

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA EM PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FARMACOLOGIA BIOQUÍMICA E MOLECULAR

TÂNIA REGINA MIELCKE

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-TUMORAL DE UMA SÉRIE DE
CHALCONAS DERIVADAS DA QUINOXALINA SOBRE GLIOMAS -
ESTUDO *IN VITRO***

Porto Alegre, 2011

TÂNIA REGINA MIELCKE

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-TUMORAL DE UMA SÉRIE DE
CHALCONAS DERIVADAS DA QUINOXALINA SOBRE GLIOMAS -
ESTUDO *IN VITRO***

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Área de Concentração em Farmacologia Bioquímica e Molecular, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Maria Martha Campos

Co-Orientadora: Prof^ª. Dra. Fernanda Bueno Morrone

Porto Alegre 2011

TÂNIA REGINA MIELCKE

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-TUMORAL DE UMA SÉRIE DE
CHALCONAS DERIVADAS DA QUINOXALINA SOBRE GLIOMAS -
ESTUDO IN VITRO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Área de Concentração em Farmacologia Bioquímica e Molecular, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em ____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Bernardo Garicochea

Dra. Alessandra Hübner de Souza

Dra. Elizandra Braganhol

***À Mestra,
com carinho!***

Professora Maria Martha

"Se fosse ensinar a uma criança a beleza da música
não começaria com partituras, notas e pautas.
Ouviríamos juntos as melodias mais gostosas e lhe contaria
sobre os instrumentos que fazem a música.
Aí, encantada com a beleza da música, ela mesma me pediria
que lhe ensinasse o mistério daquelas bolinhas pretas escritas sobre cinco linhas.
Porque as bolinhas pretas e as cinco linhas são apenas ferramentas
para a produção da beleza musical. A experiência da beleza tem de vir antes".

[Rubem Alves](#)

*Muito obrigada por ensinar e ajudar a ler esta partitura,
tornar este sonho realidade!*

AGRADECIMENTOS

À minha família, José, Terezinha, Miriam, Giovanni, Ricardo, Rogério, Marcelo..., pelo amor e apoio incondicionais, por entenderem e apoiarem minhas escolhas, tentando me orientar diante dos desafios e oportunidades. Por me ensinarem que devemos lutar com dignidade e coragem, sendo leais aos nossos valores, respeitando as amizades, buscando mais conhecimento, superando limites e lutando sempre pelos nossos sonhos!

Um agradecimento tão profundo, sincero e importante à minha orientadora, à Dra. Maria Martha Campos! Muito obrigada por ter me acolhido com tanta generosidade e atenção, por ter aberto os horizontes da pesquisa, mostrando o brilho das descobertas, ensinando a persistir diante do desconhecido, desafiador e dos percalços! Obrigada pelo otimismo, paciência, confiança, compreensão, por me ensinar tanto, com tanto carinho e simplicidade, por sua amizade, por “fazer esta mágica”.

À Prof^a. Dra. Fernanda Bueno Morrone, pela oportunidade de fazer parte do Laboratório de Farmacologia Aplicada desde o meu período de iniciação científica, pela co-orientação, apoio, carinho e ensinamentos.

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia Aplicada, incluindo o técnico Juliano Soares, pela amizade e companheirismo que nos torna uma família, que sustenta o conhecimento e forma profissionais humanos e generosos. Ao Eduardo e ao Rafael pelo imenso auxílio nas citometrias! À Alessandra, que sintetizou estes compostos e trouxe tantas possibilidades e oportunidades!

Ao Fábio, por sempre torcer por mim, incentivar, compreender e acreditar que daria certo, pela paciência e companheirismo!

Muito obrigada a todos! Vocês são muito importantes para mim e sem vocês eu não teria conseguido concluir este projeto!

*“Aprender é a única coisa
de que a mente
nunca se cansa,
nunca tem medo e,
nunca se arrepende”*

Leonardo da Vinci

RESUMO

Os gliomas são os tumores do SNC mais comuns e devastadores. Dentre os gliomas, o GBM é o mais prevalente, agressivo, maligno e apresenta um mau prognóstico. A relevância dos compostos naturais, incluindo as chalconas, no tratamento e na prevenção do câncer está sendo muito evidenciada. As chalconas formam um grupo de compostos naturais derivados dos flavonóides que apresentam diferentes propriedades biológicas e farmacológicas, incluindo as atividades anti-proliferativas e anti-tumorais. O objetivo deste estudo foi avaliar a ação anti-proliferativa e a capacidade de inibição da viabilidade celular *in vitro* de nove chalconas derivadas da quinoxalina, baseadas estruturalmente no inibidor seletivo de PI3K γ , o AS605240. Estes compostos sintéticos foram testados em diferentes tempos de incubação (24, 48 e 72 h) e concentrações (0,1; 0,1; 1; 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) em linhagens de glioma humano e de rato (U-138 MG e C6, respectivamente). Os resultados observados nos experimentos de MTT e na contagem celular revelaram que quatro chalconas (compostos **N2**, **N9**, **N10** e **N12**), apresentaram grande eficácia e potência, sendo capazes de inibir a proliferação e a viabilidade celular, de maneira tempo e concentração dependente. Estes quatro compostos que possuem radicais metóxi no anel A de sua estrutura demonstraram uma eficácia superior àquela do composto AS605240, usado como controle positivo. Os resultados da citometria de fluxo demonstraram que a incubação das células C6 com a chalcona **N9** levaram a um bloqueio celular na fase G1, possivelmente indicando interferência com a apoptose. Além disto, a chalcona **N9** foi capaz de inibir visivelmente a ativação da AKT, aliada à estimulação de ERK 1/2 MAP-quinase. As chalconas estudadas neste projeto, especialmente as que apresentam o radical metoxi no anel A, representam promissoras moléculas para o tratamento dos gliomas.

