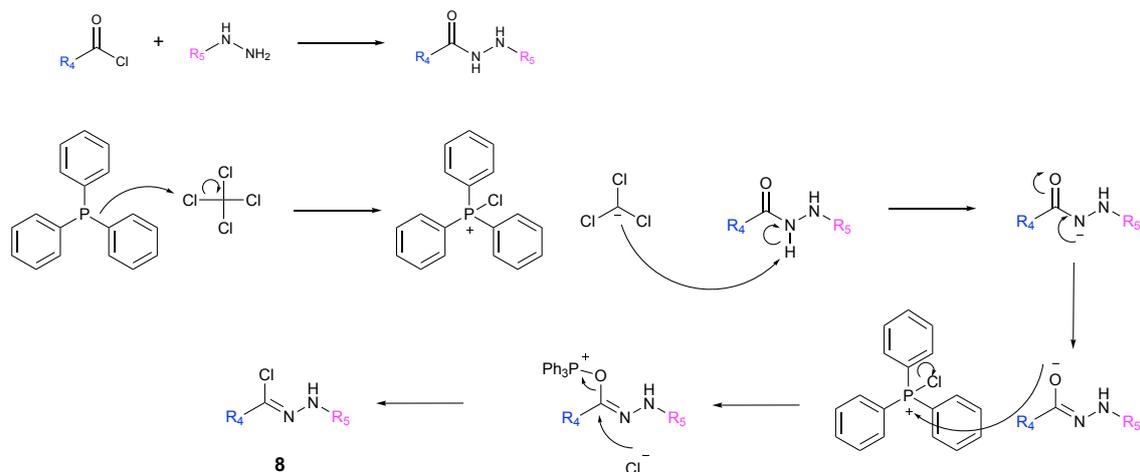


Esquema 2.1 – Mecanismo da síntese das 3-metilenoindolinonas **7a-j**.

Tabela 2.1 – 3-metilenoindolinonas **7a-j** sintetizadas.

Composto	R ₁	R ₂	R ₃	Rendimento (%)
7a	F	Cl	Ph	69
7b	F	Cl	Ph- <i>o</i> -Br	92
7c	F	Cl	Ph- <i>m</i> -Br	76
7d	F	Cl	Ph- <i>p</i> -Br	54
7e	F	Cl	Ph- <i>o</i> -F	72
7f	F	Cl	Ph- <i>p</i> -F	71
7g	F	Cl	Ph- <i>m</i> -Cl	74
7h	F	Cl	Ph- <i>p</i> -Cl	81
7i	F	Cl	Ph- <i>o</i> -F- <i>m</i> -Cl	58
7j	H	Cl	Ph- <i>o</i> -F- <i>m</i> -Cl	93

Os cloretos de hidrazonilo **8** foram sintetizados usando a reação de Appel, onde a hidrazona reage com a trifetilfosfina e tetracloreto de carbono. As hidrozonas foram sintetizadas através de uma reação S_N2 entre hidrazinas e cloretos de ácido (Esquema 2.2).

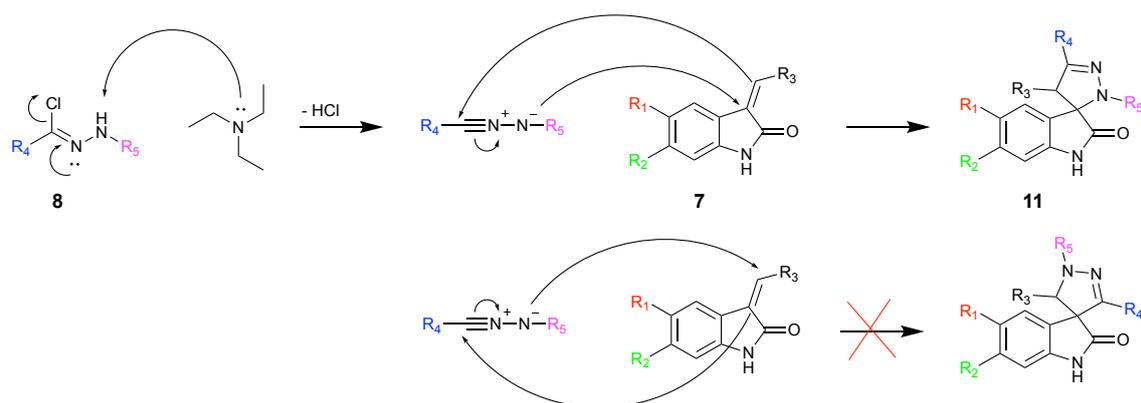


Esquema 2.2 – Mecanismo da síntese dos cloretos de hidrazonilo **8a-c**.

Tabela 2.2 – Cloretos de hidrazonilo **8a-c** sintetizados.

Composto	R ₄	R ₅	Rendimento (%)
8a	<i>t</i> -Bu	Ph	73
8b	<i>t</i> -Bu	Ph- <i>p</i> -Cl	95
8c	Ph	Ph- <i>p</i> -Cl	82

As spiropirazolina oxindóis foram obtidos por cicloadição 1,3-dipolar entre as 3-metilenoindolinonas **7** e nitrilo-iminas (geradas in situ por desidro-halogenação de cloretos de hidrazonilo **8**) (Esquema 2.3). A cicloadição 1,3-dipolar é uma reação de cicloadição entre moléculas 1,3-dipolares e dipolarófilos, neste caso, as nitrilo-iminas e as 3-metilenoindolinonas, respetivamente. Esta reação foi explorada pela primeira vez por Huisgen na década de 1960 e pode ser dividida em duas categorias: o tipo propargil e o tipo alilo,⁵⁴ sendo que no esquema três está representado o tipo alilo. Mecanicamente, pensa-se que a maioria das cicloadições 1,3-dipolares passa por um processo concertado.



Esquema 2.3 – Mecanismo para a síntese das spiroiridoloxindóis **11a-u** e respetivo regioisómero formado.

Tabela 2.3 - Spiroiridoloxindóis **11a-u** sintetizadas.

Composto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Rendimento (%)
11a	F	Cl	Ph	<i>t</i> -Bu	Ph	92
11b	F	Cl	Ph	<i>t</i> -Bu	Ph- <i>p</i> -Cl	70
11c	F	Cl	Ph- <i>o</i> -Br	Ph	Ph- <i>p</i> -Cl	67
11d	F	Cl	Ph- <i>o</i> -Br	<i>t</i> -Bu	Ph	53
11e	F	Cl	Ph- <i>o</i> -Br	<i>t</i> -Bu	Ph- <i>p</i> -Cl	30
11f	F	Cl	Ph- <i>m</i> -Br	<i>t</i> -Bu	Ph	52
11g	F	Cl	Ph- <i>m</i> -Br	<i>t</i> -Bu	Ph- <i>p</i> -Cl	72
11h	F	Cl	Ph- <i>p</i> -Br	<i>t</i> -Bu	Ph	63
11i	F	Cl	Ph- <i>o</i> -F	Ph	Ph- <i>p</i> -Cl	83
11j	F	Cl	Ph- <i>o</i> -F	<i>t</i> -Bu	Ph	74
11k	F	Cl	Ph- <i>p</i> -F	<i>t</i> -Bu	Ph	66
11l	F	Cl	Ph- <i>p</i> -F	Ph	Ph- <i>p</i> -Cl	67
11m	F	Cl	Ph- <i>m</i> -Cl	<i>t</i> -Bu	Ph- <i>p</i> -Cl	94
11n	F	Cl	Ph- <i>m</i> -Cl	<i>t</i> -Bu	Ph	73
11o	F	Cl	Ph- <i>p</i> -Cl	<i>t</i> -Bu	Ph- <i>p</i> -Cl	85
11p	F	Cl	Ph- <i>p</i> -Cl	<i>t</i> -Bu	Ph	42
11q	F	Cl	Ph- <i>o</i> -F- <i>m</i> -Cl	Ph	Ph- <i>p</i> -Cl	75
11r	F	Cl	Ph- <i>o</i> -F- <i>m</i> -Cl	<i>t</i> -Bu	Ph	91
11s	F	Cl	Ph- <i>o</i> -F- <i>m</i> -Cl	<i>t</i> -Bu	Ph- <i>p</i> -Cl	98
11t	H	Cl	Ph- <i>o</i> -F- <i>m</i> -Cl	<i>t</i> -Bu	Ph	92
11u	H	Cl	Ph- <i>o</i> -F- <i>m</i> -Cl	<i>t</i> -Bu	Ph- <i>p</i> -Cl	76

Todos os compostos sintetizados foram caracterizados por ressonância magnética nuclear (RMN). Os sinais característicos dos mesmos são, no espetro de RMN de ¹H, um singlete correspondente ao H-4' que se situa entre os 4,21 e os 6,12 ppm, um duplete correspondente ao H-4 que se situa entre 5,32 e 6,41 ppm e que tem esta multiplicidade pois o fluor do carbono 5 tem a capacidade de desdobrar o seu sinal com uma constante de acoplamento de 9Hz. Outros

sinais característicos são o singlete correspondente ao NH que se situa entre os 7,6 e os 8,62 ppm e, quando presente, o singlete correspondente ao *terc-butilo* que se situa entre 1,16 e 1,19 ppm.

Na Figura 2.2, podemos observar o espectro de RMN de ^1H do composto **11b**, onde podemos facilmente identificar os sinais característicos: o singlete a 8,2ppm (NH), o duplete a 5,98ppm (H-4) e os singletos a 4,45ppm (H-4') e a 1,18ppm (*terc-butilo*).

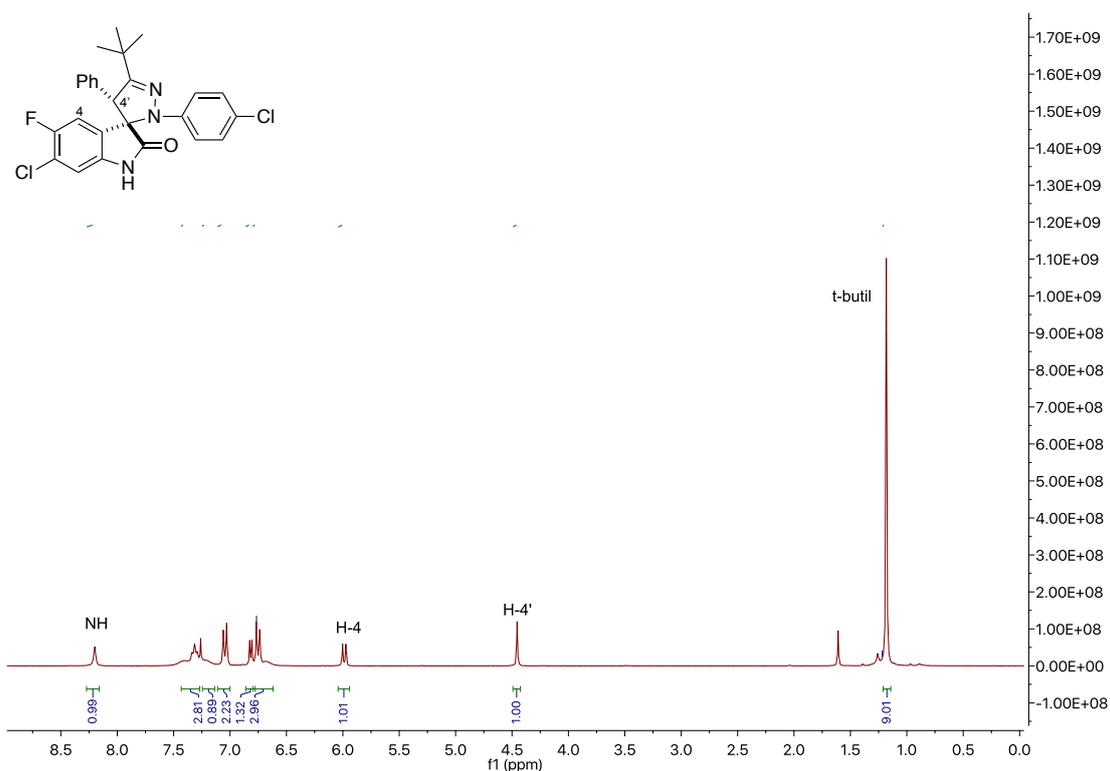


Figura 2.2 – Espectro de RMN de ^1H do composto **11b**.

Já no espectro de RMN de ^{13}C , há quatro sinais característicos. Entre os 177 e os 179 ppm encontra-se o sinal correspondente ao carbono do grupo carbonilo. Entre os 161 e os 162 ppm encontra-se o sinal correspondente ao C=N enquanto que a campo mais alto, entre 76 e 77 ppm está o sinal do carbono spiro. O desvio químico do carbono spiro revela qual dos regioisômeros é formado aquando da cicloadição 1,3-dipolar (Esquema 2.3), sendo que o regioisômero pretendido possui o carbono spiro com desvio entre 76 e 78 ppm. O desvio do carbono spiro do regioisômero formado é conhecido, pois estão descritas na literatura estruturas de raios-X desses regioisômeros.^{47,55} Entre 54 e os 67 ppm encontra-se o sinal do carbono 4' enquanto que o sinal do carbono 4 se encontra entre os 114 e os 116 ppm sendo este sinal também

desdobrado, com uma constante de acoplamento entre 21 e 30Hz, pela proximidade ao fluor do carbono 5. Por fim, identifica-se facilmente o carbono 5 pois tem um grande desdobramento por estar ligado ao fluor, encontrando-se entre 154 e 156 ppm com uma constante de acoplamento característica entre 242 e 244Hz.

Na figura 2.3, está representado o espectro de RMN de ^{13}C do composto **11b** e podem-se observar os sinais característicos: 177 ppm (C=O); 162 ppm (C=N); 155 ppm (C5); 115 ppm (C4); 77 ppm (Cspiro) e 62 ppm (C-4').

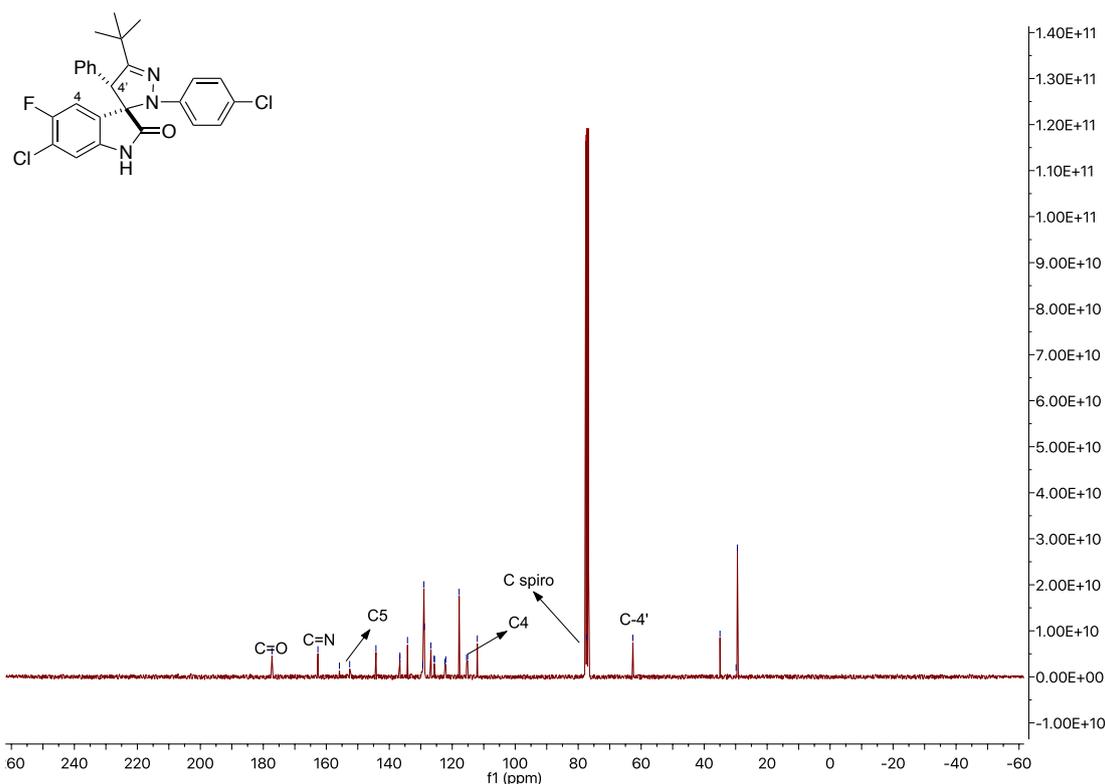


Figura 2.3 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto **11b**.

2.2 Estudos de estabilidade em DMSO

De maneira a avaliar a estabilidade do composto **11a** em DMSO, solvente que iria ser utilizado nos ensaios biológicos, foi feito um espectro de RMN ^1H (Figura 2.4) e, passados quatro dias, com o tubo à temperatura ambiente e exposto à luz solar, repetiu-se o espectro (Figura 2.5). Como se pode observar pelos espectros e pela sua sobreposição (Figura 2.6), não há qualquer alteração. Com isto, pode concluir-se que, no mínimo até 4 dias, o composto **11a** é estável em

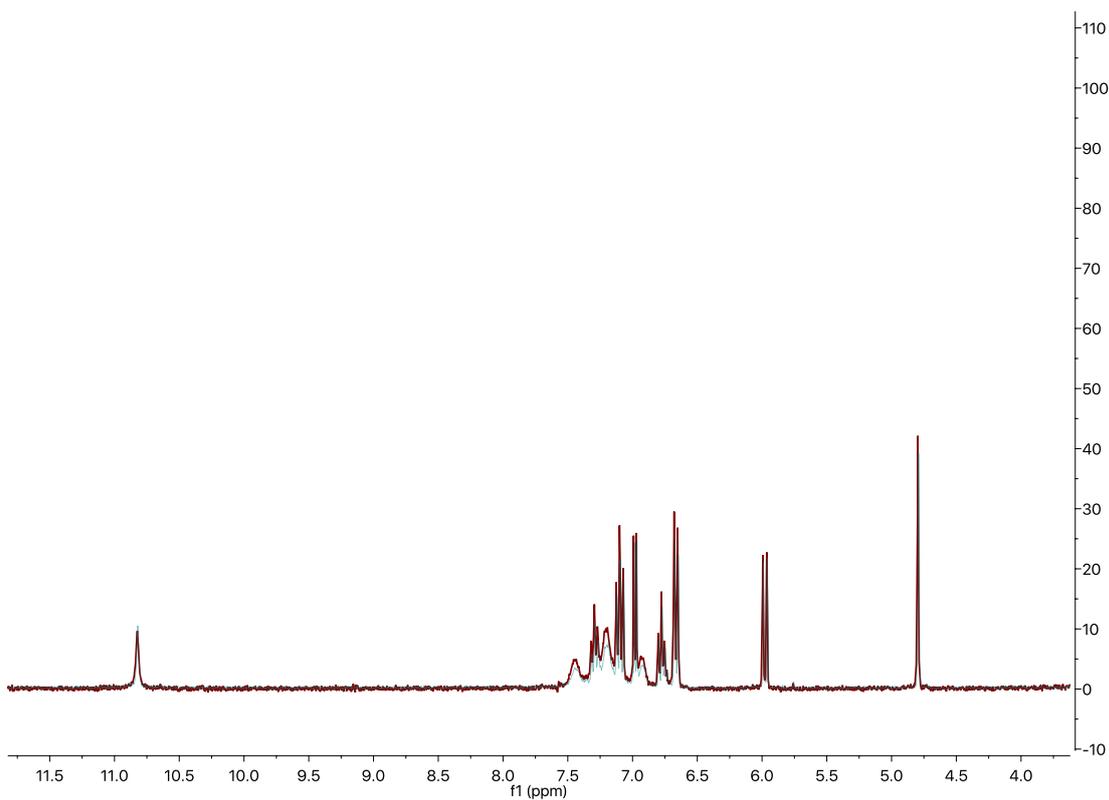


Figura 2.6 – Sobreposição dos dois espectros das figuras 2.4 e 2.5.