Palavras-chave: síntese, chalconas, atividade antitumoral, anti-proliferativa, linhagens de gliomas

ABSTRACT

Gliomas are the most common and devastating tumors of the central nervous system (CNS). Among the gliomas group, the GBM is the most prevalent, aggressive and deadly malignant. Many pieces of evidence point out the relevance of natural compounds for cancer therapy and prevention, including chalcones. Chalcones are group of natural precursors of flavonoid and display a wide variety of biological and pharmacological proprieties that include anti-proliferative and anti-cancer activities. This study aimed at evaluating the in vitro anti-proliferative activity and cell viability inhibition of nine quinoxaline derived chalcones, structurally based on the selective PI3K γ inhibitor AS605240. These synthetic compounds were tested at different time-periods of incubation (24, 48 e 72 h) and concentrations (0,1; 0,1; 1; 5 e 10 μ g/mL) in glioma cell lines from human and rat origin (U-138 MG and C6, respectively). The results showed by MTT assay and cell counting revealed that four chalcones (compounds **N2**, **N9**, **N10** and **N12**), displayed higher efficacies and potencies, being able to inhibit either cell proliferation or viability, in a time- and concentration dependent manner. These four compounds which present methoxy groups at A-ring and their efficacy was greater than that seen for the positive control compound AS605240. Flow cytometry analysis demonstrated that incubation of C6 cells with chalcone **N9** led to G1 phase arrest, likely indicating an interference with apoptosis. Furthermore, chalcone **N9** was able to visibly inhibit AKT activation, allied to the stimulation of ERK 1/2 MAP-kinase. The chalcones tested herein, especially those displaying a methoxy substituent at A-ring, might well represent promising molecules for the treatment of gliomas.

Keywords: synthesis, quinoxaline, chalcones, anti-cancer activity, anti-proliferative, glioma cells

ABREVIACOES

CBTRUS - Central de Registros de Tumores Cerebrais dos Estados Unidos (*Central Brain Tumor Registry of the United States*)

COX-2 - Ciclooxygenase-2 (*Cyclooxygenase-2*)

E2F - Fator de Enlongamento 2 (*Enlongation Factor 2*)

EGFR - Receptor de Fator de Crescimento Epidermal

ERK - Cinase Reguladora de Sinais Extracelulares (*Extracellular-Signal-Regulated Kinases*)

GBM - Glioblastomas Multiformes

HIF-1 - Fator de Transcrição Induzido por Hipóxia (*Hipoxia-induced Factor 1*)

IDH1 - Isocitrato Desidrogenase 1 (*Isocytate Dehydrogenase-1*)

iNOS - xido Ntrico Sintase (*Nitric Oxide Synthase*)

INK4a - Inibidor de Progressão do Ciclo Celular p16

JNK - Cinases c-Jun N-terminal (*c-Jun N-terminal kinases*)

MAPK - Proteína Cinase Ativada por Mitógeno (*Mitogen-activated Protein Kinase*)

MGMT - gene O⁶-metilguanina-DNA metiltransferase (*O6-methylguanine-DNA-methyltransferase*)

MMPs - Metaloproteinases de Matriz (*Matrix Metalloproteinases*)

MTIC - 5-(3-metiltriazeno)-imidazol-4-carboxamida (*3-methyl-(triazene-1-yl)imidazole-4-carboxamide*)

NO - xido Ntrico (*nitric oxide*)

OMS - Organização Mundial da Saúde

O⁶MeG - O⁶-metilguanina (*O6-methylguanine*)

PDGF - fator de crescimento derivado de plaquetas (*Platelet-Derived Growth Factor*)

PI3K - Fosfatidilinositol 3-cinase (*Phosphoinositide Kinase-3*)

PIP2 - fosfatidilinositol-3,4-bifosfato (*Phosphatidylinositol 3,4-biphosphate*)

PIP3 - fosfatidilinositol-3,4,5- trifosfato (*Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate*)

pRB - Proteína do Retinoblastoma (*Retinoblastoma protein*)

PTEN - Proteína Homóloga a Fosfatase e Tensina (*Phosphatase and Tensin Homolg*)

SNC - Sistema Nervoso Central

STAT - Transdução de Sinal e Ativação de Proteínas Transcricionais (*Signal Transducers and Activators of Transcription Protein*)

TCGA - Atlas do Genoma de Cânceres (The Cancer Genome Atlas)

TMZ – Temozolamida (*Temozolamide*)

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral α (*Tumor Necrosis Factor-alpha*)

VEGFR - Receptor de Fator de Crescimento Vascular Endotelial (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	26
2.1. Objetivo geral	26
2.2. Objetivos específicos.....	26
3. MANUSCRITO DO TRABALHO EXPERIMENTAL.....	27
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
5. REFERÊNCIAS	61
ANEXO I.....	72
ANEXO II	73
ANEXO III.....	74

1. INTRODUÇÃO

Gliomas são os tumores cerebrais primários mais comuns em adultos e representam cerca de 50 % de todas as neoplasias do Sistema Nervoso Central (SNC) (Preusser et al., 2006; Yin et al., 2007; Dun et al., 2007), sendo caracterizados também por possuírem ampla heterogeneidade histológica e clínica. Os tumores cerebrais primários correspondem a 1,4 % dentre todos os tipos de cânceres e são responsáveis por 2,4 % de mortes por câncer nos Estados Unidos. De acordo com o banco de dados online da Central de Registros de Tumores Cerebrais dos Estados Unidos – CBTRUS (www.cbtrus.org), anualmente, surgem aproximadamente 20 mil novos casos de gliomas (7,4 casos a cada 100 mil habitantes), sendo mais da metade malignos, com uma taxa anual de 12500 casos de mortalidade. Os glioblastomas multiformes (GBMs) correspondem a cerca de 70 % dos casos de gliomas malignos, acometendo mais de 12000 pessoas por ano nos Estados Unidos (6,0 casos por 100 mil habitantes). No Brasil, os dados mais recentes referentes à incidência de gliomas datam de 1998, mas demonstram um crescimento no número de casos. Em 1970, era de 2,24 por 100 mil habitantes; já, em 1998, a incidência aumentou para 3,35 por 100 mil habitantes (Monteiro, 2003) e a tendência é que estes índices tenham aumentado ainda mais nos últimos anos.

Em 2007, a Organização Mundial da Saúde (OMS) descreveu a classificação utilizada atualmente em gliomas, que se baseia em três parâmetros: o tipo celular, a localização tumoral e o grau de malignidade (Louis et al., 2007, Brat et al., 2007, Fuller e Scheithauer, 2007; Nakazato, 2008). Clinicamente, por meio desta classificação, é possível determinar o tipo de terapia a ser utilizada no tratamento, determinando particularmente o uso de radioterapia adjuvante e os protocolos específicos de quimioterapia (Louis et al., 2007).

A classificação com base no tipo celular é feita a partir das características histológicas, conforme a semelhança fenotípica das células tumorais com os diferentes tipos de células gliais (astrócitos, oligodendrócitos e células ependimais) (Michote et al., 2004, Nikiforova e Hamilton, 2011). Com base na aparência morfológica das células, os gliomas são classificados em Astrocitomas, Oligodendrogliomas e Gliomas Mistos. Os Astrocitomas e Oligodendrogliomas são os tipos mais prevalentes, correspondendo a mais de 90 % dos casos (Burton e Prados, 2000; Holland et al., 2001).

A classificação com base na localização tumoral refere-se ao local no qual os gliomas se desenvolvem com base em uma membrana que separa o cérebro (tentorium = “teto” cerebelar) do cerebelo. Desta forma, eles podem ser classificados como supratentoriais, acima do tentorium e, que ocorrem predominantemente em adultos ou, infratentoriais, que se desenvolvem abaixo do tentorium, com maior predominância em crianças (Vougioukas et al., 2005; Kaloshi et al., 2009).

A classificação com base na Malignidade Tumoral divide os gliomas em uma escala de I a IV (Holland et al., 2000; Louis et al., 2007). Os gliomas de baixo grau de malignidade são os de grau I e II, sendo caracterizados por serem diferenciados ou não anaplásticos (Stieber, 2001). Os gliomas de grau I são passíveis de cura por remoção cirúrgica e sem necessidade de tratamento quimioterápico, além de apresentarem baixa capacidade proliferativa, com lento crescimento, sendo geralmente encontrados em crianças e jovens. Dentre os subtipos, podemos citar o astrocitoma pilocítico (Stieber, 2001; Behin et al., 2003). Os gliomas de grau II (astrocitoma difuso, oligodendroglioma, oligoastrocitoma) geralmente são naturalmente infiltrativos, mas com crescimento lento e que podem recorrer. Entretanto, alguns gliomas de grau II podem progredir para gliomas mais malignos (Behin et al., 2003; Van den Bent, 2007). Estes gliomas de baixo grau não são benignos, mas apresentam um melhor prognóstico quando comparado aos gliomas de alto grau (III e IV) (Van den Bent et al., 2008; Bromberg e Van den Bent, 2009), sendo a sobrevida média destes pacientes muito superior a dos pacientes diagnosticados com gliomas malignos de alto grau (Bromberg e Van den Bent, 2009). Os gliomas de alto grau são classificados como sendo os de grau III e IV (Behin et al., 2003). Eles apresentam características mais agressivas, como indiferenciação celular ou anaplastia, pleomorfismo celular, elevada capacidade de proliferação (Behin et al., 2003), levando a um prognóstico muito mais desfavorável. Os gliomas de grau III são caracterizados por apresentarem evidências histológicas de malignidade, como atipia nuclear e elevada atividade mitótica. Os tipos mais comuns de glioma grau III são o astrocitoma anaplásico, oligodendroglioma anaplásico, oligoastrocitoma anaplásico (See e Gilbert, 2004; Desjardins et al., 2008; Wick e Weller, 2010). O tratamento padrão compreende cirurgia, seguida de radioterapia e quimioterapia e a sobrevida média dos pacientes é de cerca de 3 anos (Desjardins et al., 2008; Wick e Weller, 2010). Os gliomas de grau IV são os mais comuns, malignos e letais dentro todos os gliomas e dentre eles podemos citar o glioblastoma multiforme

(Robins et al., 2007; Kanu et al., 2009; Vredenburg et al., 2009), que corresponde a cerca de 70% dos gliomas de alto grau diagnosticados (Ohgaki e Kleihues, 2007).

Os GBM são caracterizados histologicamente por células neoplásicas pouco diferenciadas com áreas de proliferação vascular e/ou necrose em paliçada (Sathornusumetee et al., 2008), células gigantes, pleomorfismo celular e nuclear, proliferação microvascular, uma elevada atividade mitótica, além de proliferação endotelial (Laws e Schaffrey, 1999, Brandes et al., 2008). Estes tumores apresentam um padrão de crescimento multifocal (não se forma uma massa sólida única, mas há formação de vários tumores espalhados pelo tecido sadio), o que explica sua grande capacidade de se infiltrar no parênquima cerebral que circunda o tumor, limitando a remoção cirúrgica (Stupp et al., 2007) e levando a uma rápida progressão e a elevados índices de recorrência (Stupp et al., 2006; Yin et al., 2007; Goldust et al., 2008). As metástases sistêmicas são raras (Armstrong et al., 2010); porém, dentro de pouco tempo, no mesmo local da lesão primária principal ou muito próximo a ela, são observadas novas lesões (Sathornsumette e Rich, 2008). Estas células tumorais também apresentam resistência intrínseca à radioterapia e à apoptose, fazendo que as terapias pró-apoptóticas não sejam tão efetivas ou falhem em induzir a regressão tumoral (Furnari et al., 2007; Van Meir et al., 2010).