2.3 Estudos de estrutura/atividade na linha celular HCT116

Depois da síntese da biblioteca de compostos, foi efetuado um *screening* dos mesmos nas linhas celulares HCT116 p53^(+/+) e HCT116 p53^(-/-) de modo a avaliar a sua citotoxicidade e seletividade para a proteína p53 (Tabela 2.4) e realizar-se o estudo de relação entre estrutura/atividade.

Na Tabela 2.4 encontram-se os resultados do ensaio de MTS efetuado para avaliar a viabilidade celular nas concentrações de 12,5 e 25 μ M dos compostos **11a-u**.

Tabela 2.4 - Avaliação da viabilidade celular após 72 h de incubação com os compostos **11a-u**, com as concentrações de 12,5 e 25 μM através do ensaio de viabilidade MTS. O DMSO foi utilizado como controlo (fold change = 1). Os dados representam a média dos triplicados de uma experiência. ^a Linha celular HCT116 p53^(+/+); ^b Linha celular HCT116 p53^(-/-)

Composto	Viabilidade Celular ^a	Viabilidade Celular ^b	Viabilidade Celular ^a	Viabilidade Celular ^b
	(fold change) 12,5 μM	(fold change) 12,5 μM	(fold change) 25 μM	(fold change) 25 μM
11a	0,6	0,91	0,51	0,75
11b	0,96	0,93	0,34	0,24
11c	0,9	1,03	0,75	0,52
11d	0,65	0,96	0,55	0,79
11e	1,09	0,92	0,35	0,34
11f	0,66	0,86	0,6	0,4
11g	0,37	0,44	0,33	0,31
11h	0,41	0,79	0,33	0,32
11i	0,84	0,78	0,35	0,41
11j	0,89	0,81	0,45	0,57
11k	0,7	0,96	0,89	0,71
11l	0,46	0,83	0,32	0,35
11m	0,41	0,42	0,33	0,33
11n	1,1	1,1	0,35	0,37
11o	0,71	0,92	0,33	0,27
11p	0,6	0,96	0,33	0,31
11q	0,96	0,86	0,32	0,39
11r	0,4	0,49	0,34	0,35
11s	0,56	0,67	0,35	0,35
11t	1,02	0,94	0,49	0,31
11u	0,41	0,41	0,32	0,31

De maneira a analisar a influência da presença de halogéneos nas diferentes posições do grupo fenilo do substituinte R₃, a citotoxicidade e seletividade apresentada pelos compostos foi sempre comparada com a citotoxicidade e seletividade do composto **11a** (Figura 2.7), pois este não possui qualquer halogéneo no grupo fenilo do substituinte R₃.

Analisando os resultados dos compostos **11a** e **11b**, observa-se que a inserção de um cloro na posição *para* do anel aromático do substituinte R₅ tornou o composto **11b** mais citotóxico na concentração de 25 μM , mas também o tornou não seletivo para a linha celular com p53.

Quanto aos compostos com bromo em diferentes posições do anel aromático do substituinte R₃, nota-se que a inserção de bromo na posição *orto* não alterou os níveis de citotoxicidade continuando também a apresentar seletividade (**11d**). Como anteriormente, a inserção de cloro na posição *para* do anel aromático do substituinte R₅ retirou a seletividade ao composto **11c** e a substituição do grupo *terc-butilo* por um anel aromático do substituinte R₄ tornou-o menos ativo relativamente ao composto **11e** (compostos que diferem apenas no substituinte R₄)

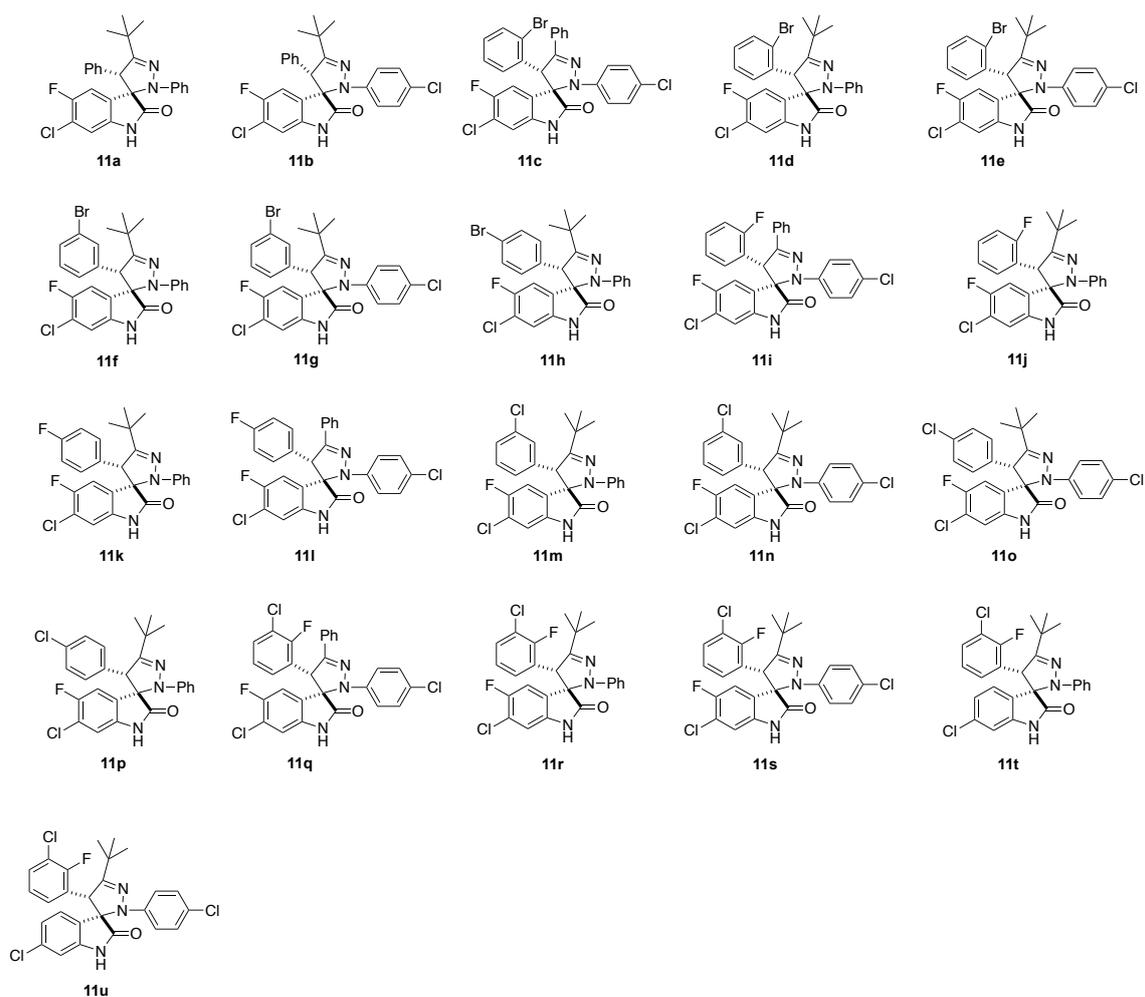


Figura 2.7 – Spiroirazolininas oxindóis sintetizadas **11a-u**.

Quanto aos compostos com bromo na posição *meta* estes tornaram-se não seletivos (**11f e 11g**) mas, apesar disso, o composto com cloro na posição *para* do anel aromático do substituinte R₅ foi um dos mais citotóxicos (**11g**). Já o composto com bromo na posição *para*, mostrou um aumento da citotoxicidade e também da seletividade, mas apenas na concentração 12,5 µM (**11h**).

Analisando os resultados para os compostos com fluor nas posições *para* e *orto* no anel aromático do substituinte R₃, observou-se que a inserção de fluor em qualquer uma das posições não confere mais citotoxicidade apesar de conferir seletividade ao composto **11l** apenas na concentração de 12,5 µM. Uma razão para estes compostos não serem tão ativos como os restantes pode advir da necessidade de halogéneos volumosos no substituinte R₃ para este conseguir mimetizar corretamente a Phe19 e encaixar-se no seu local de ligação. Uma vez que o fluor não é um átomo volumoso como, por exemplo, o cloro e o bromo, o substituinte R₃ não

consegue mimetizar corretamente a Phe19 piorando a afinidade de ligação dos compostos com a MDM2 e consequentemente tornando-os menos citotóxicos.

Foram também sintetizados compostos com cloro nas posições *para* e *meta* no anel aromático do substituinte R₃. A inserção de cloro na posição *meta* tornou o composto não seletivo e não aumentou a sua citotoxicidade (**11n**), no entanto, com cloro na posição *para* do anel aromático do substituinte R₅ a citotoxicidade do composto aumenta bastante apesar de continuar sem seletividade (**11m**). Quanto aos compostos com cloro na posição *para* do anel aromático do substituinte R₃ estes mostram seletividade mas apenas na concentração 12,5 µM (**11p**) e um pequeno aumento na citotoxicidade (**11o**).

Por fim, analisando os resultados dos compostos com cloro na posição *meta* e fluor na posição *orto* no anel aromático do substituinte R₃, pode observar-se que nenhum destes compostos apresentou seletividade. No entanto, com a exceção do composto **11q** que tem um anel aromático na posição do substituinte R₄, todos os compostos apresentaram um aumento de citotoxicidade quer na concentração de 12,5 como 25 µM (**11r** e **11s**).

Os compostos com cloro na posição *meta* e fluor na posição *orto* no anel aromático do substituinte R₃, mas com apenas com cloro na posição 6 do indole, não apresentaram seletividade, mas, como já visto anteriormente, o composto com cloro na posição *para* do anel aromático do substituinte R₅ apresenta uma maior citotoxicidade (**11u**).

Posto isto, notou-se que a presença de um halogéneo nas posições *meta* ou *para* conferiam uma maior citotoxicidade aos compostos sendo o cloro o halogéneo que mais citotoxicidade conferiu. Comparando os resultados entre os compostos **11c** e **11e** e entre os compostos **11q** e **11s** nota-se que os compostos com *tert*-butilo apresentam uma maior atividade do que os compostos com um fenilo na posição do substituinte R₄ sugerindo que, eventualmente, o grupo *tert*-butilo pode ser um melhor mimetizador da Leu26.

Quanto à seletividade, os compostos **11a** e **11d** (Figura 2.7) mostraram seletividade nas concentrações de 12,5 e 25µM para a linha celular com p53.

Os compostos **11h**, **11i**, **11p** (Figura 2.7) relevaram-se seletivos na concentração de 12,5 µM. Uma característica comum a estes três compostos, é a presença de um halogéneo na posição *para* do anel aromático do substituinte R₃, o que indica que possivelmente essa posição é importante na ligação dos compostos à MDM2.

Adicionalmente, a inserção de um cloro na posição *para* do anel aromático do substituinte R₅ aumentou sempre a citotoxicidade, mas retirou a seletividade aos compostos.

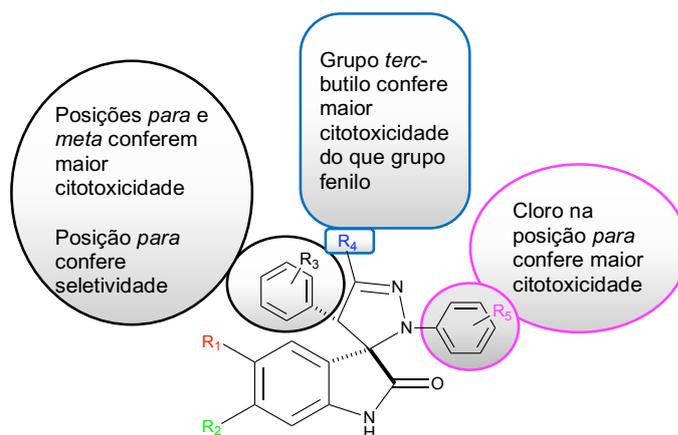


Figura 2.8 – Consequências das otimizações feitas nas spiroirazolininas oxindóis.

2.4 Viabilidade e diferenciação em NSCs

Numa fase seguinte, o composto **11a** foi escolhido para ser testado em NCSs estando na base desta escolha as características apresentadas por este no *screening* efetuado anteriormente: não ser muito citotóxico (IC_{50} de 25 μ M) e possuir um elevado valor de seletividade para a linha celular cancerígena com p53. Estas duas características foram cruciais para a escolha deste composto uma vez que, nesta fase, o objetivo seria induzir diferenciação nas NCSs através da p53 e não induzir morte nas mesmas.

Para avaliar a viabilidade celular das NSCs na presença do composto **11a**, realizou-se um ensaio de MTS nos *time-points* de 24 e 48 h em condições de auto-renovação ou em processo de diferenciação celular (Figura 2.9).

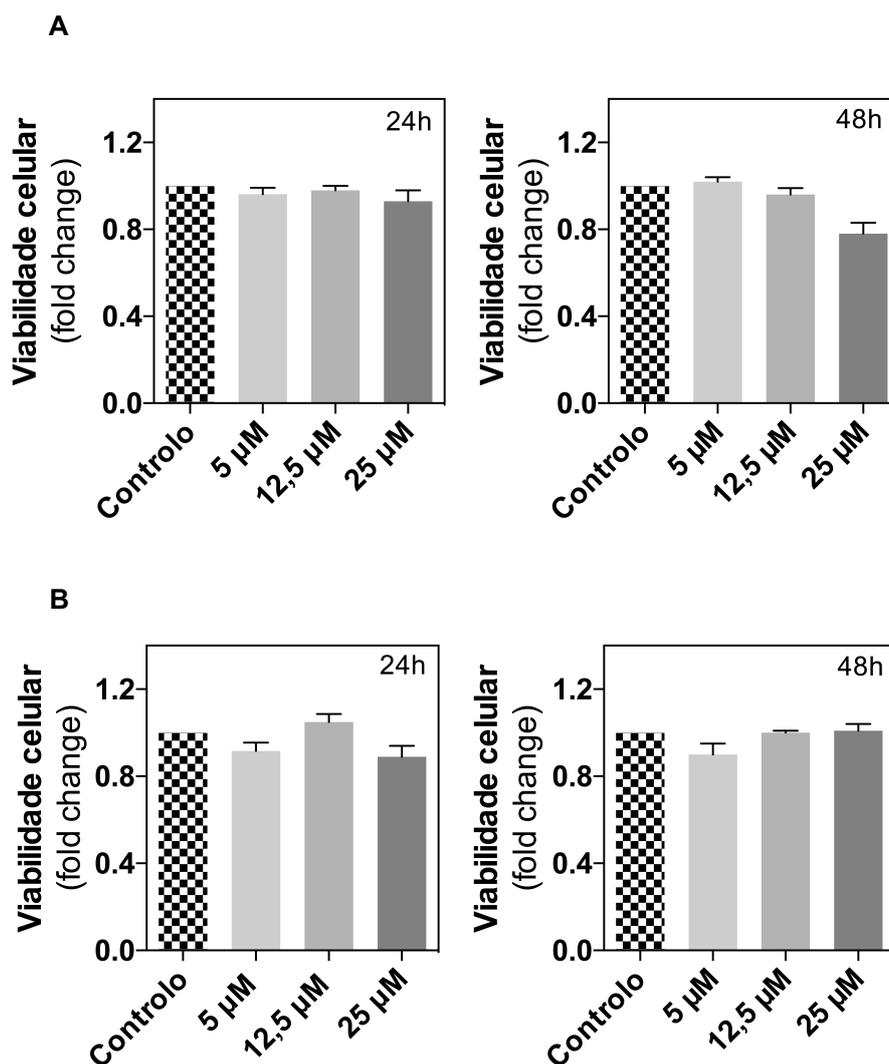


Figura 2.9 – Avaliação da viabilidade celular por MTS em NSCs em condições auto-renovação (A) ou em processo de diferenciação (B), após 24 e 48 horas de incubação com 5, 12,5 ou 25 μM do composto **11a**. O DMSO foi utilizado como controle (fold change = 1). Os dados representam a média \pm SEM de três experiências independentes.

Analisando os gráficos das Figuras 2.9, pode-se observar que quer em condições de auto-renovação, quer em condições de diferenciação, às 24 e 48 horas, a viabilidade celular não é significativamente afetada pelo composto **11a**, nas concentrações de 5; 12,5 e 25 μM .

Visto que a viabilidade celular não se alterou, as concentrações escolhidas para avaliar a capacidade de indução de diferenciação foram as de 12,5 e 25 μM .

Para a avaliação do estado de diferenciação celular foram quantificados os níveis de duas proteínas por Western blot: (*sex determining region Y*)-*box 2* (SOX2) e β III-tubulina.

A proteína SOX2 é um fator de transcrição que tem um papel chave em muitos estágios do desenvolvimento dos mamíferos sendo que também é essencial na auto-renovação das células estaminais, sendo por isso considerado um marcador de pluripotência e multipotência (no caso das NSCs). Posto isto, é de esperar que, com o avanço do estado de diferenciação celular os níveis de SOX2 vão gradualmente diminuindo.

Por outro lado, a β III-tubulina é uma proteína da família das tubulinas e constituinte do microtúbulo, encontrada quase exclusivamente nos neurónios. Ao contrário da SOX2, a β III-tubulina é um marcador de diferenciação neural e, por isso, é expectável que os seus níveis vão gradualmente aumentando ao longo da diferenciação celular.

Os níveis de expressão destas proteínas foram então analisados após incubação com o composto **11a** em condições de auto-renovação ou durante o processo de diferenciação.

Nos gráficos da Figura 2.10 estão representados os níveis proteicos de SOX2 nas NSCs em condições auto-renovação (**A**) ou em processo de diferenciação (**B**), depois de 24 e 48 horas da incubação com composto **11a**. Analisando os gráficos, observa-se, às 24 h de incubação com o composto, uma diminuição significativa dos níveis de SOX2 quando as NSCs se encontram em processo de diferenciação. No entanto, quando estas se encontram em condições de auto-renovação não se observam diminuições nos níveis proteicos de SOX2, notando-se, até, um ligeiro aumento destes na concentração de 12,5 μ M.

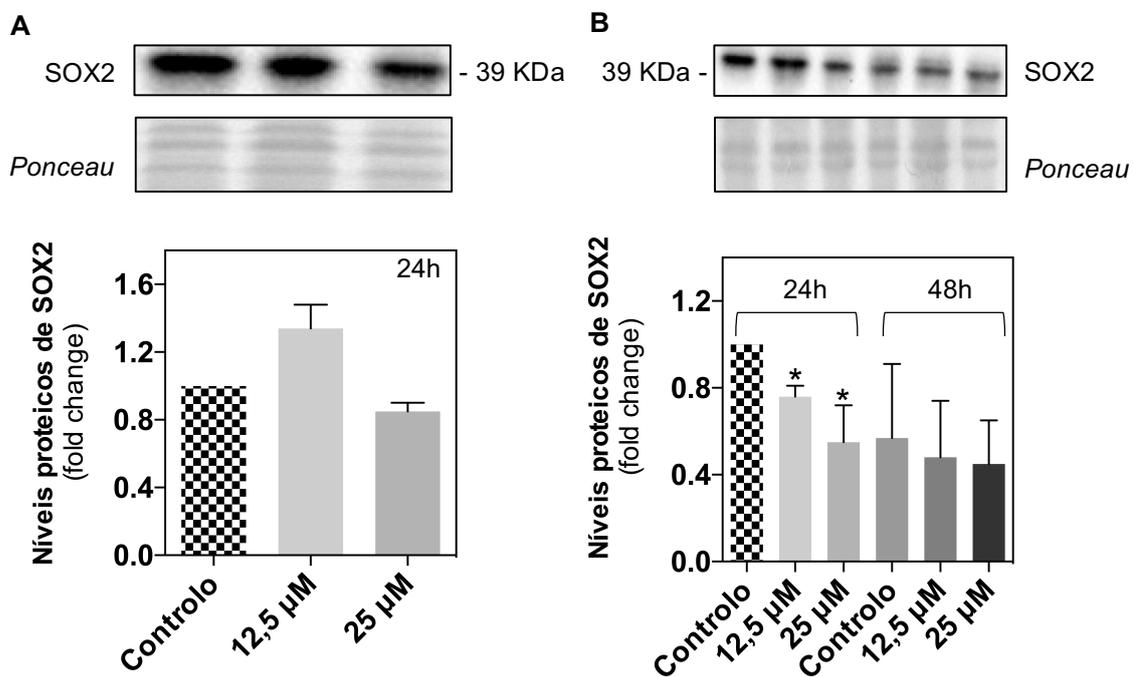


Figura 2.10 – Efeito do composto **11a**, às concentrações de 12,5 e 25 μM , nos níveis proteicos de SOX2 das NSCs em condições de auto-renovação (**A**) ou em processo de diferenciação (**B**). Níveis de SOX2 quantificados a partir do isolamento de proteínas totais de NSCs depois de 24 e 48 horas de incubação com o composto. O DMSO foi utilizado como controlo (fold change = 1) e normalização feita com *ponceau*. Dados representam a média \pm SEM de seis experiências independentes. * $p < 0.05$.

Com a análise dos resultados depois de 24 h de incubação, podemos afirmar-se que o composto está, de alguma maneira, a reduzir os níveis proteicos de SOX2 quando as NSCs se encontram em processo de diferenciação e por isso, este parece ter potencial para reduzir o estado de indiferenciação das NSCs.

Analisando os resultados dos níveis proteicos de SOX2, após 48 h de incubação com o composto **11a**, observa-se uma diminuição expectável entre o controlo das 48 h e o das 24 h pois as NSCs encontram-se em processo de diferenciação. Já o composto, depois de 48 h da sua incubação não parece ter qualquer efeito nos níveis de SOX2, sugerindo que o composto possa ter um efeito transiente nas NSCs em cultura.

Nos gráficos da Figura 2.11 estão representados os níveis proteicos de β III-tubulina nas NSCs em condições auto-renovação (A) ou em processo de diferenciação (B), depois de 24 e 48 h da incubação com composto 11a. Analisando os gráficos, observa-se, que, na presença do composto, há um aumento considerável às 24 h nos níveis de β III-tubulina apenas quando as NSCs se encontram em processo de diferenciação. No entanto, quando estas se encontram em condições de auto-renovação não se observa um aumento nos níveis proteicos de β III-tubulina, observando-se até, uma diminuição nos seus níveis.

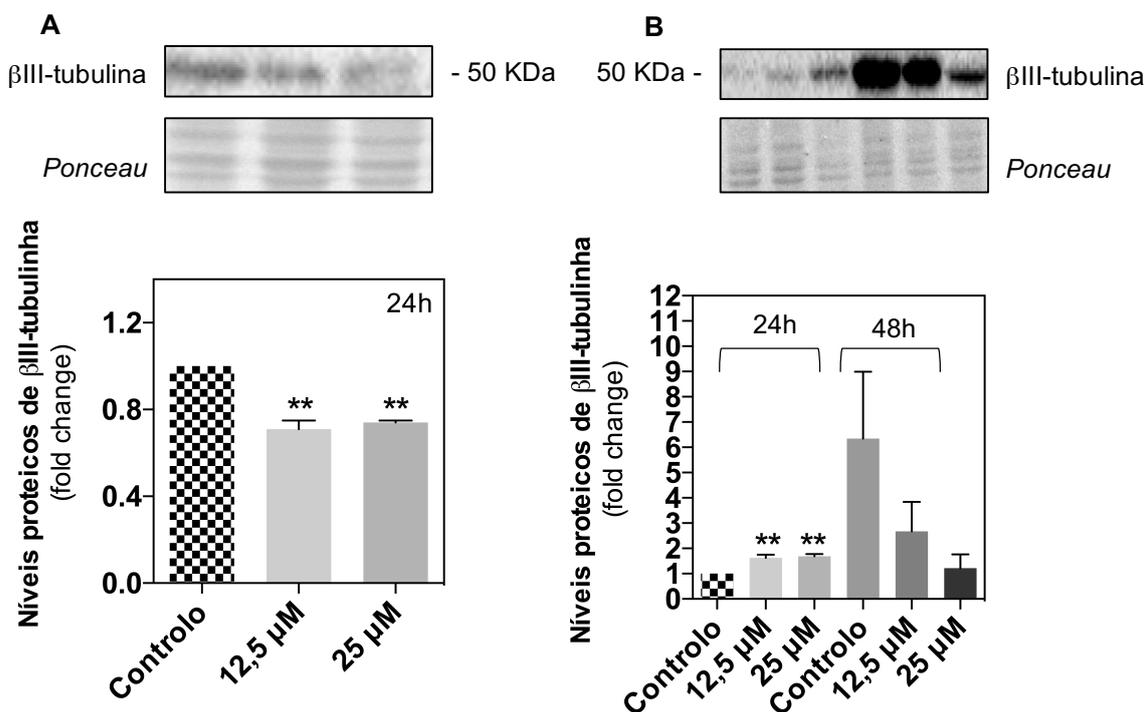


Figura 2.11– Efeito do composto 11a, às concentrações de 12,5 e 25 μ M, nos níveis proteicos de β III-tubulina das NSCs em condições de auto-renovação (A) ou em processo de diferenciação (B). Níveis de β III-tubulina quantificados a partir do isolamento de proteínas totais de NSCs depois de 24 e 48 h de incubação com o composto. O DMSO foi utilizado como controlo (fold change = 1) e a normalização feita com *ponceau*. Dados representam a média \pm SEM de seis experiências independentes. ** $p < 0.01$.

A partir da análise dos resultados depois de 24 h de incubação, pode afirmar-se que o composto está, de alguma maneira, a aumentar os níveis proteicos de β III-tubulina quando as NSCs se encontram em processo de diferenciação e por isso, este composto demonstrou ter, uma vez mais, ter potencial para aumentar o estado de diferenciação das NSCs às 24 h de incubação.

Quanto aos resultados dos níveis proteicos de β III-tubulina, após 48 h de incubação com o composto 11a, estes, como no caso dos níveis proteicos de SOX2, não são os esperados.

Apesar de se observar um aumento expectável entre o controlos das 48 h e o controlo das 24 h, depois de 48 h de incubação com o composto não se observa qualquer aumento nos níveis de β III-tubulina, registando-se até um efeito contrário ao esperado pela diminuição dos níveis proteicos de β III-tubulina na presença do composto.

Como se pode observar no gráfico **A** da Figura 2.12, a presença do composto **11a** por 24 h levou a um aumento muito significativo dos níveis proteicos de p53, os quais coincidem com a alteração dos níveis proteicos das proteínas SOX2 e β III-tubulina analisadas anteriormente no mesmo *time point*. Estes resultados, demonstram, então, que o mecanismo de ação de **11a** parece ser de fato pelo aumento da estabilização da proteína p53.

Nas condições de auto-renovação, os nossos resultados demonstraram que os níveis proteicos de SOX2 e β III-tubulina não acompanharam os níveis de p53. De facto, neste contexto celular, os níveis elevados de p53 promovidos pelo composto **11a** não parecem ser suficientes para induzir diferenciação celular.

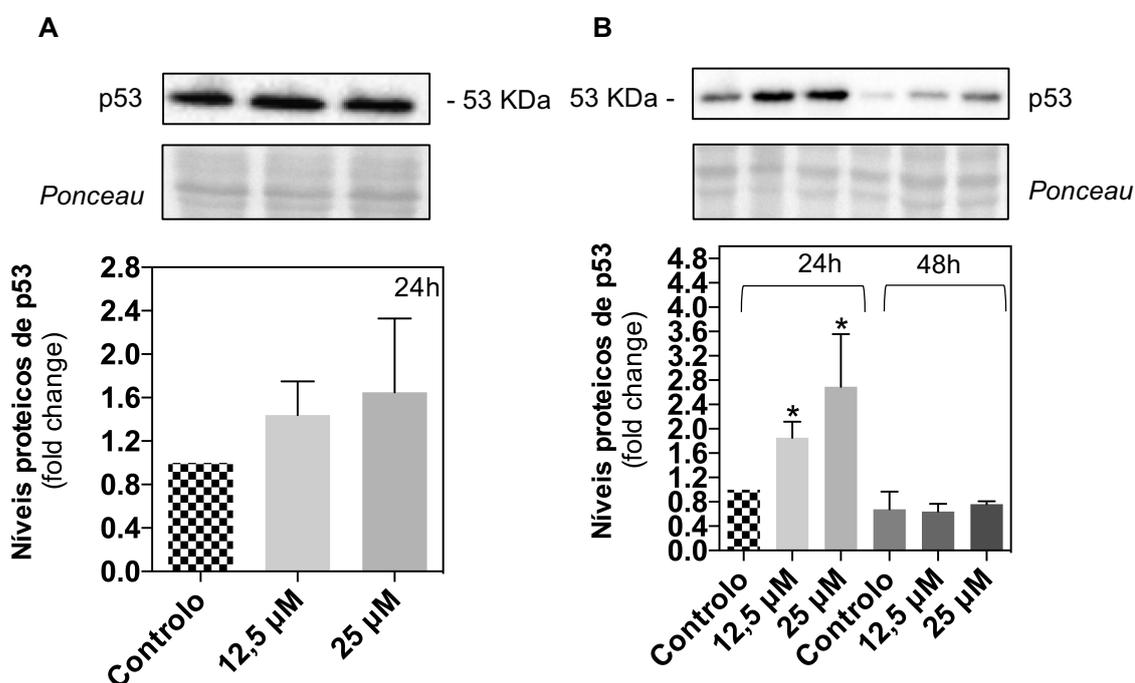


Figura 2.12 – Efeito do composto **11a**, às concentrações de 12,5 e 25 μ M, nos níveis proteicos de p53 das NSCs em condições de auto-renovação (**A**) ou em processo de diferenciação (**B**). Níveis de p53 quantificados a partir do isolamento de proteínas totais de NSCs depois de 24 e 48 horas de incubação com o composto. O DMSO foi utilizado como controlo (fold change=1) e normalização feita com *ponceau*. Dados representam a média \pm SEM de seis experiências independentes. * $p < 0.05$;

Analisando os resultados dos níveis proteicos de p53, após 48 horas de incubação com o composto **11a**, observa-se que este não tem qualquer efeito nos níveis proteicos de p53, uma vez que não há grandes diferenças entre o valor do controlo das 48 horas e os valores da incubação do composto a 12,5 e 25 μM . De fato, no *time point* das 48 horas, os níveis de β III - tubulina e SOX2 também não foram alterados pelo composto. Pode afirmar-se que, às 48 horas, o composto **11a** já não tem qualquer efeito como indutor da proteína p53 e subsequentemente na indução da diferenciação celular. Neste sentido, e não obstante o potencial terapêutico deste composto na modulação da diferenciação celular, os métodos de administração deste composto numa futura aplicação terapêutica deverão ser cuidadosamente analisados.

Por fim, foram avaliados os níveis da proteína *Bcl-2-associated X* (Bax) (Figura 2.13). A expressão do gene que codifica a proteína Bax é positivamente regulada pela p53 e já foi demonstrado que esta proteína está envolvida na apoptose mediada por p53.⁵⁷

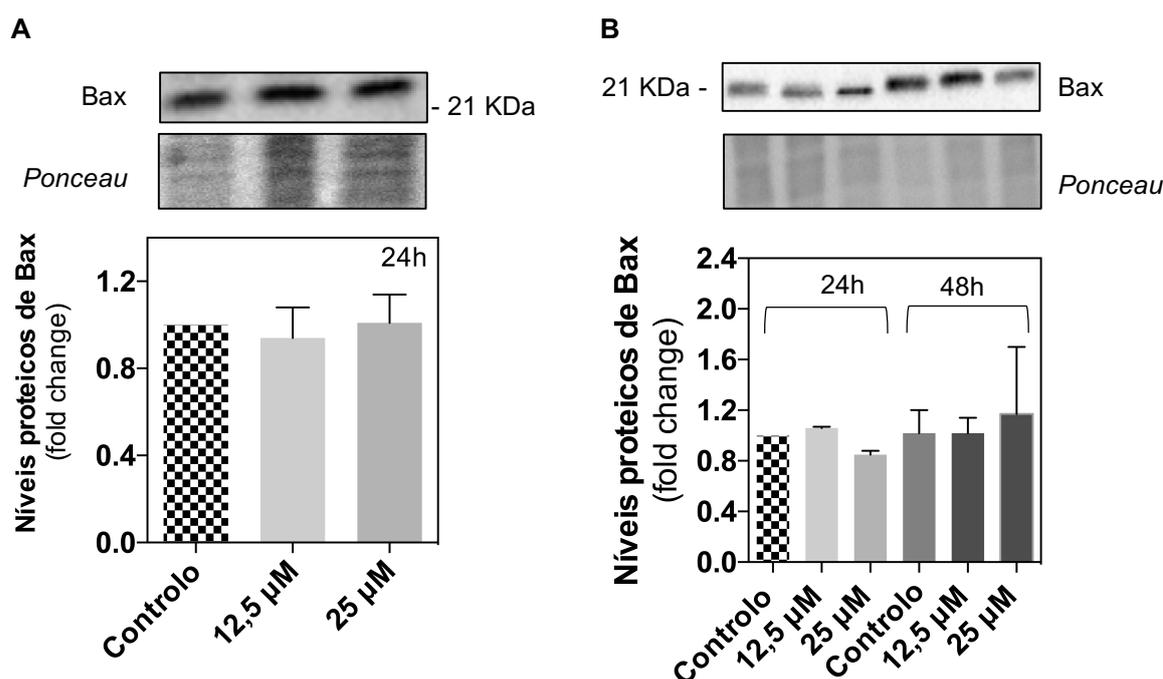


Figura 2.13 – Efeito do composto **11a**, às concentrações de 12,5 e 25 μM , nos níveis proteicos de Bax das NSCs em condições de auto-renovação (**A**) ou em processo de diferenciação (**B**). Níveis de Bax quantificados a partir do isolamento de proteínas totais de NSCs depois de 24 e 48 horas de incubação com o composto. O DMSO foi utilizado como controlo (fold change=1) e normalização feita com *ponceau*. Dados representam a média \pm SEM de seis experiências independentes.

Como já era expectável, e de acordo com os resultados dos ensaios de viabilidade, os níveis da proteína Bax mantêm-se muito próximos do controlo o que significa, que, nestas concentrações e condições, as células não se encontram em condições apoptóticas.

Visto que, em condições de diferenciação, o composto **11a** mostrou capacidade de indução de diferenciação nas NCSs através da diminuição dos níveis proteicos de SOX2 e do aumento dos níveis proteicos de β III-tubulina, avaliou-se a capacidade do mesmo composto na indução de diferenciação na linha celular cancerígena GI-261 (glioma) pois, células cancerígenas diferenciadas serão muito mais sensíveis à quimioterapia.

2.5 Viabilidade e diferenciação em GI-261

Em primeiro lugar foi avaliado a viabilidade celular através do ensaio de MTS na linha celular cancerígena GI-261 (Figura 2.13).

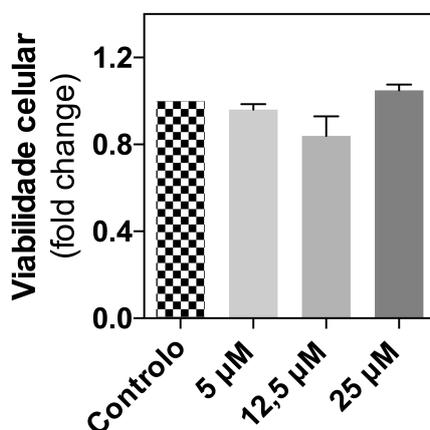


Figura 2.14 – Avaliação da viabilidade celular por MTS em GI-261 após 24 de incubação com 5, 12,5 e 25 μ M do composto **11a**. O DMSO foi utilizado como controlo (fold change = 1). Os dados representam a média \pm SEM de três experiências independentes.

Como se pode observar no gráfico da Figura 2.14, após 24 h da incubação do composto **11a**, quase não existem alterações na viabilidade celular. Enquanto que nas NSCs a manutenção da viabilidade era um fator chave, neste caso, se a viabilidade diminuísse, até poderia ser um resultado promissor uma vez que estas células (GI-261) são células cancerígenas. Uma vez que células diferenciadas são menos resistentes à quimioterapia avaliou-se a capacidade de indução de diferenciação do composto **11a** em GI-261.