Existem duas teorias distintas sobre as células que originam os gliomas. A primeira, e mais antiga, infere que os gliomas são oriundos de células gliais maduras como astrócitos e oligodendrócitos, que sofrem mutações em oncogenes e genes supressores tumorais, o que levaria à desdiferenciação celular e desenvolvimento tumoral (Lipton e Rosenber, 1994; Paulus e Tonn, 1995). A segunda teoria, mais recente e aceita atualmente, sugere que os gliomas se originam de células progenitoras que sofreram transformação oncogênica durante seu desenvolvimento, vindo a se tornar células iniciadoras de tumor (Singh et al., 2004; Piccirillo e Vescovi et al., 2007; Piccirillo et al., 2009).

GBMs são caracterizados por alterações genéticas que afetam o controle gênico do crescimento celular, angiogênese, apoptose e invasão celular, explicando sua patogênese, rápida progressão e agressividade. Estas alterações epigenéticas também afetam a expressão de genes isolados ou a combinação de vários genes. (Nagarajan and Costello, 2009; Kim et al, 2011). Inicialmente identificou-se a amplificação ou ativação do receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR) (Wong et al., 1987; Wong et al.,

1992), sendo encontrada em cerca de 40% dos GBMs (Yan et al., 2011). Esta ativação causada pela mutação do gene é extremamente oncogênica e é gerada a partir da deleção dos éxons 2 a 7 do gene EGFR (Yan et al., 2011; Gan et al., 2009). Em seguida, estudos definiram *loci* supressores de tumor nos cromossomos 9, 10 e 17 (James et al., 1989), sendo que o gene supressor tumoral TP53 foi identificado como o principal alvo de alterações no cromossomo 17 (Rao e James, 2004 Figarella-Branger et al., 2008; Purow e Schiff, 2009;). O gene TP53 é um dos genes mais frequentemente mutados ou inativados, sendo que estas alterações podem ser encontradas em cerca de 50% dos tumores (Soussi e Bérout, 2001; Kazufumi e Hisahiro, 2011), incluindo os gliomas. A proteína p53 exerce diversas funções, incluindo regulação do ciclo celular, apoptose, senescência, metabolismo de DNA, angiogênese, diferenciação celular e resposta imune, atuando como um gene supressor tumoral (Wang e Harris, 1996; Ohgaki, 2005; Vousden e Prives, 2009; Kazufumi and Hisahiro, 2011). Além destas importantes mutações, foram identificadas também outras alterações nos cromossomos 10 e 19, com mutação de proteína homóloga à fosfatase e à tensina (PTEN) e deleção do inibidor de progressão do ciclo celular p16 (INK4a), respectivamente (Ohgaki, 2005; Ohgaki e Kleihues, 2007). O gene PTEN possui um domínio central homólogo à região catalítica da proteína tirosina fosfatase, que é importante para a proteína fosfatase (Myers et al., 1997, Ohgaki e Kleihues, 2007) e atividade da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (Maehama e Dixon, 1998; Ohgaki e Kleihues, 2007). O gene p16 está relacionado com o controle da progressão do ciclo celular da fase G1 para S (Ohgaki e Kleihues, 2007). Outra mutação identificada em gliomas de baixo grau e em um grupo de GBMs refere-se aos genes codificadores de isocitrato desidrogenase 1 (IDH1) (Smeitink, 2010). A mutação neste gene ativa a via do fator de transcrição induzido por hipóxia (HIF-1), permitindo a adaptação metabólica das células tumorais a ambientes de hipóxia e privação de nutrientes (Jansen et al., 2010).

Além das vias já citadas, a via da Proteína do Retinoblastoma (pRB) também apresenta alterações importantes no desenvolvimento dos GBMs. A RB é uma fosfoproteína considerada o protótipo de proteína supressora de tumor, e a inativação desta proteína é frequentemente encontrada em tumores. Ela exibe efeitos anti-proliferativos por ser capaz de mediar a repressão transcricional de genes requeridos na replicação de DNA e mitose, limitando a progressão do ciclo celular (Jiang et al., 2010; Knudsen e Knudsen, 2008). Ela passa por estados de fosforilação e desfosforilação

variados ao longo do ciclo celular, podendo se ligar a outras proteínas, membros da família do fator de alongamento 2 (E2F) de fatores de transcrição e proteína tirosina quinase c-Abl, conforme o *status* de fosforilação. Esta transitoriedade de fosforilação, adicionada aos diversos sítios da proteína, permitem que ela interaja com diferentes ligantes em distintas fases do ciclo celular, caracterizando-a como um dos principais moduladores de proliferação e inibição de crescimento celular (Knudsen e Wang, 1996; Nevins, 2001).

Outro gene que apresenta mutações de grande relevância em GBMs é o gene O⁶-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT) e vem sendo utilizado como preditivo de sobrevida e resposta ao tratamento com fármacos alquilantes. Este gene promotor de metilação encontra-se localizado no cromossomo 10q26, e possui acoplada uma proteína de reparação de DNA, responsável pela remoção dos grupos alquil da posição O⁶ dos resíduos de guanina, um importante sítio de alquilação de DNA (Kaina et al., 2007; Hegi et al., 2008; Kitange et al., 2009). A alquilação destes resíduos O⁶ da guanina, oriundos da ação de quimioterápicos alquilantes como a temozolamida (TMZ), são altamente citotóxicos, mas são reparados pela proteína MGMT. Esta proteína é capaz de transferir o grupo metil da guanina do DNA para seu resíduo ativo da cisteína, através de uma reação de metilação, tornando-a inativa e fazendo com que ela seja degradada (Kitange et al., 2009; Villano et al., 2009; Koukourakis et al., 2009). Elevados níveis de atividade de MGMT em células tumorais criam um fenótipo resistente e determinam falha no tratamento com agentes alquilantes. A silenciagem epigenética do gene MGMT é associada com perda na expressão do mesmo e, diminuição da atividade de reparação de DNA (Hegi et al., 2008).