Nos gráficos da figura 2.15 estão representados os níveis proteicos de SOX2 (A) e β III-tubulina (B) depois de 24 horas de incubação com o composto 11a. Como se pode observar, os níveis de SOX2 diminuíram consideravelmente com a presença de 25 μ M do composto 11a. Pelo contrário, uma ligeira alteração nos níveis de β III-tubulina foi apenas verificada a 12,5 μ M, não sendo no entanto significativa. Ainda assim, com a redução dos níveis proteicos de SOX2, pode afirmar-se que o composto tem a capacidade de reduzir eficazmente o estado de indiferenciação das células de glioma, possivelmente podendo torna-las mais sensíveis à quimioterapia.

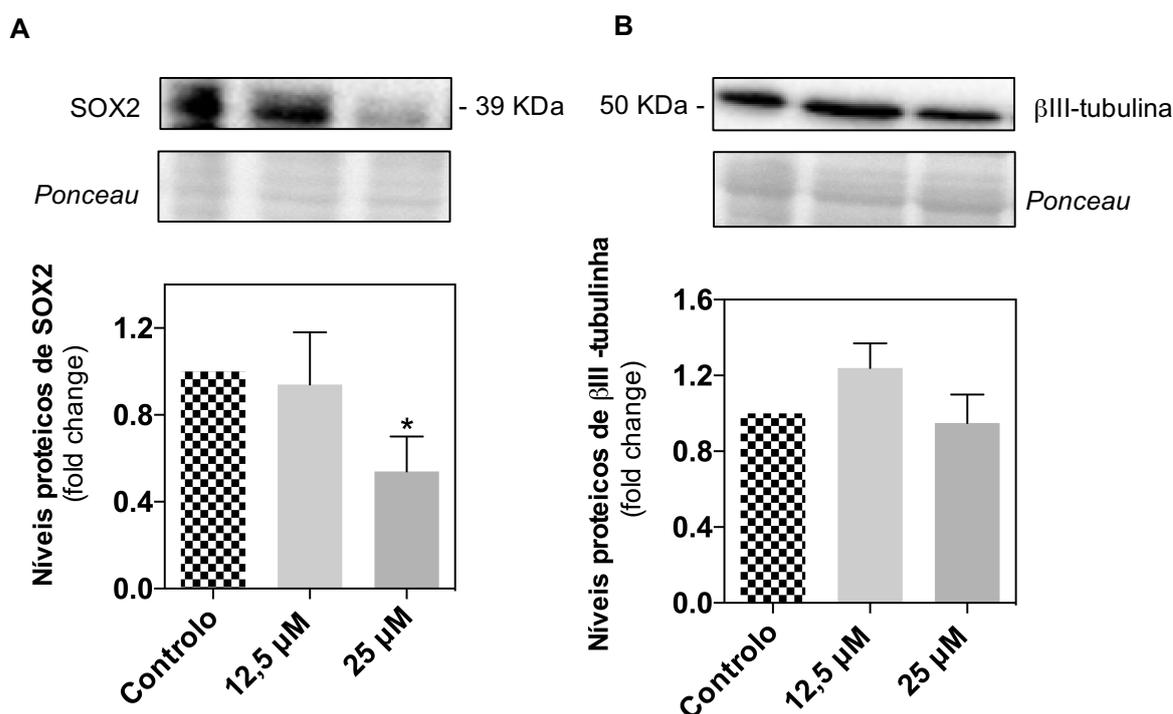


Figura 2.15 – Efeito do composto 11a, às concentrações de 12,5 e 25 μ M, nos níveis das proteínas SOX2 (A) β III-tubulina (B). Níveis proteicos quantificados a partir do isolamento de proteínas totais de células de glioma (G1261) depois de 24 horas de incubação com o composto. O DMSO foi utilizado como controlo e normalização feita com *ponceau*. Dados representam a média \pm SEM de três experiências independentes. * $p < 0.05$.

3. Conclusões e perspectivas futuras

O cancro continua a ser uma das principais causas de morte em todo mundo sendo, por isso, necessário e urgente o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Este projeto teve como objetivo a descoberta de novas moléculas com potencial de diferenciação neural para possível aplicação futura em células tumorais neurais de modo a torna-las menos resistentes à terapia. Uma vez que a abordagem da diferenciação celular se encontra em ascensão, o nosso intuito foi o estudo da diferenciação celular através da modulação da p53 em diferentes linhas celulares sendo que, para esse efeito, foi sintetizada uma biblioteca de spiropirazolina oxindóis, cuja capacidade em inibir a interação p53-MDM2 já tinha sido anteriormente demonstrada.

Na primeira fase de síntese dos compostos, pode afirmar-se que, aquando da cicloadição 1,3-dipolar, o regioisómero formado é o regioisómero pretendido através da análise do espectro de RMN de ^{13}C , uma vez que o sinal do carbono spiro a 77 ppm é característico apenas de um regioisómero. Depois da síntese, foram efetuados estudos de estabilidade em DMSO onde se comprovou, através da análise dos espectros de RMN de ^1H , que o composto **11a** era estável em DMSO, no mínimo até 4 dias à temperatura ambiente. Adicionalmente, estudos realizados anteriormente no nosso grupo demonstraram que as spiropirazolina oxindóis são estáveis em PBS até 72 horas.

Depois do *screening* nas linhas celulares HCT116 p53^(+/+) e HCT116 p53^(-/-) observou-se que a presença de um halogéneo nas posições *meta* ou *para* do anel aromático do substituinte R₃ conferia uma maior citotoxicidade aos compostos, sendo o cloro o halogéneo que concedia uma maior citotoxicidade. Outro aspeto importante foi a verificação de seletividade para a linha celular HCT116 p53^(+/+) em três compostos (**11h**, **11i** e **11p**), todos eles com halogéneos na posição *para* do anel aromático do substituinte R₃, o que poderia indicar que esta é uma posição importante na interação com a MDM2.

A seletividade e o aumento de citotoxicidade apresentada por vários compostos na presença de halogéneos no anel aromático do substituinte R₃ leva-nos a afirmar que, com estes halogéneos, o local de ligação da Phe19 é melhor preenchido melhorando a interação composto-MDM2.

Quanto ao potencial de diferenciação celular, o composto **11a** mostrou capacidade de indução de diferenciação em NSCs depois de 24 h de incubação através da redução dos níveis de SOX2 e do aumento dos níveis de β III-tubulina. Visto que, na presença do composto, os níveis proteicos de p53 aumentam quando as NCSs se encontram quer em condições de auto-renovação quer em processo de diferenciação e, como se observaram apenas alterações nos níveis proteicos de SOX2 e β III-tubulina em processo de diferenciação, pode concluir-se que apenas o efeito da p53 não é suficiente para induzir diferenciação quando as NCSs se encontram em condições de auto-renovação.

Na linha celular GI-261, depois de 24 horas de incubação com o composto **11a**, apesar de não se registarem alterações significativas nos níveis proteicos de β III-tubulina, notou-se uma

diminuição nos níveis de SOX2, o que indica a diminuição do estado de indiferenciação desta linha celular. Visto que o composto **11a** induz uma diminuição do estado de indiferenciação, as células podem tornar-se mais sensíveis à quimioterapia, pelo que este aspeto vai ser avaliado futuramente.

O estudo do mecanismo de ação dos compostos irá ser realizado futuramente através de um ensaio de complementação de fluorescência biomolecular (BiFC).

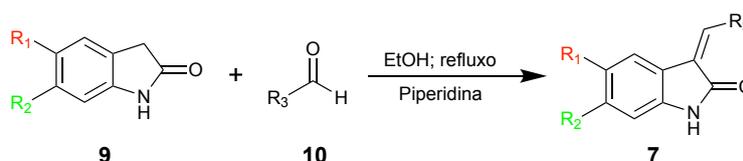
Em suma, identificou-se uma spiropirazolina oxindole **11a** potencialmente ativador e estabilizador da proteína p53 e com a capacidade de induzir diferenciação nas NSCs quando estas se encontram em processo de diferenciação. Notavelmente, esta spiropirazolina oxindole, mostrou capacidade de redução do estado indiferenciado de células cancerígenas de glioma através da diminuição dos níveis proteicos de SOX2, tornando-as, eventualmente, mais sensíveis à quimioterapia.

4. Materiais e métodos

Todos os reagentes foram obtidos através fornecedores comerciais e foram utilizados sem purificação adicional. Os solventes também foram obtidos através de fornecedores comerciais e foram destilados antes de serem utilizados. Quando utilizado como solventes de reação, o diclorometano foi seco com CaCl_2 e destilado; o THF foi destilado a partir do sistema de sódio benzofenona. A trietilamina foi destilada e armazenada com molecular sieves. A cromatografia em camada fina foi realizada utilizando placas de alumínio Merck Silica Gel 60 F254, visualizadas por luz UV. A cromatografia em coluna foi realizada com Merck Silica Gel (200-400 mesh ASTM). As preparativas foram realizadas com Merck Silica Gel 60 GF254 sobre placas de vidro.

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos através de um Bruker 300 Ultra-Shield a 300 MHz (^1H RMN) e 75 MHz (^{13}C RMN). Os desvios químicos de ^1H e ^{13}C (δ) são expressos em partes por milhão (ppm) usando o solvente como referência interna e as constantes de acoplamento dos prótons (J) em hertz (Hz). Os dados espectrais ^1H são relatados da seguinte forma: deslocamento químico, multiplicidade, constante de acoplamento e integração. Todos os compostos apresentaram uma pureza $\geq 95\%$ por LC-MS sendo que a cromatografia líquida foi realizada a 20°C , num HPCL Waters Alliance 2695 com uma coluna Sunfire C18 (2.1x100mm; 5 μm) utilizando como fase móvel uma solução de água com 0,5% de ácido fórmico em acetonitrilo (30:70) e usando um detetor de fotiodo para examinar a absorção dos comprimentos de onda entre 210 e 780 nm. Experiências de espectrometria de massa foram realizadas num espectrómetro de massa Micromass® Quattro Micro (Waters®, Ireland) com uma electropulverização em modo de iões (ESI+), fonte de iões a 120°C , voltagem dos capilares de 3.0 kV e fonte de voltagem de 30V.

4.1 Procedimento para síntese das 3-metilenoindolinonas 7a-j



Esquema 4.1 - Procedimento geral para síntese das 3-metilenoindolinonas 7a-j.

Síntese da 3-benzilideno-6-cloro-5-fluoroindolina-2-ona (7a)

A uma solução de 6-cloro-5-fluoro-2-indolinona (47mg; 0,25mmol) em 6ml etanol, foi adicionado benzaldeído (28 μ L; 1,1 eq.) e piperidina (27 μ L; 1 eq.). Colocou-se a mistura reacional em refluxo durante 1:30 h, sob atmosfera de azoto. No final da reação, a mistura foi colocada em banho de gelo, tendo o produto precipitado. O produto foi filtrado a vácuo com etanol frio obtendo-se um sólido amarelo (7a).^{47 58}

Síntese da 3-(2-bromobenzilideno)-6-cloro-5-fluoroindolina-2-ona (7b)

A uma solução de 6-cloro-5-fluoro-2-indolinona (28mg; 0,15mmol) em 6mL etanol, foi adicionado 2-bromobenzaldeído (21 μ L; 1,1 eq.) e piperidina (18 μ L; 1 eq.). Colocou-se a mistura reacional em refluxo durante 1 h, sob atmosfera de azoto. No final da reação, a mistura foi colocada em banho de gelo, tendo o produto precipitado. O produto foi filtrado a vácuo com etanol frio obtendo-se um sólido cor de laranja (7b).

Síntese da 3-(3-bromobenzilideno)-6-cloro-5-fluoroindolina-2-ona (7c)

A uma solução de 6-cloro-5-fluoro-2-indolinona (39mg; 0,21mmol) em 6mL etanol, foi adicionado 3-bromobenzaldeído (30 μ L; 1,1 eq.) e piperidina (25 μ L; 1 eq.). Colocou-se a mistura reacional em refluxo durante 1:30 h, sob atmosfera de azoto. No final da reação, a mistura foi colocada em banho de gelo, tendo o produto precipitado. O produto foi filtrado a vácuo com etanol frio obtendo-se um sólido amarelo (7c).

Síntese da 3-(4-bromobenzilideno)-6-cloro-5-fluoroindolina-2-ona (7d)

A uma solução de 6-cloro-5-fluoro-2-indolinona (35mg; 0,19mmol) em 6mL etanol, foi adicionado 4-bromobenzaldeído (25 μ L; 1,1 eq.) e piperidina (20 μ L; 1 eq.). Colocou-se a mistura reacional em refluxo durante 1 h, sob atmosfera de azoto. No final da reação, a mistura foi colocada em banho de gelo, tendo o produto precipitado. O produto foi filtrado a vácuo com etanol frio obtendo-se um sólido cor de laranja (7d).

Síntese da 3-(2-fluorobenzilideno)-6-cloro-5-fluoroindolina-2-ona (7e)

A uma solução de 6-cloro-5-fluoro-2-indolinona (110mg; 0,59mmol) em 6mL etanol, foi adicionado 2-fluorbenzaldeído (69 μ L; 1,1 eq.) e piperidina (65 μ L; 1 eq.). Colocou-se a mistura reacional em refluxo durante 1:30 h, sob atmosfera de azoto. No final da reação, a mistura foi colocada em banho de gelo, tendo o produto precipitado. O produto foi filtrado a vácuo com etanol frio obtendo-se um sólido cor de laranja (7e).

Síntese da 3-(4-fluorobenzilideno)-6-cloro-5-fluoroindolina-2-ona (7f)

A uma solução de 6-cloro-5-fluoro-2-indolinona (30mg; 0,16mmol) em 6mL etanol, foi adicionado 4-fluorbenzaldeído (22 μ L; 1,1 eq.) e piperidina (16 μ L; 1 eq.). Colocou-se a mistura reacional em refluxo durante 2:30 h, sob atmosfera de azoto. No final da reação, a mistura foi colocada em banho de gelo, tendo o produto precipitado. O produto foi filtrado a vácuo com etanol frio obtendo-se um sólido amarelo (7f).

Síntese da 3-(3-clorobenzilideno)-6-cloro-5-fluoroindolina-2-ona (7g)

A uma solução de 6-cloro-5-fluoro-2-indolinona (34mg; 0,18mmol) em 6mL etanol, foi adicionado 3-clorobenzaldeído (22 μ L; 1,1 eq.) e piperidina (19 μ L; 1 eq.). Colocou-se a mistura reacional em refluxo durante 2:30 h, sob atmosfera de azoto. No final da reação, a mistura foi colocada em banho de gelo, tendo o produto precipitado. O produto foi filtrado a vácuo com etanol frio obtendo-se um sólido cor de laranja (7g).

Síntese da 3-(4-clorobenzilideno)-6-cloro-5-fluoroindolina-2-ona (7h)

A uma solução de 6-cloro-5-fluoro-2-indolinona (39mg; 0,21mmol) em 6mL etanol, foi adicionado 4-clorobenzaldeído (36mg; 1,1 eq.) e piperidina (24 μ L; 1 eq.). Colocou-se a mistura reacional em refluxo durante 1 h, sob atmosfera de azoto. No final da reação, a mistura foi colocada em banho de gelo, tendo o produto precipitado. O produto foi filtrado a vácuo com etanol frio obtendo-se um sólido cor de laranja (7h).

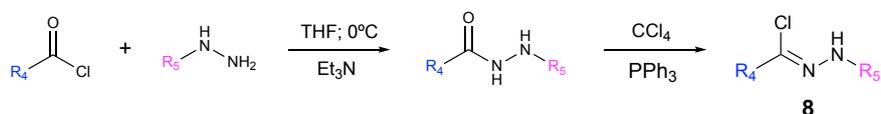
Síntese da 3-(2-cloro-3-fluorobenzilideno)-6-cloro-5-fluoroindolina-2-ona (7i)

A uma solução de 6-cloro-5-fluoro-2-indolinona (50mg; 0,27mmol) em 6mL etanol, foi adicionado 2-cloro-3-fluorbenzaldeído (35mg; 1,1 eq.) e piperidina 364 μ L; 1 eq.). Colocou-se a mistura reacional em refluxo durante 1:30 h, sob atmosfera de azoto. No final da reação, a mistura foi colocada em banho de gelo, tendo o produto precipitado. O produto foi filtrado a vácuo com etanol frio obtendo-se um sólido amarelo(7i).

Síntese da 3-(2-cloro-3-fluorobenzilideno)-6-cloroindolina-2-ona (7j)

A uma solução de 6-cloro -2-indolinona (49mg; 0,29mmol) em 6mL etanol, foi adicionado 2-cloro-3-fluorbenzaldeído (38mg; 1,1 eq.) e piperidina (31 μ L; 1 eq.). Colocou-se a mistura reacional em refluxo durante 1 h, sob atmosfera de azoto. No final da reação, a mistura foi colocada em banho de gelo, tendo o produto precipitado. O produto foi filtrado a vácuo com etanol frio obtendo-se um sólido cor de laranja (7j).

4.2 Procedimento para a síntese dos cloretos de hidrazonilo 8a-c



Esquema 4.2 - Procedimento geral para a síntese dos cloretos de hidrazonilo **8a-c**.

Procedimento para a síntese de cloreto N-fenilpivaloilhidrazonilo (**8a**)

A uma solução de fenilhidrazina (1mL; 10mmol) em 15mL THF seco, adicionou-se trietilamina (2,7mL; 2 eq.), em banho de gelo e sob atmosfera inerte. Após agitação durante 10 minutos, adicionou-se, gota a gota, também em banho de gelo, cloreto de trimetilacetil (1,4mL; 1,2 eq.).⁵⁹ Depois de 24h, foi adicionada água (15mL) à mistura reacional. De seguida, adicionou-se AcOEt (15mL) e separaram-se as fases, lavando a fase aquosa mais duas vezes com AcOEt (15mL). Todas as fases orgânicas foram extraídas três vezes com uma solução saturada de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e secas com sulfato de sódio (Na₂SO₄). Finalmente, a fase orgânica foi evaporada no evaporador rotativo.

De seguida, adicionou-se trifetilfosfina (4,8g; 2,5 eq.) a uma solução da hidrazona (1,4g; 7,4mmol) obtida no passo anterior dissolvida em acetonitrilo (15mL). Após 30 minutos de agitação, adicionou-se tetracloreto de carbono (1,81mL; 2,5eq.), à temperatura ambiente sob atmosfera de azoto. Depois de 24 horas, o solvente foi evaporado no evaporador rotativo. Por fim, a mistura reacional foi purificada por cromatografia flash usando eluente n-hexano/EtOAc (4:1) obtendo-se um óleo avermelhado (**8a**).⁶⁰

Procedimento para a síntese de cloreto N-(4-clorofenil)pivaloilhidrazonilo (**8b**)

A uma solução de 4-clorofenilhidrazina (509mg; 3,5mmol) em 15mL THF seco, adicionou-se trietilamina (995µL; 2 eq.), em banho de gelo e sob atmosfera inerte. Após agitação durante 10 minutos, adicionou-se, gota a gota, também em banho de gelo, cloreto de trimetilacetil (516µL; 1,2 eq.). Depois de 24h, foi adicionada água (15mL) à mistura reacional. De seguida, adicionou-se AcOEt (15mL) e separaram-se as fases, lavando a fase aquosa mais duas vezes com AcOEt (15mL). Todas as fases orgânicas foram extraídas três vezes com uma solução saturada de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e secas com sulfato de sódio (Na₂SO₄). Finalmente, a fase orgânica foi evaporada no evaporador rotativo.

De seguida, adicionou-se trifetilfosfina (2,2g; 2,5 eq.) a uma solução da hidrazona (664mg; 3,4mmol) obtida no passo anterior dissolvida em acetonitrilo (15mL). Após 30 minutos de agitação, adicionou-se tetracloreto de carbono (842µL; 2,5 eq.), à temperatura ambiente sob atmosfera de azoto. Depois de 24 horas, o solvente foi evaporado no evaporador rotativo. Por

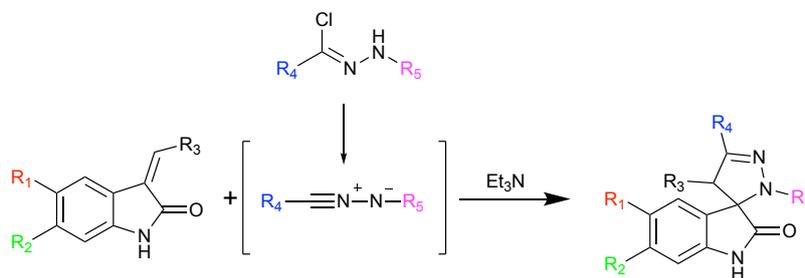
fim, a mistura reacional foi purificada por cromatografia flash usando eluente n-hexano/EtOAc (4:1) obtendo-se um sólido cor de rosa (**8b**).

Procedimento para a síntese de cloreto N-(4-clorofenil)benzoílhidrazonilo (**8c**)

A uma solução de 4-clorofenilhidrazina (509mg; 3,5mmol) em 15mL THF seco, adicionou-se trietilamina (995 μ L; 2 eq.), em banho de gelo e sob atmosfera inerte. Após agitação durante 10 minutos, adicionou-se, gota a gota, também em banho de gelo, cloreto de benzoílo (487 μ L; 1,2 eq.). Depois de 24h, foi adicionada água (15mL) à mistura reacional. De seguida, adicionou-se AcOEt (15mL) e separaram-se as fases, lavando a fase aquosa mais duas vezes com AcOEt (15mL). Todas as fases orgânicas foram extraídas três vezes com uma solução saturada de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e secas com sulfato de sódio (Na₂SO₄). Finalmente, a fase orgânica foi evaporada no evaporador rotativo.

De seguida, adicionou-se trifenilfosfina (1,62g; 2,5 eq.) a uma solução da hidrazona (612mg; 2,4mmol) obtida no passo anterior dissolvida em acetonitrilo (15mL). Após 30 minutos de agitação, adicionou-se tetracloreto de carbono (584 μ L; 2,5 eq.), à temperatura ambiente sob atmosfera de azoto. Depois de 24 horas, o solvente foi evaporado no evaporador rotativo. Por fim, a mistura reacional foi purificada por cromatografia flash usando eluente n-hexano/EtOAc (4:1) obtendo-se um sólido avermelhado (**8c**).

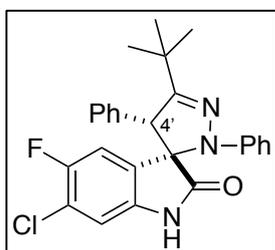
4.3 Procedimento geral para a síntese das spiropirazolina oxindóis 11a-u



Esquema 4.3 - Procedimento geral para a síntese das spiropirazolina oxindóis **11a-c**.

A uma solução de 3-metilenoindolinona (diferentemente substituídas na posição 3) dissolvida em diclorometano seco, adicionou-se um cloreto de hidrazonilo (1,2 eq) e trietilamina (2 eq.), à

temperatura ambiente e sob atmosfera de azoto. Depois de aproximadamente, 16 horas, foi adicionada água à mistura reacional. As fases foram separadas e a fase aquosa extraída três vezes com acetato de etilo. As fases orgânicas foram secas com sulfato de sódio (Na₂SO₄) e o solvente foi evaporado no evaporador rotativo. A mistura reacional foi purificada por cromatografia em coluna com eluente n-hexano/AcOEt (4:1) obtendo-se a spiropirazolina oxindole final.



5'-(*tert-butil*)-6-cloro-5-fluoro-2',4'-difenil-2',4'-dihidrospiro[indolina-3,3'-pirazol]-2-ona (**11a**)

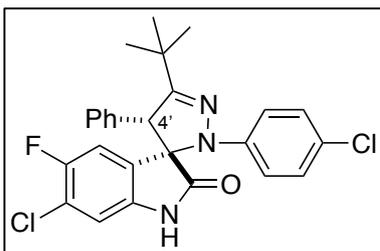
Seguindo o procedimento geral, a uma solução de **7a** (0,0408g; 0,18mmol) em CH₂Cl₂ (10mL) foi adicionado **8a** (0,0398g; 1,2 eq.) e Et₃N (31μL; 3 eq.). Tempo de reação: 16 horas. Mistura reacional purificada por cromatografia flash (eluente: n-hexano/AcOEt 4:1) e recristalização com CH₂Cl₂/Heptano para obter o composto **11a** na forma de sólido branco (0,041g; 92%)

Ponto de fusão: 240-242° C

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,14 (s, NH); 7,46 – 7,29 (m, 3H, ArH); 7,11 – 7,05 (m, 2H, ArH); 6,88 – 6,64 (m, 6H, ArH); 6,00 (d, J= 9Hz, 1H, ArH); 4,45 (s, 1H, H-4'); 1,18 (s, 9H, (C(CH₃)₃)).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 177 (C=O); 161 (C=N); 155 (d, J_{C-F}=243Hz); 145 (Cq); 138 (Cq); 136 (Cq); 134 (Cq); 129 (CH); 128 (CH); 121 (d, J=19,5Hz); 116 (Cq); 115 (d, J=24,75Hz); 111,92 (CH); 77 (Cspiro); 62 (CH-4'); 34 (C(CH₃)₃); 29 (C(CH₃)₃).

MS (ESI+) *m/z* C₂₆H₂₄ClFN₃O: 448 [M+H]⁺.



5'-(*tert-butil*)-6-cloro-2'-(4-clorofenil)-5-fluoro-4'-fenil-2',4'-dihidrospiro[indolina-3,3'-pirazol]-2-ona (**11b**)

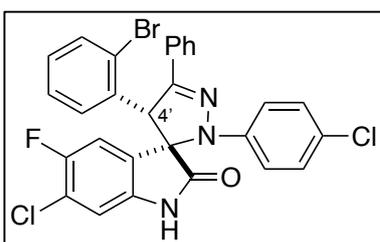
Seguindo o procedimento geral, a uma solução de **7a** (0,0254g; 0,093mmol) em CH₂Cl₂ (10mL) foi adicionado **8b** (0,0272g; 1,2 eq.) e Et₃N (38,8μL; 3 eq.). Tempo de reação: 18 horas. Mistura reacional purificada por cromatografia flash (eluente: n-hexano/AcOEt 4:1) e recristalização com CH₂Cl₂/Heptano para obter o composto **11b** na forma de sólido branco (0,021g; 70%)

Ponto de fusão: 220-222° C

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,19 (s, NH) 7,41 – 7,29 (m, 4H, ArH); 7,05 (d, J=9 Hz, 2H, ArH); 6,81 (d, J= 6 Hz, 1H, ArH); 6,75 - 6,68 (m, 3H, ArH); 6,01 (d, J= 9Hz, 1H, ArH); 4,46 (s, 1H, H-4'); 1,18 (s, 9H, (C(CH₃)₃)).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 177 (C=O); 162 (C=N); 155 (d, J_{C-F}=243Hz) 144 (Cq); 136 (Cq); 134 (Cq); 129 (CH); 128 (CH); 126 (Cq); 125 (d, J=7,5Hz); 122 (d, J=19,5Hz); 117 (CH); 115 (d, J=25,5Hz); 112 (CH); 77 (Cspiro); 62 (CH-4'); 34 (C(CH₃)₃); 29 (C(CH₃)₃).

MS (ESI+) *m/z* C₂₆H₂₃Cl₂FN₃O: 482 [M+H]⁺.



(4'-(2-bromofenil)-6-cloro-2'-(4-clorofenil)-5-fluoro-5'-fenil-2',4'-dihidrospiro[indolina-3,3'-pirazol]-2-ona (**11c**)

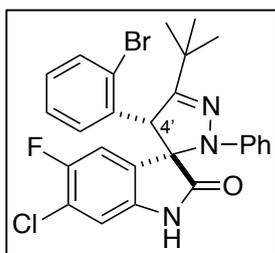
Seguindo o procedimento geral, a uma solução de **7b** (0,0538g; 0,15mmol) em CH₂Cl₂ (10mL) foi adicionado **8c** (0,042g; 1,4 eq.) e Et₃N (62,5μL; 3 eq.). Tempo de reação: 18 horas. Mistura reacional purificada por cromatografia flash (eluente: n-hexano/AcOEt 4:1) e recristalização com CH₂Cl₂/Heptano para obter o composto **11c** na forma de sólido branco (0,0397g; 67%)

Ponto de fusão: 241-242° C

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,8 (s, 1H, NH); 7,63 – 7,60 (m, 2H, ArH); 7,48 (d, J=6Hz, 1H, ArH); 7,34 – 7,29 (m, 3H, ArH); 7,25 – 7,07 (m, 5H, ArH); 6,93 – 6,89 (m, 1H, ArH); 6,85 (d, J=9 Hz, 2H, ArH); 6,0 (d, J= 9Hz, 1H, ArH); 5,67 (s, 1H, H-4');

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 176 (C=O); 162 (C=N); 155 (d, $J_{\text{C-F}}=263,25\text{Hz}$); 150 (Cq); 142 (Cq); 137 (Cq); 133 (Cq); 133 (Cq); 130 (CH); 129 (CH); 128 (CH); 126 (CH); 125 (d, J =15,75Hz); 117 (CH); 115 (d, J =26,25Hz) 112 (CH); 77 (Cspiro); 60 (CH-4').

MS (ESI+) m/z $\text{C}_{28}\text{H}_{18}\text{BrCl}_2\text{FN}_3\text{O}$: 580 $[\text{M}+\text{H}]^+$.



4'-(2-bromofenil)-5'-(*terc-butil*)-6-cloro-5-fluoro-2'-fenil-2',4'-dihidrospiro[indolina-3,3'-pirazol]-2-ona (**11d**)

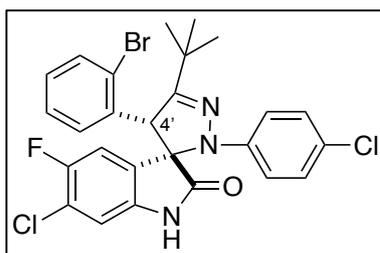
Seguindo o procedimento geral, a uma solução de **7b** (0,0426g; 0,12mmol) em CH_2Cl_2 (10mL) foi adicionado **8a** (0,0388g; 1,4 eq.) e Et_3N (50,1 μL ; 3 eq.). Tempo de reação: 18 horas. Mistura reacional purificada por cromatografia flash (eluente: n-hexano/AcOEt 4:1) e recristalização com CH_2Cl_2 /Heptano para obter o composto **11d** na forma de sólido branco (0,0222g; 53%)

Ponto de fusão: 243-245° C

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,04 (s, NH) 7,48 – 7,28 (m, 3H, ArH); 7,21 – 7,15 (m, 1H, ArH); 7,08 (t, J=9Hz, 2H, ArH) 6,93 – 6,80 (m, 4H, ArH); 5,90 (d, J= 9Hz, 1H, ArH); 5,11 (s, 1H, H-4'); 1,20 (s, 9H, ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$)).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 176 (C=O); 161 (C=N); 155 (d, $J_{\text{C-F}}=243\text{Hz}$) 145 (Cq); 137 (Cq); 133 (Cq); 133 (Cq); 130 (CH); 130 (CH); 129 (CH); 127 (CH); 125 (d, J =7,5Hz) 121 (CH); 116 (CH); 114 (d, J =25,5Hz) 112 (CH); 77 (Cspiro); 60 (CH-4'); 34 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 29,48 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

MS (ESI+) m/z $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{BrClFN}_3\text{O}$: 526 $[\text{M}+\text{H}]^+$.



4'-(2-bromofenil)-5'-(*tert-butil*)-6-cloro-2'-(4-clorofenil)-5-fluoro-2',4'-dihidrospiro[indolina-3,3'-pirazol]-2-ona (**11e**)

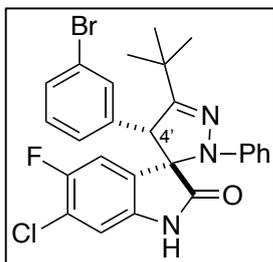
Seguindo o procedimento geral, a uma solução de **7b** (0,0448g; 0,13mmol) em CH₂Cl₂ (10mL) foi adicionado **8b** (0,0389g; 1,2 eq.) e Et₃N (54,4μL; 3 eq.). Tempo de reação: 24 horas. Mistura reacional purificada por cromatografia flash (eluente: n-hexano/AcOEt 4:1) e recristalização com CH₂Cl₂/Heptano para obter o composto **11e** na forma de sólido branco (0,0147g; 30%)

Ponto de fusão: 251-252° C

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,51 (br s, 1H, NH); 7,49 – 7,39 (m, 2H, ArH) 7,33 – 7,30 (m, 1H, ArH); 7,22 – 7,17 (m, 1H, ArH); 7,05 (d, J=9 Hz, 2H, ArH); 6,85 (d, J=6 Hz, 1H, ArH); 6,75 (d, J=9 Hz, 2H, ArH); 5,88 (d, J= 9Hz, 1H, ArH); 5,12 (s, 1H, H-4'); 1,19 (s, 9H, (C(CH₃)₃)).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 175 (C=O); 162 (C=N); 155 (d, J_{C-F} =241,5Hz) 144 (Cq); 137 (Cq); 133 (Cq); 130 (CH); 130 (CH); 129 (CH); 127 (CH); 127 (CH); 125 (CH); 118 (CH); 114 (d, J=24,75Hz) 111 (CH); 77 (Cspiro); 60 (CH-4'); 34 (C(CH₃)₃); 29 (C(CH₃)₃).

MS (ESI+) *m/z* C₂₆H₂₂BrCl₂FN₃O: 560 [M+H]⁺.



4'-(3-bromofenil)-5'-(*tert-butil*)-6-cloro-5-fluoro-2'-fenil-2',4'-dihidrospiro[indolina-3,3'-pirazol]-2-ona (**11f**)

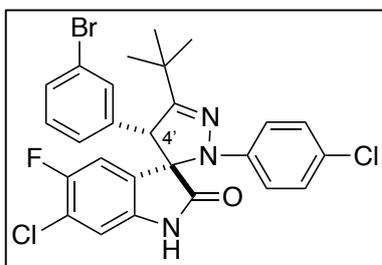
Seguindo o procedimento geral, a uma solução de **7c** (0,0582g; 0,165mmol) em CH₂Cl₂ (10mL) foi adicionado **8a** (0,0522g; 1,4 eq.) e Et₃N (69μL; 3 eq.). Tempo de reação: 18 horas. Mistura reacional purificada por cromatografia flash (eluente: n-hexano/AcOEt 4:1) e recristalização com CH₂Cl₂/Heptano para obter o composto **11f** na forma de sólido branco (0,030g; 52%)

Ponto de fusão: 220-222° C

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,61 (s, NH); 7,48 – 7,44 (m, 2H, ArH); 7,13 – 7,06 (m, 3H, ArH); 6,89 – 6,75 (m, 5H, ArH); 6,10 (d, $J=9\text{Hz}$, 1H, ArH); 4,40 (s, 1H, H-4'); 1,18 (s, 9H, $(\text{C}(\text{CH}_3)_3)$).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 177 (C=O); 161 (C=N); 155 (d, $J_{\text{C-F}}=243,75\text{Hz}$); 145 (Cq); 136 (Cq); 131 (CH); 129 (CH); 125 (Cq); 123 (CH); 121 (CH); 116 (CH); 115 (d, $J=23,25\text{Hz}$); 113 (Cq); 112 (CH); 77 (Cspiro); 61 (CH-4'); 34 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 29 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

MS (ESI+) m/z $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{BrClFN}_3\text{O}$: 526 $[\text{M}+\text{H}]^+$.



4'-(3-bromofenil)-5'-(*terc-butil*)-6-cloro-2'-(4-clorofenil)-5-fluoro-2',4'-dihidrospiro[indolina-3,3'-pirazol]-2-ona (**11g**)

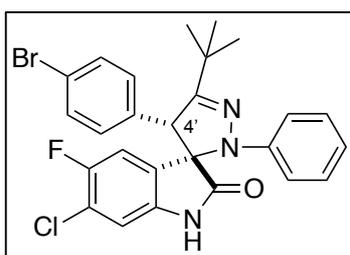
Seguindo o procedimento geral, a uma solução de **7d** (0,0568g; 0,17mmol) em CH_2Cl_2 (10mL) foi adicionado **8b** (0,062g; 1,4 eq.) e Et_3N (71 μL ; 3 eq.). Tempo de reação: 17 horas. Mistura reacional purificada por cromatografia flash (eluente: n-hexano/AcOEt 4:1) e recristalização com CH_2Cl_2 /Heptano para obter o composto **11g** na forma de sólido branco (0,068g; 72%)

Ponto de fusão: 201-203° C

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,37 (s, NH); 7,48 – 7,45 (m, 2H, ArH); 7,11 – 7,01 (m, 4H, ArH); 6,84 (d, $J=6\text{Hz}$, 1H, ArH); 6,75 – 6,62 (m, 3H, ArH); 6,05 (d, $J=9\text{Hz}$, 1H, ArH); 4,39 (s, 1H, H-4'); 1,18 (s, 9H, $(\text{C}(\text{CH}_3)_3)$).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 177 (C=O); 162 (C=N); 155 (d, $J_{\text{C-F}}=243,75\text{Hz}$); 143 (Cq); 142 (Cq); 136 (Cq); 132 (CH); 129 (CH); 125 (d, $J=8,25\text{Hz}$); 123 (CH); 117 (CH); 115 (d, $J=32,25\text{Hz}$); 113 (Cq); 112 (CH); 77 (Cspiro); 61 (CH-4'); 35 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 29 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

MS (ESI+) m/z $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{BrCl}_2\text{FN}_3\text{O}$: 560 $[\text{M}+\text{H}]^+$.