Recentemente, foi identificada uma nova classe de pequenas moléculas de RNA não codificante, os microRNAs, que são capazes de regular a expressão de diferentes genes. Muitos microRNAs, definidos como onco microRNAs demonstram diferentes níveis de expressão em tumores e são capazes de afetar a transformação celular, carcinogênese e metástase, atuando como oncogenes ou, supressores tumorais (Matsubara et al., 2007; Medina et al., 2010; Yan et al., 2011). Diversos estudos demonstram que a expressão aberrante de microRNAs como miR-21, miR-221/222, miR-181s e miR-34s, exercem um papel importante na gliomagenese (Shi et al., 2008; Li et al., 2009; Moore and Zhang, 2010).

Além da amplificação ou ativação do EGFR também é observada a amplificação do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e do receptor de fator de crescimento vascular endotelial (VEGFR), o que leva a ativação constitutiva de receptor de sinalização tirosina-quinase correspondente (Brennan et al., 2009; Minniti et al., 2009; Clarke et al., 2010; Hatanpaa et al., 2010). A estimulação destes receptores pode ativar múltiplas vias de transdução de sinal, incluindo a via PI3K/AKT, vias RAS/MAP-quinase, vias STAT, entre outras (Brennan et al., 2009; Chen et al., 2009; Yin et al., 2011).

As fosfatidilinositol-3-quinases (PI3Ks) são um grupo de enzimas que fosforilam o fosfatidilinositol-3,4-bifosfato (PIP₂) na porção 3'-OH do anel inositol, dando origem ao segundo mensageiro fosfatidilinositol-3,4,5- trifosfato (PIP₃), que é essencial para a translocação de Akt (também conhecida como PKB) para a membrana plasmática, onde a mesma também é fosforilada. A ativação de Akt medeia respostas celulares como proliferação, sobrevivência, motilidade e metabolismo (Kong & Yamori, 2007; Marone et al., 2008; Roy et al., 2009;), fundamentais no processo tumoral. A família das PI3Ks é dividida em três classes (I, II e III). A classe I, por sua vez, é dividida em duas subclasses: IA e IB. A subclasse IA que compreende as isoformas PI3K α , PI3K β e PI3K δ , é ativada através de receptores tirosina-quinase pela ligação de hormônios, fatores de crescimento, citocinas, integrinas e outros estímulos extracelulares. A subclasse IB é composta apenas pela isoforma PI3K γ , que é ativada por receptores acoplados à proteína G. O aumento constitutivo da sinalização da PI3K pode ter efeito deletério nas células, levando à proliferação descontrolada, migração facilitada e adesão independente de crescimento. Estes eventos favorecem a formação de tumores malignos, mas também o desenvolvimento de inflamação crônica, alergia, diabetes, problemas cardiovasculares e doenças autoimunes (Gharbi et al., 2007; Ito et al., 2007; Marone et al., 2008).

A família das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAP-quinases) são específicas para serina/treonina, sendo composta por ERK1, ERK2, p38 e quinases c-Jun N-terminal (JNK) (Yang et al., 2011). Elas são capazes de transmitir diversos estímulos extracelulares (fator de crescimento mitogênico, estresse do microambiente, agentes pró-apoptóticos) para o núcleo, através da ativação de outras quinases, com o objetivo de regular a proliferação celular, o bloqueio da síntese de DNA, a diferenciação, a migração celular e, a reorganização do citoesqueleto (Yu et al., 2001;

Johnson et al., 2003; Reddy et al., 2003; Wada et al., 2004; Carnero et al., 2008). Estudos prévios sugerem que a ERK1/2 também é capaz de induzir apoptose. A duração e intensidade da ativação da ERK parecem ser importantes para determinar o desfecho (crescimento, sobrevivência ou apoptose), indicando a dualidade da regulação da sobrevivência e morte através da ERK (Chen et al., 2003; Yang et al., 2011). Segundo Werlen et al (2003), dependendo da afinidade do ligante, a via da ERK é ativada antes da via da p38 e JNK, resultando em apoptose.

Até 2007, os GBMs eram classificados como primários (oriundos de células progenitoras ou astrocíticas) ou secundários (oriundos de astrocitomas de grau II ou III). Esta classificação dependia do processo gliomagênico e das vias que se encontravam alteradas nas células tumorais (Nikiforova e Hamilton, 2011; Ohgaki e Kleihues, 2007) (**Figura 1**).

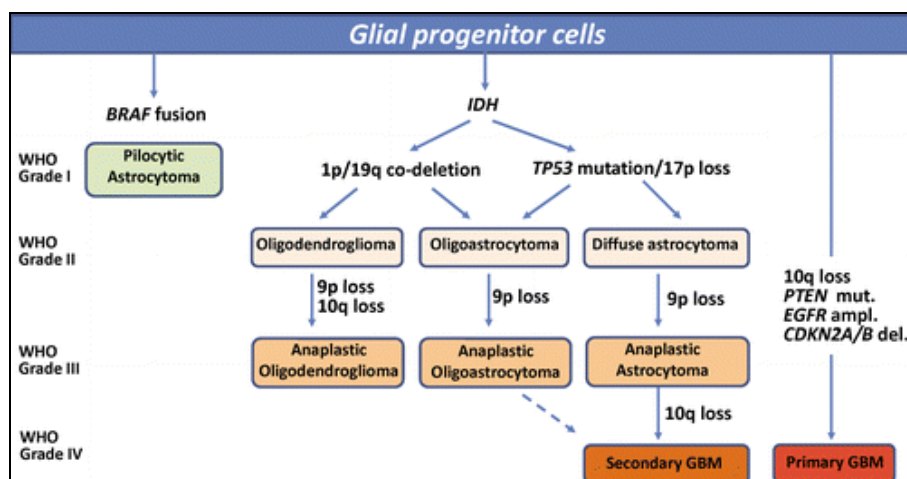


Figura 1. Classificação dos GBMs em primários e secundários. Os GBMs podem ser classificados como primários quando se originam de células progenitoras, ou como secundários, quando se originam de tumores de menor grau que sofrem mutações. Obtido de: *Molecular Diagnostics of Gliomas* (Nikiforova e Hamilton, 2011).