4'-(4-bromofenil)-5'-(*tert-butil*)-6-cloro-5-fluoro-2'-fenil-2',4'-dihidrospiro[indolina-3,3'-pirazol]-2-ona (**11h**)

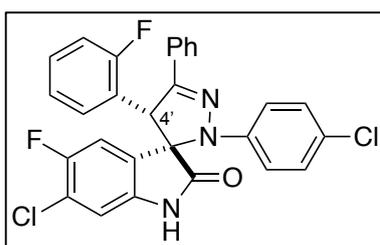
Seguindo o procedimento geral, a uma solução de **7d** (0,02g; 0,059mmol) em CH₂Cl₂ (10mL) foi adicionado **8a** (0,0179g; 1,2 eq.) e Et₃N (24,7μL; 3 eq.). Tempo de reação: 17 horas. Mistura reacional purificada por cromatografia flash (eluente: n-hexano/AcOEt 4:1) e recristalização com CH₂Cl₂/Heptano para obter o composto **11h** na forma de sólido branco (0,0143g; 65%)

Ponto de fusão: 209-2011° C

¹H-RMN (300 MHz, (CD₃)₂CO) δ (ppm): 9,69 (s, 1H, NH); 7,56 – 7,35 (m, 4H, ArH); 7,10-7,04 (m, 3H, ArH); 6,85-6,77 (m, 3H, ArH); 6,15 (d, J= 9Hz, 1H, ArH); 4,81 (s, 1H, H-4'); 1,17 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C NMR (75 MHz, (CD₃)₂CO) δ (ppm): 176 (C=O); 162 (C=N); 155 (d, J_{C-F}=240Hz); 146 (Cq); 139 (Cq); 132 (CH); 129 (CH); 127 (d, J=7,5Hz); 123 (CH); 121 (CH); 116 (CH); 115 (d, J=24,75Hz); 112 (CH); 77 (Cspiro); 62 (CH-4'); 35 (C(CH₃)₃); 29 (C(CH₃)₃).

MS (ESI+) *m/z* C₂₆H₂₃BrClFN₃O: 526 [M+H]⁺.



6-cloro-2'-(4-clorofenil)-5-fluoro-4'-(2-fluorofenil)-5'-fenil-2',4'-dihidrospiro[indolina-3,3'-pirazol]-2-ona (**11i**)

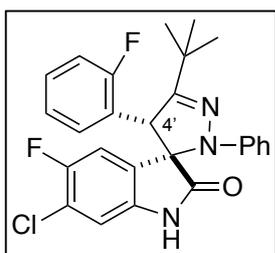
Seguindo o procedimento geral, a uma solução de **7e** (0,025g; 0,086mmol) em CH₂Cl₂ (10mL) foi adicionado **8c** (0,039g; 2 eq.) e Et₃N (36μL; 3 eq.). Tempo de reação: 17 horas. Mistura reacional purificada por cromatografia flash (eluente: n-hexano/AcOEt 4:1) e recristalização com CH₂Cl₂/Heptano para obter o composto **11i** na forma de sólido branco (0,0251g; 83%)

Ponto de fusão: 243-245° C

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,88 (s, 1H, NH); 7,67 – 7,63 (m, 2H, ArH); 7,33-7,31 (m, 4H, ArH); 7,11-7,07 (m, 4H, ArH); 6,92-6,82 (m, 4H, ArH) 6,07 (d, $J=9\text{Hz}$, 1H, ArH); 5,51 (s, 1H, H-4');

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 176 (C=O); 161 (C=N); 155 (d, $J=256,5\text{Hz}$); 130 (Cq); 129 (CH); 129 (CH); 128 (Cq); 126 (CH); 125 (d, $J=6,75\text{Hz}$); 124 (Cq); 122 (d, $J_{\text{C-F}}=21,75\text{Hz}$); 121 (CH) 117 (CH); 114 (d, $J=24,75\text{Hz}$); 112 (CH); 77 (Cspiro); 54 (CH-4').

MS (ESI+) m/z $\text{C}_{28}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{F}_2\text{N}_3\text{O}$: 520 $[\text{M}+\text{H}]^+$.



5'-(*tert-butyl*)-6-cloro-5-fluoro-4'-(2-fluorofenil)-2'-fenil-2',4'-dihidrospiro[indolina-3,3'-pirazol]-2-ona (**11j**)

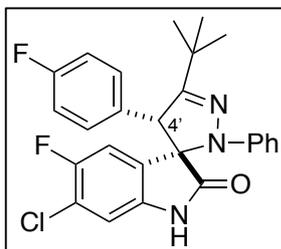
Seguindo o procedimento geral, a uma solução de **7e** (0,0561g; 0,19mmol) em CH_2Cl_2 (10mL) foi adicionado **8a** (0,0486g; 1,2 eq.) e Et_3N (79,3 μL ; 3 eq.). Tempo de reação: 18 horas. Mistura reacional purificada por cromatografia flash (eluente: n-hexano/AcOEt 4:1) e recristalização com CH_2Cl_2 /Heptano para obter o composto **11j** na forma de sólido branco (0,0658g; 74%)

Ponto de fusão: 210-211° C

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,65 (s, 1H, NH); 7,24 – 7,12 (m, 3H, ArH); 7,02 – 6,97 (m, 2H, ArH); 6,88 – 6,82 (m, 1H, ArH); 6,77 – 6,70 (m, 4H, ArH); 5,84 (d, $J=9\text{Hz}$, 1H, ArH); 4,81 (s, 1H, H-4'); 1,20 (s, 9H, $(\text{C}(\text{CH}_3)_3)$).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 177 (C=O); 161 (d, $J_{\text{C-F}}=246\text{Hz}$); 160 (C=N); 155 (d, $J_{\text{C-F}}=242,25\text{Hz}$); 145 (Cq); 137 (Cq); 130 (d, $J=8,25\text{Hz}$); 130 (d, $J=3\text{Hz}$); 129 (CH); 125 (d, $J=6,75\text{Hz}$); 124 (CH); 122 (Cq); 121 (CH); 116 (d, $J=21\text{Hz}$); 115 (CH); 114 (d, $J=26,25\text{Hz}$); 112 (CH); 77 (Cspiro); 53 (CH-4'); 34 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$); 29 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$).

MS (ESI+) m/z $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{ClF}_2\text{N}_3\text{O}$: 466 $[\text{M}+\text{H}]^+$.



5'-(*tert-butil*)-6-cloro-5-fluoro-4'-(4-fluorofenil)-2'-fenil-2',4'-dihidrospiro[indolina-3,3'-pirazol]-2-ona (**11k**)

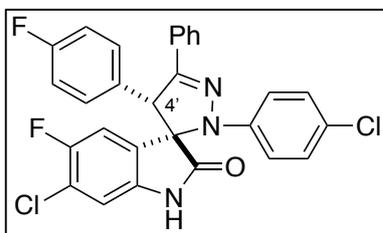
Seguindo o procedimento geral, a uma solução de **7f** (0,0279g; 0,096mmol) em CH₂Cl₂ (10mL) foi adicionado **8a** (0,0403g; 2 eq.) e Et₃N (40μL; 3 eq.). Tempo de reação: 17 horas. Mistura reacional purificada por cromatografia flash (eluente: n-hexano/AcOEt 4:1) e recristalização com CH₂Cl₂/Heptano para obter o composto **11k** na forma de sólido branco (0,0198g; 66%)

Ponto de fusão: 216-218° C

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,15 (s, 1H, NH) 7,12 – 7,02 (m, 4H, ArH); 6,87 – 6,75 (m, 5H, ArH); 6,05 (d, J= 9Hz, 1H, ArH); 4,43 (s, 1H, H-4'); 1,18 (s, 9H, (C(CH₃)₃)).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 177 (C=O); 161 (C=N); 161 (d, J_{C-F}=255Hz); 155 (d, J_{C-F}=243Hz); 145 (Cq); 143 (Cq); 136 (Cq); 130 (d, J=3Hz); 129 (CH); 125 (d, J=7,5Hz); 124 (CH); 122 (Cq); 121 (CH); 120 (Cq); 116 (CH); 115 (d, J=24,75Hz); 113 (CH); 112 (CH); 77 (Cspiro); 61 (CH-4'); 34 (C(CH₃)₃); 29 (C(CH₃)₃)

MS (ESI+) *m/z* C₂₆H₂₃ClF₂N₃O: 466 [M+H]⁺.



6-cloro-2'-(4-clorofenil)-5-fluoro-4'-(4-fluorofenil)-5'-fenil-2',4'-dihidrospiro[indolina-3,3'-pirazol]-2-ona (**11l**)

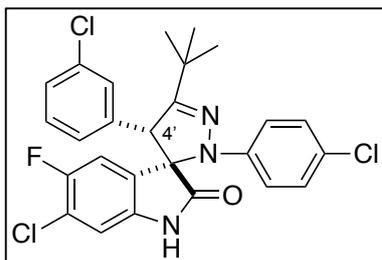
Seguindo o procedimento geral, a uma solução de **7f** (0,0432g; 0,16mmol) em CH₂Cl₂ (10mL) foi adicionado **8c** (0,0825g; 2 eq.) e Et₃N (67μL; 3 eq.). Tempo de reação: 19 horas. Mistura reacional purificada por cromatografia flash (eluente: n-hexano/AcOEt 4:1) e recristalização com CH₂Cl₂/Heptano para obter o composto **11l** na forma de sólido branco (0,0357g; 67%)

Ponto de fusão: 217-220° C

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,01 (s, 1H, NH); 7,63 – 7,60 (m, 2H, ArH); 7,32 – 7,28 (m, 3H, ArH); 7,10 (d, $J=9$ Hz, 2H, ArH); 6,95 – 6,82 (m, 7H, ArH); 6,21 (d, $J=9$ Hz, 1H, ArH); 5,14 (s, 1H, H-4');

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 177 (C=O); 161 (C=N); 155 (d, $J_{\text{C-F}}=264,75\text{Hz}$); 149 (Cq); 146 (Cq); 136 (Cq); 130 (d, $J=7,5\text{Hz}$); 129 (CH); 129 (CH); 128 (CH); 127 (Cq); 125 (d, $J=13,5\text{Hz}$); 123 (CH); 122 (Cq); 121 (CH); 120 (Cq); 117 (CH); 116 (d, $J=21\text{Hz}$); 115 (d, $J=25,5\text{Hz}$); 112 (CH); 77 (Cspiro); 62 (CH-4').

MS (ESI+) m/z $\text{C}_{28}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{F}_2\text{N}_3\text{O}$: 520 $[\text{M}+\text{H}]^+$.



5'-(*tert-butyl*)-6-cloro-4'-(3-clorofenil)-2'-(4-clorofenil)-5-fluoro-2',4'-dihidrospiro[indolina-3,3'-pirazol]-2-ona (**11m**)

Seguindo o procedimento geral, a uma solução de **7g** (0,0328g; 0,11mmol) em CH_2Cl_2 (10mL) foi adicionado **8b** (0,039g; 1,4 eq.) e Et_3N (67 μL ; 3 eq.). Tempo de reação:

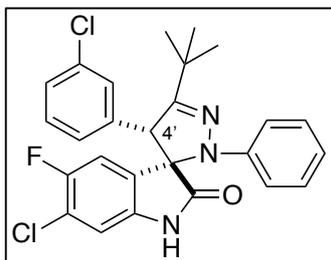
17horas. Mistura reacional purificada por cromatografia flash (eluente: n-hexano/AcOEt 4:1) e recristalização com CH_2Cl_2 /Heptano para obter o composto **11m** na forma de sólido branco (0,0347g; 94%)

Ponto de fusão: 169-171° C

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,29 (s, 1H, NH) 7,32 – 7,29 (m, 2H, ArH); 7,12 – 7,01 (m, 3H, ArH); 6,83 (d, $J=6$ Hz, 1H, ArH); 6,76 – 6,65(m, 3H, ArH); 6,06 (d, $J=9$ Hz, 1H, ArH); 4,41 (s, 1H, H-4'); 1,18 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 177 (C=O); 162 (C=N); 155 (d, $J_{\text{C-F}}=244,5\text{Hz}$); 143 (Cq); 136 (Cq); 135 (Cq); 129 (CH); 127 (Cq); 125 (d, $J=9,75\text{Hz}$); 117 (CH); 114 (d, $J=30,75\text{Hz}$); 112 (CH); 77 (Cspiro); 61 (CH-4'); 35 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 29 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

MS (ESI+) m/z $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{Cl}_3\text{FN}_3\text{O}$: 516 $[\text{M}+\text{H}]^+$.



5'-(*tert-butil*)-6-cloro-4'-(3-clorofenil)-5-fluoro-2'-fenil-2',4'-dihidrospiro[indolina-3,3'-pirazol]-2-ona (**11n**)

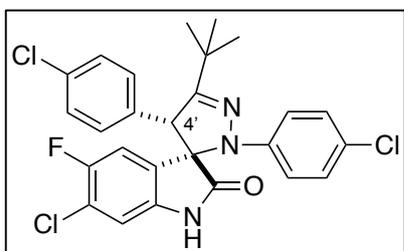
Seguindo o procedimento geral, a uma solução de **7g** (0,0409g; 0,13mmol) em CH₂Cl₂ (10mL) foi adicionado **8a** (0,0335g; 1,2 eq.) e Et₃N (54,3μL; 3 eq.). Tempo de reação: 17 horas. Mistura reacional purificada por cromatografia flash (eluente: n-hexano/AcOEt 4:1) e recristalização com CH₂Cl₂/Heptano para obter o composto **11n** na forma de sólido branco (0,0311g; 73%)

Ponto de fusão: 231-233° C

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,17 (s, 1H, NH); 7,37 – 7,29 (m, 2H, ArH); 7,12 – 7,00 (m, 3H, ArH); 6,88 – 6,69 (m, 5H, ArH); 6,08 (d, J= 9Hz, 1H, ArH); 4,41 (s, 1H, H-4'); 1,19 (s, 9H, (C(CH₃)₃)).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 177 (C=O); 161 (C=N); 155 (d, J_{C-F}=243,75Hz); 145 (Cq); 136 (Cq); 135 (Cq); 129 (CH); 125 (d, J=7,5Hz); 121 (CH); 118 (CH); 116 (CH); 115 (d, J=22,5Hz); 112 (CH); 77 (Cspiro); 61 (CH-4'); 34 (C(CH₃)₃); 29 (C(CH₃)₃).

MS (ESI+) *m/z* C₂₆H₂₃Cl₂FN₃O: 482 [M+H]⁺.



5'-(*tert-butil*)-6-cloro-2',4'-bis(4-clorofenil)-5-fluoro-2',4'-dihidrospiro[indolina-3,3'-pirazol]-2-ona (**11o**)

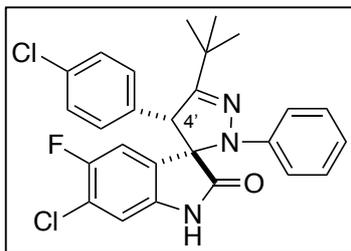
Seguindo o procedimento geral, a uma solução de **7h** (0,0246g; 0,079mmol) em CH₂Cl₂ (10mL) foi adicionado **8b** (0,0235g; 1,2 eq.) e Et₃N (33μL; 3 eq.). Tempo de reação: 19 horas. Mistura reacional purificada por cromatografia flash (eluente: n-hexano/AcOEt 4:1) e recristalização com CH₂Cl₂/Heptano para obter o composto **11o** na forma de sólido branco (0,0346g; 85%)

Ponto de fusão: 128-130° C

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,43 (s, 1H, NH); 7,43 – 7,31 (m, 2H, ArH); 7,23 – 7,12 (m, 1H, ArH); 7,04 (d, J=9Hz, 2H, ArH); 6,83 (d, J= 6Hz, 1H, ArH); 6,77 – 6,69 (m, 3H, ArH); 6,04 (d, J=9Hz, 1H, ArH); 4,41 (s, 1H, H-4'); 1,16 (s, 9H, (C(CH₃)₃)).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 177 (C=O); 162 (C=N); 155 (d, J_{C-F}=243,75Hz); 144 (Cq); 136 (Cq); 134 (Cq); 132 (Cq); 130 (d, J=3,75Hz); 129 (CH); 127 (CH); 125 (d, J=7,5Hz); 122 (d, J=19,5Hz); 118 (CH); 115 (d, J=27Hz); 112 (CH); 77 (Cspiro); 61 (CH-4'); 35 (C(CH₃)₃); 29 (C(CH₃)₃).

MS (ESI+) *m/z* C₂₆H₂₂Cl₃FN₃O: 516 [M+H]⁺.



5'-(*tert-butil*)-6-cloro-4'-(4-clorofenil)-5-fluoro-2'-fenil-2',4'-dihidrospiro[indolina-3,3'-pirazol]-2-ona (**11p**)

Seguindo o procedimento geral, a uma solução de **7h** (0,0276g; 0,089mmol) em CH₂Cl₂ (10mL) foi adicionado **8a** (0,0226g; 1,2 eq.) e Et₃N (37,4μL; 3 eq.). Tempo de reação: 19 horas. Mistura

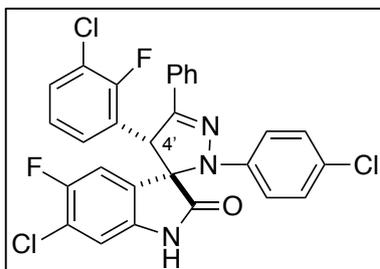
reacional purificada por cromatografia flash (eluente: n-hexano/AcOEt 4:1) e recristalização com CH₂Cl₂/Heptano para obter o composto **11p** na forma de sólido branco (0,0122g; 42%)

Ponto de fusão: 220-221° C

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,8 (s, 1H, NH) 7,41 – 7,33 (m, 1H, ArH); 7,20 – 7,05 (m, 3H, ArH); 6,88 – 6,66 (m, 5H, ArH); 6,08 (d, J= 9Hz, 1H, ArH); 4,42 (s, 1H, H-4'); 1,17 (s, 9H, (C(CH₃)₃)).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 177 (C=O); 161 (C=N); 155 (d, J_{C-F}=243,75Hz); 145 (Cq); 136 (Cq); 134 (Cq); 133 (Cq); 129 (CH); 125 (d, J=7,5Hz); 122 (Cq); 121 (CH); 116 (CH); 115 (d, J=24,75Hz); 112 (CH); 77 (Cspiro); 61 (CH-4'); 34 (C(CH₃)₃); 29 (C(CH₃)₃).

MS (ESI+) *m/z* C₂₆H₂₃Cl₂FN₃O: 482 [M+H]⁺.