O projeto piloto Atlas do Genoma de Cânceres (TCGA) foi criado pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos com o objetivo de catalogar e descobrir as alterações genômicas causadoras de câncer em grande coortes de tumores humanos por meio de análises multi-dimensionais. Os primeiros tumores estudados pelo TCGA foram os GBMs devido à elevada incidência e baixas opções terapêuticas eficientes para seu tratamento (Nature, 2008). Com base nestes dados três vias se mostraram frequentemente alteradas em GBM, explicando mais de 90% das alterações genéticas encontradas nestes tumores (**Figura 2**). As vias são: Via dos Receptores Tirocina Cinase/RAS/PI3K; Via da P53; Via da Proteína Retinoblastoma (Rb).

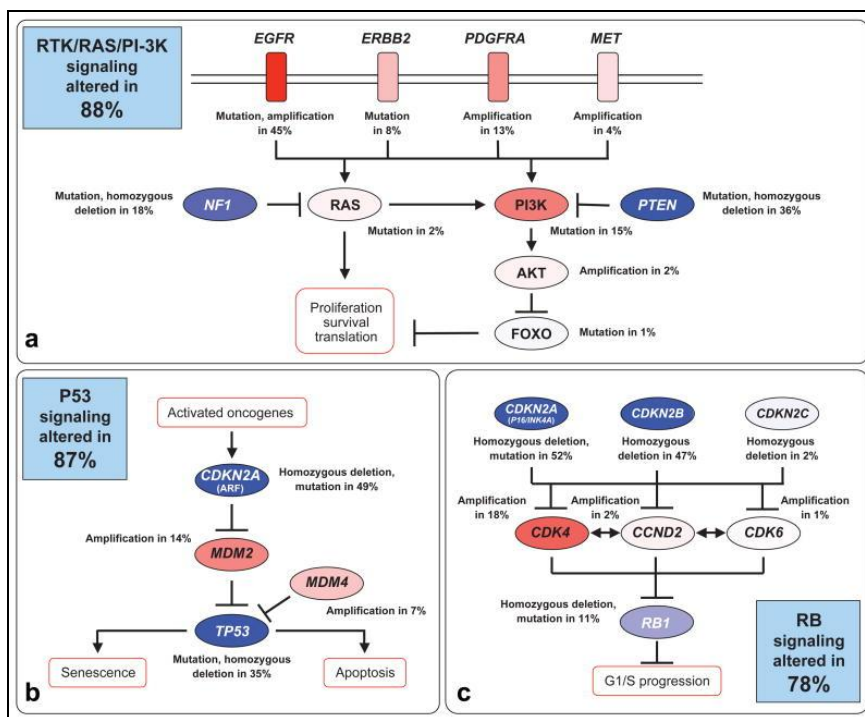


Figura 2: Principais vias de sinalização alteradas em GBMs. São indicados os componentes de cada via (RTK/RAS/PI3K, p53, RB) a natureza das alterações e a porcentagem dos tumores afetados. Obtido de: *Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways* (Nature, 2008).

Com os avanços da caracterização molecular dos GBMs e da obtenção de dados da TCGA, foi possível definir quatro etiologias tumorais dentre os gliomas (**Figura 3**).

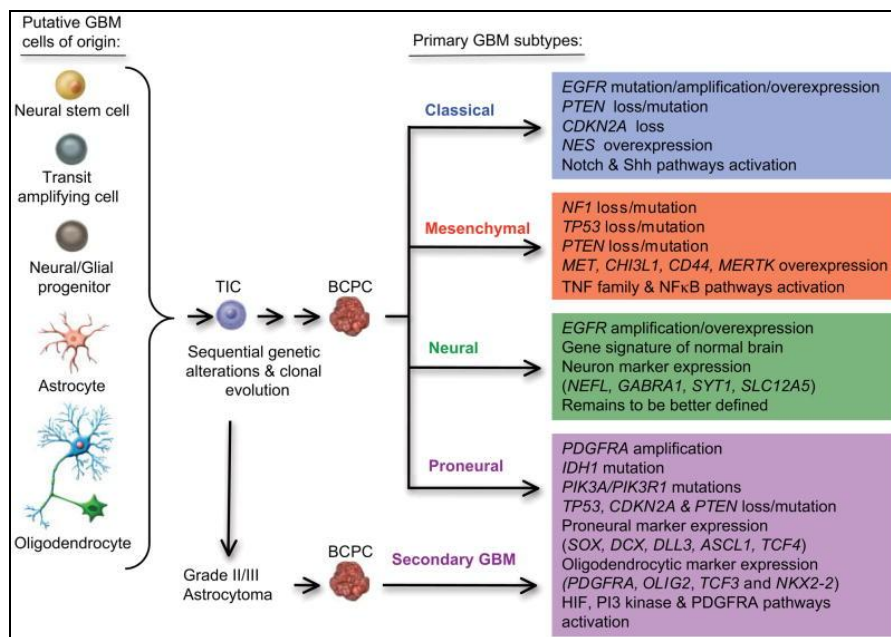


Figura 3: Classificação molecular e etiologia dos GBMs. Com a evolução da compreensão e caracterização molecular das alterações genéticas encontradas em GBMs, foi possível agrupá-los em 04 subtipos diferentes (clássico, neural, mesenquimal ou próneural). Os potenciais tipos celulares indicados como iniciadores dos GBMs são mostrados à esquerda. Obtido de: *Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma.* (Van Meir et al, 2010)

O prognóstico de pacientes diagnosticados com GBM é ruim e a sobrevivência média é de aproximadamente 12 meses (Stupp et al., 2005; Braganhol, et al., 2006; Koukourakis et al., 2009), sendo que apenas cerca de 3-5% dos pacientes sobrevivem em torno de 5 anos (Brandes et al., 2008, Vredenburg et al., 2009). Estes tumores cerebrais geralmente se desenvolvem rapidamente, sem evidências clínicas, radiológicas ou morfológicas (Kanu et al., 2009), o que dificulta o diagnóstico precoce. Atualmente, os gliomas malignos são melhores manejados, incorporando a ressecção cirúrgica, a radioterapia adjuvante pós-operatória e a quimioterapia adjuvante (Kanu et al., 2009; Wick et al., 2011). A terapia padrão para GBM primários inclui neurocirurgia seguida por radioterapia (30 vezes de 2 Gy) combinada com TMZ diária (75 mg/m²), seguido por seis ciclos mensais subsequentes de quimioterapia adjuvante com TMZ (150-200 mg/m²/dia durante 5 dias) (Stupp et al., 2005; Brandes et al., 2008; Villano et al., 2009). Com este regime, a sobrevivência global mediana aumentou de 12,1 para 14,6 meses, e a taxa de sobrevivência em dois anos passou de 10,4 para 26,5 % (Stupp et al., 2005, Villano et al, 2009).

A TMZ representa um dos maiores avanços alcançados no tratamento de GBMs durante as últimas décadas; entretanto, muitos pacientes acabam recorrendo rapidamente ou sendo resistentes a esta medicação. A TMZ é um agente alquilante de

DNA, que se converte no metabólito ativo 5-(3-metiltriazeno)-imidazol-4-carboxamida (MTIC) por ação do pH, não necessitando de metabolismo hepático (Friedmann et al., 2000; Darkes et al., 2002,; Tentori e Maziani, 2009). O MTIC atua causando danos ao DNA por metilação da posição O⁶ da guanina, gerando a O⁶-metilguanina (O⁶MeG), a qual se parecia incorretamente com a timina e induz o dano no DNA, seguido de parada no ciclo e morte celular (Darkes et al., 2002; Tentori e Maziani, 2009). Esta metilação também pode ocorrer na posição N⁷ da guanina, mais comum ou, na posição O³ da adenina; contudo, as células que apresentam estas metilações apresentam menos sensibilidade à TMZ quando comparadas com a alquilação na posição O⁶ da guanina (Friedmann et al., 2000). A TMZ, por ser uma molécula de baixo peso molecular, possui a capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica se tornando efetiva no tratamento de tumores cerebrais, além de apresentar biodisponibilidade oral.

A resistência aos agentes alquilantes, como a TMZ, por meio da reparação de DNA pela enzima MGMT representa uma importante barreira no tratamento de pacientes com gliomas de alto grau, principalmente com GBM (Brandes et al., 2008; Hegi et al., 2008; Kitange et al., 2009; Koukourakis et al., 2009; Villano et al., 2009). Pacientes que apresentam o gene metilado possuem um prognóstico mais favorável, pois elevados níveis de MGMT ou a falta de promotores de metilação são capazes de promover o reparo do DNA, por meio da remoção dos grupamentos metila adicionados pela TMZ às bases de DNA. Esta reparação confere resistência a esta medicação, aumenta as taxas de recorrência, prejudica o prognóstico e a sobrevida destes pacientes (Kaina et al., 2007; Hegi et al., 2008; Kitange et al., 2009; Ohka et al., 2011). A sobrevida de pacientes com o gene não metilado é de 15,3 meses comparada a 21,7 meses de pacientes com a metilação (Villano et al., 2009).

As chalconas caracterizam uma família de compostos que possuem como núcleo fundamental o 1,3-diarilpropano (**Figura 4**), modificado pela presença de uma ligação olefínica, de um grupamento cetona e/ou de um grupo hidroxila. Este núcleo é formado por dois anéis aromáticos ligados por três carbonos α , β insaturados e um grupo carbonil (Takashi et al., 2007). São compostos precursores da via de biossíntese dos flavonóides que apresentam pigmentação amarela (que passa a vermelha em meio alcalino), sendo encontrados em diferentes órgãos vegetais, sobretudo nas flores (Simões et al., 2003). As chalconas podem ser encontradas em várias partes da planta como nas flores, sementes, folhas, caule e raízes, em gêneros como *Angelica*,

Glycyrrhiza, Humulus e Scutellaria, todas plantas de uso popular tradicional para doenças infecciosas e crônicas (Ducki, 2007). Além disso, as chalconas são componentes encontrados na dieta humana, rica em frutas e vegetais (Hsu et al., 2006).

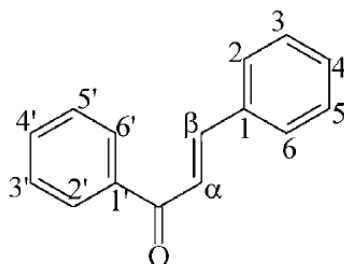


Figura 4. Núcleo fundamental das chalconas. Núcleo fundamental das chalconas, 1,3-diarilpropano, modificado pela presença de uma ligação olefínica, de um grupamento cetona e/ou de um grupo hidroxila. Obtido de: *Antimitotic and Antiproliferative Activities os Chalcones: Forward Structure-Activity Relationship* (Boumendjel et al, 2008)

Estudos prévios demonstraram que a estrutura simples e o fácil processo de obtenção destes compostos, os tornam interessantes para a realização de estudos de estrutura-atividade (Rogmanoli et al., 2008). Inúmeros substituintes têm sido testados e muitos ainda precisam ser avaliados com o intuito de elucidar o mecanismo de ação das chalconas, que poderiam representar importantes alternativas terapêuticas para diferentes tipos tumorais.

As chalconas apresentam diversas atividades farmacológicas, como ação anti-inflamatória, antipirética, analgésica, antimalárica e antibacteriana (Makita et al., 1996; Ko et al., 2003; Wong et al., 2005; Ducki, 2007; Cheng et al., 2008; Kontogiorgis et al., 2008). Ademais, as chalconas são capazes de inibir a produção de óxido nítrico (NO) estimulada por lipopolissacarídeo bacteriano, a expressão de óxido nítrico sintase (iNOS), a atividade da ciclooxigenase-2 (COX-2), a produção de fator de necrose tumoral α (TNF- α), além de possuírem ação citotóxica e anti-oxidante (Wong et al., 2005; Shen et al., 2007; Boumendjel et al, 2008; Cheng et al., 2008; Loa et al., 2009).