6-cloro-4'-(3-cloro-2-fluorofenil)-2'-(4-clorofenil)-5-fluoro-5'-fenil-2',4'-dihidrospiro[indolina-3,3'-pirazol]-2-ona (**11q**)

Seguindo o procedimento geral, a uma solução de **7i** (0,0491g; 0,15mmol) em CH₂Cl₂ (10mL) foi adicionado **8c** (0,08g; 2 eq.) e Et₃N (63μL; 3 eq.). Tempo de reação: 17 horas. Mistura

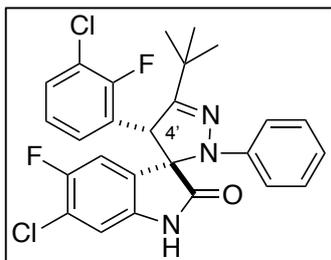
reacional purificada por cromatografia flash (eluente: n-hexano/AcOEt 4:1) e recristalização com CH₂Cl₂/Heptano para obter o composto **11q** na forma de sólido branco (0,0621g; 75%)

Ponto de fusão: 236-237° C

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,7(s, 1H, NH) 7,67 – 7,63 (m, 2H, ArH); 7,35 – 7,28 (m, 4H, ArH); 7,11 (d, J=9 Hz, 2H, ArH); 7,02 – 6,92 (m, 3H, ArH); 6,83 (d, J=9 Hz, 2H, ArH); 6,08 (d, 1H, J= 9Hz, ArH); 5,51 (s, 1H, H-4').

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 177 (C=O); 163 (C=N); 157 (d, J_{C-F}=247,5Hz); 155 (d, J_{C-F}=268,5Hz); 148 (Cq); 142 (Cq); 137 (Cq); 131 (CH); 130 (Cq); 129 (CH); 128 (CH); 127 (Cq); 126 (CH); 125 (d, J=4,5Hz); 124 (d, J=6Hz); 123 (d, J=38,35Hz); 123 (Cq); 122 (d, J=17,25Hz); 117 (CH); 114 (d, J=24,75Hz); 112 (CH); 76 (Cspiro); 54 (CH-4').

MS (ESI+) *m/z* C₂₈H₁₇Cl₃F₂N₃O: 554 [M+H]⁺.



5'-(*tert-butyl*)-6-cloro-4'-(3-cloro-2-fluorofenil)-5-fluoro-2'-fenil-2',4'-dihidrospiro[indolina-3,3'-pirazol]-2-ona (**11r**)

Seguindo o procedimento geral, a uma solução de **7i** (0,031g; 0,09mmol) em CH₂Cl₂ (10mL) foi adicionado **8a** (0,024g; 1,2 eq.) e Et₃N (37,5μL; 3 eq.). Tempo de reação: 20 horas. Mistura

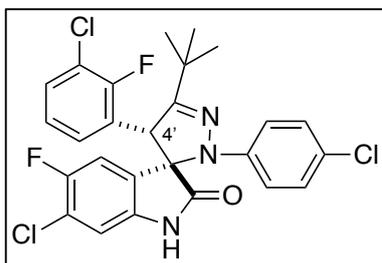
reacional purificada por cromatografia flash (eluente: n-hexano/AcOEt 4:1) e recristalização com CH₂Cl₂/Heptano para obter o composto **11r** na forma de sólido branco (0,0292g; 91%)

Ponto de fusão: 217-219° C

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,46 (s, 1H, NH) 7,41 – 7,36 (m, 1H, ArH); 7,22 – 7,18 (m, 2H, ArH); 7,12 – 7,06 (m, 2H, ArH); 6,90 – 6,80 (m, 4H, ArH); 6,0 (d, J= 9Hz, 1H, ArH); 4,90 (s, 1H, H-4'); 1,20 (s, 9H, (C(CH₃)₃)).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 176 (C=O); 160 (C=N); 157 (d, J_{C-F}=247,5Hz); 155 (d, J_{C-F}=243,75Hz); 145 (Cq); 137 (Cq); 131 (CH); 129 (CH); 128 (CH); 125 (d, J=7,5Hz); 124 (d, J=5,25Hz); 123 (d, J=14,25Hz); 122 (d, J=19,5Hz); 122 (Cq); 121 (CH); 116 (CH); 114 (d, J=24,75Hz); 112 (CH); 77 (Cspiro); 53 (CH-4'); 34 (C(CH₃)₃); 29 (C(CH₃)₃);

MS (ESI+) *m/z* C₂₆H₂₂Cl₂F₂N₃O: 500 [M+H]⁺.



5'-(*tert-butyl*)-6-cloro-4'-(3-cloro-2-fluorofenil)-2'-(4-clorofenil)-5-fluoro-2',4'-dihidrospiro[indolina-3,3'-pirazol]-2-ona (**11s**)

Seguindo o procedimento geral, a uma solução de **7i** (0,0341g; 0,1mmol) em CH₂Cl₂ (10mL) foi adicionado **8b** (0,0282g; 1,1 eq.) e Et₃N (41,8μL; 3 eq.). Tempo de reação: 18 horas.

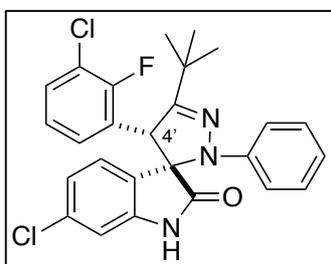
Mistura reacional purificada por cromatografia flash (eluente: n-hexano/AcOEt 4:1) e recristalização com CH₂Cl₂/Heptano para obter o composto **11s** na forma de sólido branco (0,0356g; 98%)

Ponto de fusão: 218-219° C

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,48(s, 1H, NH) 7,43 – 7,37 (m, 1H, ArH); 7,23 – 7,18 (m, 2H, ArH); 7,05 (d, J=9Hz, 2H, ArH); 6,88 (d, J= 6Hz, 1H, ArH); 6,73 (d, J=9Hz, 2H, ArH); 5,98 (d, J=9Hz, 1H, ArH); 4,89 (s, 1H, H-4'); 1,20 (s, 9H, (C(CH₃)₃)).

¹³C NMR (75 MHz, ((CD₃)₂CO) δ (ppm): 176 (C=O); 161 (C=N); 158 (d, J_{C-F}=246Hz); 155 (d, J_{C-F}=240,75Hz); 145 (Cq); 139 (Cq); 130 (CH); 129 (CH); 126 (CH); 126 (d, J=4,5Hz); 126 (d, J=7,5Hz); 125 (d, J=15Hz); 122 (d, J=18,75Hz); 121 (d, J=18Hz); 118 (CH); 115 (d, J=25,5Hz); 113 (CH); 77 (Cspiro); 54 (CH-4'); 35 (C(CH₃)₃); 29 (C(CH₃)₃).

MS (ESI+) *m/z* C₂₆H₂₁Cl₃F₂N₃O: 534 [M+H]⁺.



5'-(*tert-butyl*)-6-cloro-4'-(3-cloro-2-fluorofenil)-2'-fenil-2',4'-dihidrospiro[indolina-3,3'-pirazol]-2-ona (**11t**)

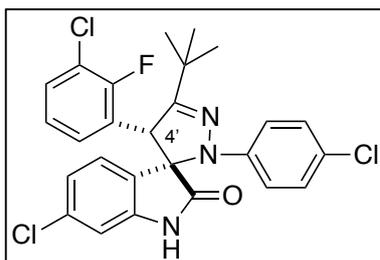
Seguindo o procedimento geral, a uma solução de **7j** (0,0347g; 0,11mmol) em CH₂Cl₂ (10mL) foi adicionado **8a** (0,026g; 1,1 eq.) e Et₃N (46μL; 3 eq.). Tempo de reação: 16 horas. Mistura reacional purificada por cromatografia flash (eluente: n-hexano/AcOEt 4:1) e recristalização com CH₂Cl₂/Heptano para obter o composto **11t** na forma de sólido branco (0,0487g; 92%)

Ponto de fusão: 231-232°

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,85 (s, 1H, NH) 7,37 – 7,31 (m, 1H, ArH); 7,24 – 7,04 (m, 4H, ArH); 6,86 – 6,78 (m, 4H, ArH) 7,11 (dd, J=6Hz, 3Hz, 1H, ArH); 6,07 (d, J= 9Hz, 1H, ArH); 4,86 (s, 1H, H-4'); 1,21 (s, 9H, (C(CH₃)₃)).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 176 (C=O); 160 (C=N); 157 (d, J_{C-F}=247,5Hz) 145 (Cq); 144 (Cq); 135 (Cq); 130 (CH); 129 (CH); 128 (CH); 126 (CH); 124 (d, J_{C-F}=4,5Hz); 124 (d, J_{C-F}=14,25Hz); 123 (Cq); 122 (CH); 121 (CH); 116 (CH); 111 (CH); 77 (Cspiro); 53 (CH-4'); 34 (C(CH₃)₃); 29 (C(CH₃)₃).

MS (ESI+) *m/z* C₂₆H₂₃Cl₂FN₃O: 482 [M+H]⁺.



5'-(*tert-butyl*)-6-cloro-4'-(3-cloro-2-fluorofenil)-2'-(4-clorofenil)-2',4'-dihidrospiro[indolina-3,3'-pirazol]-2-ona (**11u**)

Seguindo o procedimento geral, a uma solução de **7j** (0,0344g; 0,11mmol) em CH₂Cl₂ (10mL) foi adicionado **8b** (0,0328g; 1,1 eq.) e Et₃N (46μL; 3 eq.). Tempo de reação: 16 horas. Mistura reacional purificada por cromatografia flash (eluente: n-hexano/AcOEt 4:1) e recristalização com CH₂Cl₂/Heptano para obter o composto **11u** na forma de sólido branco (0,0433g; 76%)

Ponto de fusão: 209-211° C

¹H-RMN (300 MHz, ((CD₃)₂CO) δ (ppm): 9,83 (s, 1H, NH) 7,53 – 7,48 (m, 1H, ArH); 7,37 – 7,24 (m, 2H, ArH); 7,09 (d, J=12Hz, 2H, ArH); 7,02 (d, J= 6Hz, 1H, ArH); 6,8 (d, J=12Hz, 2H, ArH); 6,68 (dd, J=6Hz, J=3Hz, 1H, ArH); 6,14 (d, J=9Hz, 1H, ArH); 4,96 (s, 1H, H-4'); 1,20 (s, 9H, (C(CH₃)₃)).

¹³C NMR (75 MHz, ((CD₃)₂CO) δ (ppm): 176 (C=O); 161 (C=N); 158 (d, J_{C-F}=246Hz) 145 (Cq); 144 (Cq); 136 (Cq); 131 (CH); 130 (CH); 129 (CH); 127 (CH); 126 (Cq); 126 (d, J_{C-F}=5,25Hz); 125 (d, J_{C-F}=15Hz); 122 (Cq); 121 (d, J=18,75Hz); 118 (CH); 111 (CH); 76 (Cspiro); 54 (CH-4'); 35 (C(CH₃)₃); 29 (C(CH₃)₃).

MS (ESI+) *m/z* C₂₆H₂₂Cl₃FN₃O: 516 [M+H]⁺.

4.4 Biologia

Tabela 4.1 – Caracterização geral das linhas celulares utilizadas

Designação da linha celular	Doença	Organismo	Morfologia	Propriedades da cultura celular	Meio de crescimento celular % em (v/v)
HCT-116 p53 (+/+)	Carcinoma colo-retal	Humano	Epitelial	Aderente	McCoy's 10% FBS 1% Pen/Strep
HCT-116 p53 (-/-)	Carcinoma colo-retal	Humano	Epitelial	Aderente	McCoy's 10% FBS 1% Pen/Strep
GI-261	Glioma	Rato	-	Aderente	DMEM; 10% FBS 1% Pen/Strep
<i>Tau-green fluorescent protein (GFP) mouse neural stem cell (NSC) line</i>	-	Murganho	Astroglial	Aderente	Meio de diferenciação: Euromed-N; 10 ng/ μ L bFGF; 1% B-27; 1% Pen-strep; 0,5% N-2 Meio de auto-renovação: Euromed-N; 20 ng/ μ L EGF; 20 ng/ μ L bFGF; 1% Pen-strep; 1% N-2

Todas as linhas celulares (Tabela 4.1) foram cultivadas e mantidas em frascos de cultura celular de 75 cm² (BD Biosciences, New Jersey, EUA) numa incubadora de CO₂ a 37 °C e com 5% de CO₂ em atmosfera humidificada. A renovação da cultura celular foi realizada quando as células atingiam aproximadamente 90% de confluência, que representa a fase crítica onde a falta de nutrientes e espaço leva à morte celular. As células são levantadas com a adição de tripsina (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) durante 3 minutos na incubadora. Depois disso, é adicionado o meio celular correspondente à linha celular (4 vezes o volume utilizado de tripsina) e a suspensão celular é centrifugada a 400 g durante 4 minutos à temperatura ambiente. Depois da centrifugação o meio celular foi retirado e o pellet ressuspensado com novo meio celular.

4.4.1 Ensaios de viabilidade

As células das linhas celulares HCT-116 e GI-261 foram cultivadas em placas de 96 poços com 10×10^3 células / poço. Quanto às NSCs, estas também foram cultivadas em placas de 96 poços com $2,35 \times 10^3$ células/poço. As células viáveis foram contadas pelo método de exclusão num hemocitómetro de uma mistura de 9:1 de Trypan blue a 0.4% (v/v) (Sigma, St. Louis, Estados Unidos da América) e suspensão celular, através da seguinte equação:

$$\frac{\text{Células}}{\text{mL}} = \frac{\text{Total de células contadas}}{\text{n}^\circ \text{ de campos contados}} \times 10 \text{ (fator de diluição)} \times 10^4 \text{ (volume da câmara)}$$

Os compostos foram dissolvidos em DMSO e diluídos também em DMSO para atingir as concentrações apropriadas na gama dos μM .

Nas linhas celulares HCT116 e GI-261, 24 horas após a adesão das células às caixas de cultura, foram adicionados os compostos nas concentrações pretendidas (Esquema 4.4). A mesma quantidade de DMSO foi adicionada nos poços de controlo. Após 72 e 24 horas, respetivamente, a viabilidade celular foi analisada por MTS.



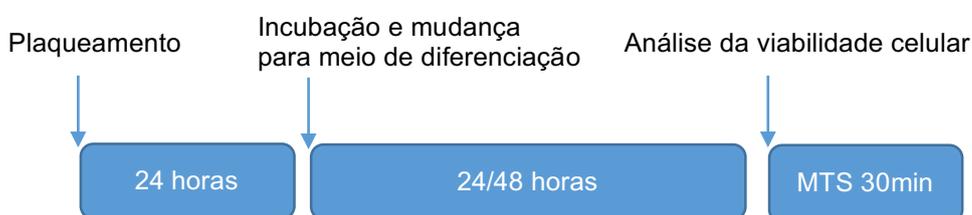
Esquema 4.4 – Diagrama de plaqueamento celular e incubação das linhas celulares HCT116 e GI-261.

A viabilidade celular foi avaliada utilizando o ensaio de proliferação de células não radioativas CellTiter 96® Aqueous (Promega, Madison, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Este método colorimétrico determina o número de células viáveis. O ensaio baseia-se na biorredução do composto 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carboximetoxifenil) -2- (4-sulfonil) -2H-tetrazólio (MTS) ao produto formazan, que pode ser medido espectrofotometricamente a 490 nm. A conversão de MTS no produto formazan é realizada por enzimas desidrogenase encontradas

em células metabolicamente ativas e é diretamente proporcional ao número de células viáveis em cultura.⁶¹

Em resumo, o meio celular dos poços foi substituído por 120 µL de solução MTS/PMS (19:1) e as células foram incubadas a 37 °C durante 30/45 min. As mudanças na absorvância foram medidas a 490 nm usando o Sistema de Detecção Multi GloMax® (Sunnyvale, CA, EUA).

Nas NSCs, a viabilidade celular foi analisada 24 e 48 horas depois da incubação com os compostos na gama de concentrações desejada. Aquando da incubação dos compostos, foi também substituído o meio celular de meio de auto-renovação para meio de diferenciação nos poços destinados a este meio celular (Esquema 4.5). O controlo foi efetuado com DMSO.



Esquema 4.5 - Diagrama de plaqueamento celular e incubação das NSCs.

Os resultados da viabilidade celular para cada concentração foram normalizados em relação às amostras de controlo e obtidos de acordo com a seguinte equação:

$$Viabilidade\ celular\ (fold\ change) = \frac{Absorv\ancia\ da\ amostra\ (490nm)}{Absorv\ancia\ do\ controlo\ (490nm)}$$

4.4.2 Extração de proteínas totais

As NSCs foram plaqueadas em placas de 60mm com $2,35 \times 10^3$ células/placa. Depois de 24 horas, as células foram incubadas com o composto **11a** nas concentrações pretendidas e o controlo foi feito adicionando a mesma quantidade de DMSO à placa do controlo. Depois de 24 e 48 horas da incubação, as células eram levantadas, centrifugadas e guardadas em forma de *pellet* a -80° C.

Para a extração das proteínas totais, foi adicionado ao *pellet* 50µL de buffer de proteínas totais sendo este composto por *buffer* de proteínas citoplasmáticas com 1% de Nonidet P-40, inibidores de fofatases e proteases e 0,7% de DDT. Depois da adição do *buffer* de proteínas totais, todas as amostras foram levadas ao vortex e deixadas em banho de gelo durante 30 minutos. Passados os 30 minutos as amostras foram sonicadas durante 30 segundos e, finalmente, foram centrifugadas a 3200g durante 10 minutos a 4° C, rejeitando o *pellet* e guardando o sobrenadante a -80°C.

A concentração de proteína em cada extrato foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford utilizando o reagente Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad), de acordo com as instruções do fabricante. A proteína BSA (Sigma-Aldrich) foi utilizada como padrão e as medições de absorvância foram realizadas a 595nm usando o Sistema de Detecção GloMax-Multi+ (Promega). As concentrações proteicas dos extratos foram interpoladas a partir da curva de calibração da proteína BSA através do Excel.

4.4.3 Western blot

A quantificação de proteínas foi efetuada através da técnica de Western Blot. As amostras de proteínas totais extraídas anteriormente foram desnaturadas na presença de 5µL de tampão de desnaturação (1,25 ml de 4X *upper buffer*, 2% SDS pH 6.8, 40% glicerol, 0.2 M DTT e 0.04% BPB) a 95°C durante 5 minutos. Para tal, 40µg de extratos de proteínas totais e 4µL do marcador de tamanhos de proteínas (Precision Plus Protein™ Standards Dual Color, BioRad) foram separados em gel de poliacrilamida com SDS a 14% e transferidos para membranas de nitrocelulose utilizando o sistema de Trans-Blot Turbo Transfer (Biorad). A separação proteica e respetiva transferência foram confirmadas por coloração transitória com 0,2% de *Ponceau S* (Merck, Darmstadt, Alemanha). De seguida, os locais de ligação não específicos foram bloqueados com uma solução de 5% de leite em solução salina tamponada com Tris (TBS) durante 2 horas. A imunomarcção ocorreu durante a noite a 4° C com os anticorpos primários (Tabela 4.2). Após três lavagens de 5 minutos com *tris-buffered saline* (TBS) contendo 0,2% de Tween 2.0 (TBS-T) as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários anti-coelho ou anti-murganho durante 3 horas à temperatura ambiente. Finalmente, após três lavagens de 5 minutos com TBS-T, os complexos imunorreativos foram visualizados por quimioluminiscência com os substratos Immobilon™ Western (Milipore) ou SuperSignal West Femto (Thermo Fisher Scientific, Inc.). A análise densitométrica foi realizada com o software Image Lab versão 5.1 Beta (Bio-Rad).

Tabela 4.2 – Anticorpos primários utilizados no Western Blot.

Antigénio	Companhia	Número do catálogo	Hospedeiro	Clonagem	Diluição
SOX2	Merck	AB5603	Coelho	Policlonal	1:5000
β tubulina III	Biologend	801201	Murganho	Policlonal	1:5000
p53	Santa Cruz Biotechnology	Sc-99	Murganho	Monoclonal	1:5000
Bax	Santa Cruz Biotechnology	Sc-7480	Coelho	Policlonal	1:5000

4.4.4 Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o software GraphPad. Todos os dados são apresentados como a média ± erro padrão da média (SEM) de pelo menos três experiências independentes ou dos triplicados de apenas uma experiência. As diferenças entre as médias foram testadas quanto à significância utilizando o teste t de Student (* p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001).

5. Bibliografia

- (1) Cory, S.; Huang, D. C. S.; Adams, J. M. The Bcl-2 Family: Roles in Cell Survival and Oncogenesis. *Oncogene* **2003**, 22, 8590–8607.
- (2) World Health Organization (WHO). Cancer. Media Center (2015). Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/> (acessado a 10 de Agosto de 2017).
- (3) American cancer society (ACS). Treatment & Support. Disponível em: <https://www.cancer.org/treatment.html> (acessado a 10 de Agosto de 2017).
- (4) Kümmerer, K.; Al-Ahmad, A.; Bertram, B.; Wießler, M. Biodegradability of Antineoplastic Compounds in Screening Tests: Influence of Glucosidation and of Stereochemistry. *Chemosphere* **2000**, 40 (7), 767–773.
- (5) Ferlay, J.; Steliarova-Foucher, E.; Lortet-Tieulent, J.; Rosso, S.; Coebergh, J. W. W.; Comber, H.; Forman, D.; Bray, F. Cancer Incidence and Mortality Patterns in Europe: Estimates for 40 Countries in 2012. *Eur. J. Cancer* **2013**, 49 (6), 1374–1403.
- (6) Goodenberger, M. L.; Jenkins, R. B. Genetics of Adult Glioma. *Cancer Genet.* **2012**, 205 (12), 613–621.
- (7) Rao, J. S. Molecular Mechanisms of Glioma Invasiveness: The Role of Proteases. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, 3 (7), 489–501.
- (8) Vermeulen, K.; Van Bockstaele, D. R.; Berneman, Z. N.; Vermeulen, K.; Van Bockstaele, D. R.; Berneman, Z. N. The Cell Cycle: a Review of Regulation, deregulation and Therapeutic Targets in Cancer. *Cell Prolif.* **2003**, 36 (3), 131–149.
- (9) Brady, C. A.; Attardi, L. D. P53 At a Glance. *J. Cell Sci.* **2010**, 123 (15), 2527–2532.
- (10) Biegging, K. T.; Mello, S. S.; Attardi, L. D. Unravelling Mechanisms of p53-Mediated Tumour Suppression. *Nat. Rev. Cancer* **2014**, 14 (5), 359–370.
- (11) Olivier, M.; Hollstein, M.; Hainaut, P. TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, 2 (1), 1–17.
- (12) Biegging, K. T.; Attardi, L. D. Deconstructing p53 Transcriptional Networks in Tumor Suppression. *Trends Cell Biol.* **2012**, 22 (2), 97–106.
- (13) Tannishtha, R.; Morrison, S. J.; Clarke, M. F.; Weissman, I. L. Stem Cells, Cancer, and Cancer Stem Cells. *Nature* **2001**, 414 (November), 105–111.

- (14) Aponte, P. M.; Caicedo, A. Stemness in Cancer: Stem Cells, Cancer Stem Cells, and Their Microenvironment. **2017**, 1–17.
- (15) Das, S.; Srikanth, M.; Kessler, J. A. Cancer Stem Cells and Glioma. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* **2008**, 4 (8), 427–435.
- (16) Lin, T.; Chao, C.; Saito, S.; Mazur, S. J.; Murphy, M. E.; Appella, E.; Xu, Y. p53 Induces Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells by Suppressing Nanog Expression. *Nat. Cell Biol.* **2005**, 7 (2), 165–171.
- (17) Götz, M.; Huttner, W. B. The Cell Biology of Neurogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, 6 (10), 777–788.
- (18) Temple, S. The Development of Neural Stem Cells. *Nature* **2001**, 414 (6859), 112–117.
- (19) Vescovi, A. L.; Galli, R.; Reynolds, B. A. Brain Tumour Stem Cells. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, 6 (6), 425–436.
- (20) Rezza, A.; Wang, Z.; Sennett, R.; Qiao, W.; Wang, D.; Heitman, N.; Mok, K. W.; Clavel, C.; Yi, R.; Zandstra, P.; Ma'ayan, A.; Rendl, M. Signaling Networks among Stem Cell Precursors, Transit-Amplifying Progenitors, and Their Niche in Developing Hair Follicles. *Cell Rep.* **2016**, 14 (12), 3001–3018.
- (21) Gage, F. H.; Temple, S. Neural Stem Cells: Generating and Regenerating the Brain. *Neuron* **2013**, 80 (3), 588–601.
- (22) Ming, G. li; Song, H. Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron* **2011**, 70 (4), 687–702.
- (23) Lim, D. A.; Huang, Y.-C.; Alvarez-Buylla, A. The Adult Neural Stem Cell Niche: Lessons for Future Neural Cell Replacement Strategies. *Neurosurg. Clin. N. Am.* **2007**, 18 (1), 81–92.
- (24) Qin, H.; Yu, T.; Qing, T.; Liu, Y.; Zhao, Y.; Cai, J.; Li, J.; Song, Z.; Qu, X.; Zhou, P.; Wu, J.; Ding, M.; Deng, H. Regulation of Apoptosis and Differentiation by p53 in Human Embryonic Stem Cells. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282 (8), 5842–5852.
- (25) Sah, V. P.; Attardi, L. D.; Mulligan, G. J.; Williams, B. O.; Bronson, R. T.; Jacks, T. A Subset of p53-Deficient Embryos Exhibit Exencephaly. *Nat. Genet.* **1995**, 10 (2), 175–180.
- (26) Molchadsky, A.; Rivlin, N.; Brosh, R.; Rotter, V.; Sarig, R. P53 Is Balancing Development, Differentiation and de-Differentiation to Assure Cancer Prevention. *Carcinogenesis* **2010**, 31 (9), 1501–1508.

- (27) Komarova, E. A.; Chernov, M. V.; Franks, R.; Wang, K.; Armin, G.; Zelnick, C. R.; Chin, D. M.; Bacus, S. S.; Stark, G. R.; Gudkov, A. V. Transgenic Mice with p53-Responsive lacZ: p53 Activity Varies Dramatically during Normal Development and Determines Radiation and Drug Sensitivity in Vivo. *EMBO J.* **1997**, *16* (6), 1391–1400.
- (28) Boehme, K. a; Blattner, C. Regulation of p53--Insights into a Complex Process. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2009**, *44* (6), 367–392.
- (29) Lee, K.-H.; Li, M.; Michalowski, A. M.; Zhang, X.; Liao, H.; Chen, L.; Xu, Y.; Wu, X.; Huang, J. A Genomewide Study Identifies the Wnt Signaling Pathway as a Major Target of p53 in Murine Embryonic Stem Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107* (1), 69–74.
- (30) Solá, S.; Xavier, J. M.; Santos, D. M.; Aranha, M. M.; Morgado, A. L.; Jepsen, K.; Rodrigues, C. M. P. p53 Interaction with JMJD3 Results in Its Nuclear Distribution during Mouse Neural Stem Cell Differentiation. *PLoS One* **2011**, *6* (3).
- (31) Takahashi, K.; Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **2006**, *126* (4), 663–676.
- (32) Zhao, Y.; Yin, X.; Qin, H.; Zhu, F.; Liu, H.; Yang, W.; Zhang, Q.; Xiang, C.; Hou, P.; Song, Z.; Liu, Y.; Yong, J.; Zhang, P.; Cai, J.; Liu, M.; Li, H.; Li, Y.; Qu, X.; Cui, K.; Zhang, W.; Xiang, T.; Wu, Y.; Zhao, Y.; Liu, C.; Yu, C.; Yuan, K.; Lou, J.; Ding, M.; Deng, H. Two Supporting Factors Greatly Improve the Efficiency of Human iPSC Generation. *Cell Stem Cell* **2008**, *3* (5), 475–479.
- (33) Brown, C. J.; Lain, S.; Verma, C. S.; Fersht, A. R.; Lane, D. P. Awakening Guardian Angels: Drugging the p53 Pathway. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9* (12), 862–873.
- (34) Wang, S.; Zhao, Y.; Aguilar, A.; Bernard, D.; Yang, C. Targeting the MDM2–p53 Protein–Protein Interaction for New Cancer Therapy: Progress and Challenges. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **2017**.
- (35) Kussie, P. H.; Gorina, S.; Marechal, V.; Elenbaas, B.; Moreau, J.; Levine, A. J.; Pavletich, N. P. Structure of the MDM2 Oncoprotein Bound to the p53 Tumor Suppressor Transactivation Domain. *Science* (80-.). **1996**, *274* (5289), 948–953.
- (36) Vassilev, L. T. In Vivo Activation of the p53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2. *Science* (80-.). **2004**, *303* (5659), 844–848.
- (37) Vu, B.; Wovkulich, P.; Pizzolato, G.; Lovey, A.; Ding, Q.; Jiang, N.; Liu, J. J.; Zhao, C.; Glenn, K.; Wen, Y.; Tovar, C.; Packman, K.; Vassilev, L.; Graves, B. Discovery of RG7112: A Small-Molecule MDM2 Inhibitor in Clinical Development. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4* (5), 466–469.
- (38) Sun, D.; Li, Z.; Rew, Y.; Gribble, M.; Bartberger, M. D.; Beck, H. P.; Canon, J.; Chen, A.; Chen, X.; Chow, D.; Deignan, J.; Duquette, J.; Eksterowicz, J.; Fisher, B.; Fox, B. M.; Fu, J.; Gonzalez, A. Z.; Gonzalez-Lopez De Turiso, F.; Houze, J. B.; Huang, X.; Jiang, M.; Jin, L.; Kayser, F.; Liu, J.; Lo, M. C.; Long, A. M.; Lucas, B.; McGee, L. R.; McIntosh, J.; Mihalic, J.; Oliner, J. D.; Osgood, T.; Peterson, M. L.; Roveto, P.; Saiki, A. Y.; Shaffer, P.; Toteva,

- M.; Wang, Y.; Wang, Y. C.; Wortman, S.; Yakowec, P.; Yan, X.; Ye, Q.; Yu, D.; Yu, M.; Zhao, X.; Zhou, J.; Zhu, J.; Olson, S. H.; Medina, J. C. Discovery of AMG 232, a Potent, Selective, and Orally Bioavailable MDM2-p53 Inhibitor in Clinical Development. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (4), 1454–1472.
- (39) Grasberger, B. L.; Lu, T.; Schubert, C.; Parks, D. J.; Carver, T. E.; Koblisch, H. K.; Cummings, M. D.; LaFrance, L. V.; Milkiewicz, K. L.; Calvo, R. R.; Maguire, D.; Lattanze, J.; Franks, C. F.; Zhao, S.; Ramachandren, K.; Bylebyl, G. R.; Zhang, M.; Manthey, C. L.; Petrella, E. C.; Pantoliano, M. W.; Deckman, I. C.; Spurlino, J. C.; Maroney, A. C.; Tomczuk, B. E.; Molloy, C. J.; Bone, R. F. Discovery and Cocrystal Structure of Benzodiazepinedione HDM2 Antagonists That Activate p53 in Cells. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (4), 909–912.
- (40) Shangary, S.; Wang, S. Targeting the MDM2-p53 Interaction for Cancer Therapy. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14* (17), 5318–5324.
- (41) Ding, K.; Lu, Y.; Nikolovska-Coleska, Z.; Qiu, S.; Ding, Y.; Gao, W.; Stuckey, J.; Krajewski, K.; Roller, P. P.; Tomita, Y.; Parrish, D. A.; Deschamps, J. R.; Wang, S. Structure-Based Design of Potent Non-Peptide MDM2 Inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (29), 10130–10131.
- (42) Wang, S.; Sun, W.; Zhao, Y.; McEachern, D.; Meaux, I.; Barriere, C.; Stuckey, J. A.; Meagher, J. L.; Bai, L.; Liu, L.; Hoffman-Luca, C. G.; Lu, J.; Shangary, S.; Yu, S.; Bernard, D.; Aguilar, A.; Dos-Santos, O.; Besret, L.; Guerif, S.; Pannier, P.; Gorge-Bernat, D.; Debussche, L. SAR405838: An Optimized Inhibitor of MDM2-p53 Interaction That Induces Complete and Durable Tumor Regression. *Cancer Res.* **2014**, *74* (20), 5855–5865.
- (43) Zhao, Y.; Bernard, D.; Wang, S. Small Molecule Inhibitors of MDM2-p53 and MDMX-p53 Interactions as New Cancer Therapeutics. *Biodiscovery* **2013**, No. 8, 4.
- (44) Aguilar, A.; Lu, J.; Liu, L.; Du, D.; Bernard, D.; McEachern, D.; Przybranowski, S.; Li, X.; Luo, R.; Wen, B.; Sun, D.; Wang, H.; Wen, J.; Wang, G.; Zhai, Y.; Guo, M.; Yang, D.; Wang, S. Discovery of 4-((3'R,4'S,5'R)-6-Chloro-4'-(3-Chloro-2-Fluorophenyl)-1'-Ethyl-2-Oxidospiro[cyclohexane-1,2'-Pyrrolidine-3',3'-Indoline]-5'-carboxamido)bicyclo[2.2.2]octane-1-Carboxylic Acid (AA-115/APG-115): A Potent and Orally Active Murine Double Minute 2. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (7), 2819–2839.
- (45) Ribeiro, C. J. A.; Praveen Kumar, S.; Moreira, R.; Santos, M. M. M. Efficient Synthesis of Spiroisoxazoline Oxindoles. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53* (3), 281–284.
- (46) Monteiro, Â.; Gonçalves, L. M.; Santos, M. M. M. Synthesis of Novel Spiropyrazoline Oxindoles and Evaluation of Cytotoxicity in Cancer Cell Lines. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *79*, 266–272.
- (47) Nunes, R. C.; Ribeiro, C. J. A.; Monteiro, Â.; Rodrigues, C. M. P.; Amaral, J. D.; Santos, M. M. M. In Vitro Targeting of Colon Cancer Cells Using Spiropyrazoline Oxindoles. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *139*, 168–179.
- (48) Martins, D. M.; Torres, B. G.; Spohr, P. R.; MacHado, P.; Bonacorso, H. G.; Zanatta, N.;

- Martins, M. A. P.; Emanuelli, T. Antioxidant Potential of New Pyrazoline Derivatives to Prevent Oxidative Damage. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2009**, *104* (2), 107–112.
- (49) Jainey, P. J.; Bhat, I. K. Antitumor, Analgesic, and Anti-Inflammatory Activities of Synthesized Pyrazolines. *J. Young Pharm.* **2012**, *4* (2), 82–87.
- (50) Badavath, V. N.; Singh, A. K.; Jadav, S. S.; Mishra, N.; Dev, A.; Sinha, B. N.; Jayaprakash, V. Pyrazoline Carboxylates as Selective MAO-B Inhibitors: Synthesis and Biological Screening. *J. Pharm. Chem.* **2015**, *2* (1), 1–5.
- (51) Karabacak, M.; Altıntop, M.; İbrahim Çiftçi, H.; Koga, R.; Otsuka, M.; Fujita, M.; Özdemir, A. Synthesis and Evaluation of New Pyrazoline Derivatives as Potential Anticancer Agents. *Molecules* **2015**, *20* (10), 19066–19084.
- (52) Shangary, S.; Wang, S. Small-Molecule Inhibitors of the MDM2-p53 Protein-Protein Interaction to Reactivate p53 Function: A Novel Approach for Cancer Therapy. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2009**, *49* (1), 223–241.
- (53) Zak, K.; Pecak, A.; Rys, B.; Wladyka, B.; Dömling, A.; Weber, L.; Holak, T. a; Dubin, G. Mdm2 and MdmX Inhibitors for the Treatment of Cancer: A Patent Review (2011-Present). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2013**, *23* (4), 425–448.
- (54) Description, A. G.; The, O. F.; Scheme, B. G. R. 1,3-Dipolar Cycloaddition. *Compr. Org. Name React. Reagents* **2010**, 916–920.
- (55) Wang, G.; Liu, X.; Huang, T.; Kuang, Y.; Lin, L.; Feng, X. Synthesis of Hydrazonyl Chlorides. Lit Comparison for N-Tolyl C-Phenyl Hydrazonyl Chloride. *Org. Lett.* **2013**, *15* (1), 76–79.
- (56) Nunes, R. C. C. S. The Therapeutic Potential of Small Molecules p53-MDM Protein-Protein Interaction Inhibitors, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, 2016.
- (57) Chipuk, J. E. Direct Activation of Bax by p53 Mediates Mitochondrial Membrane Permeabilization and Apoptosis. *Science* (80-.). **2004**, *303* (5660), 1010–1014.
- (58) Mokhtari, S.; Mosaddeghb, M.; Moghadam, M. H.; Soleymania, Z.; Ghafarib, S.; Kobarfard, F. Synthesis and Cytotoxic Evaluation of Novel 3-Substituted Derivatives of 2-Indolinone. *Iran. J. Pharm. Res.* **2012**, *11* (2), 411–421.
- (59) Arulananda Babu, S.; Padmavathi, R.; Ahmad Aslam, N.; Rajkumar, V. *Recent Developments on the Synthesis and Applications of Natural Products-Inspired Spirooxindole Frameworks*; Elsevier B.V., 2015; Vol. 46.
- (60) Zhang, C.-Y.; Liu, X.-H.; Wang, B.-L.; Wang, S.-H.; Li, Z.-M. Synthesis and Antifungal Activities of New Pyrazole Derivatives via 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction. *Chem. Biol. Drug Des.* **2010**, *75* (5), 489–493.

- (61) Riss, T. L.; Moravec, R. A.; Niles, A. L.; Duellman, S.; Benink, H. A.; Worzella, T. J.; Minor, L. Cell Viability Assays. *Assay Guid. Man. [Internet]* **2013**, *114* (8), 785–796.