Seu potencial antitumoral está relacionado com sua capacidade de reduzir a proliferação celular por meio do bloqueio do ciclo celular na fase G2/M (Hsu et al., 2006; Nishimura et al., 2007; Shen et al., 2007) como também na fase G1 (Rao et al, 2010; Park et al, 2008), dependendo das chalconas e de sua estrutura química. Alguns estudos demonstraram uma possível correlação entre o efeito sobre o ciclo celular e a presença de radicais metoxi nos carbonos 2', 4' e 6' do anel A das chalconas testadas (Go et al., 2005; Ducki, 2007; Boumendjel et al., 2008). Este potencial antitumoral também está relacionado com a capacidade das chalconas em induzirem apoptose e

inibirem a polimerização da tubulina (Nishimura et al., 2007; Shen et al., 2007). Este efeito pode ser observado em chalconas às quais o radical flúor foi inserido na posição α da dupla ligação, demonstrando que a conformação cis-trans é importante para a atividade biológica destes compostos (Romagnoli et al., 2008).

As chalconas são capazes de elevar significativamente a expressão das proteínas p21 e p27 (Shen et al., 2007; Hsu et al., 2006) e diminuir os níveis de ciclina B1, ciclina A e Cdc2, além de aumentar a expressão de Bax e Bak e reduzir os níveis de Bcl-2 e Bcl-XL, ativando a via apoptótica mitocondrial (Hsu et al., 2006; Nishimura et al., 2007; Shen et al., 2007). Este potencial é ampliado pela capacidade desses compostos em inibir a angiogênese, um processo fundamental para o crescimento tumoral (Nishimura et al., 2007; Mojzis et al., 2008). Isso ocorre por meio da regulação da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), das metaloproteinases de matriz (MMPs), do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), da inibição do fator de transcrição NF- κ B e das vias de sinalização PI3K/Akt (Mojzis et al., 2008). Estudos recentes demonstraram que compostos que possuem o anel quinoxalina (**Figura 5**) em sua estrutura, apresentam capacidade de inibir o processo angiogênico, através da inibição da expressão de VEGF e do fator de hipóxia induzido 1α (HIF- 1α), que requerem o envolvimento de inúmeras vias como PI3K/AKT/mTOR/4E-BP1 (Weng et al., 2011). Desta forma, estes compostos se tornando potenciais candidatos para o tratamento de tumores ou doenças associadas com desordens no processo angiogênico (Corona et al., 2009).

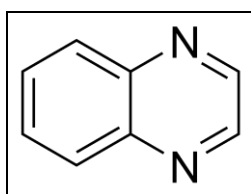
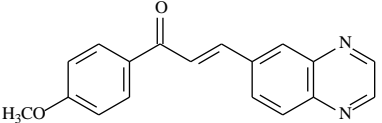
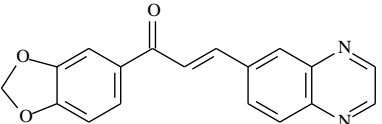
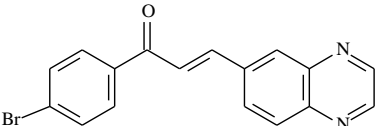
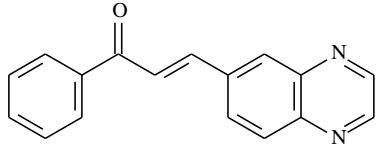
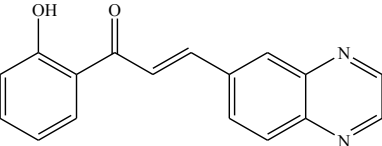
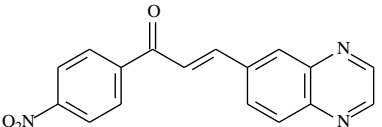


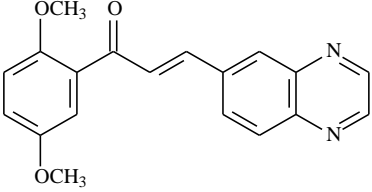
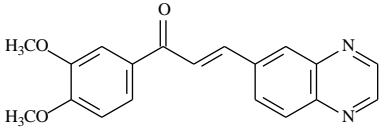
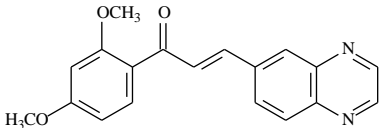
Figura 5: Anel quinoxalina. Obtido de: *Recent advances in the solid-phase combinatorial synthetic strategies for the quinoxaline, quinazoline and benzimidazole based privileged structures* (Kamal et al., 2006).

Estudos realizados com linhagens de tumor de fígado demonstraram que as chalconas possuem maior potência inibitória sobre a proliferação celular, quando comparadas a flavonóides, cromonas, flavonas, isoflavonas e cumarinas (Ko et al.,

2003). Assim, é possível sugerir que as chalconas podem representar alvos de grande relevância para o desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento do câncer.

Diferentes chalconas derivadas da quinoxalina e baseadas no inibidor seletivo de PI3K γ , AS605240, foram sintetizadas no Departamento de Química, da UFSC por Alessandra Marcarello, sob orientação dos Drs. Paulo César Leal e Rosendo A. Yunes (Tabela 1). No projeto foram avaliados nove compostos, mas apenas oito foram citados no artigo. Isto ocorreu por problemas na síntese química do composto N6.

Tabela 1. Chalconas derivadas da quinoxalina			
Composto	Composto (artigo)	Estrutura Química	Peso Molecular (g)
N2	1		C ₁₈ H ₁₄ N ₂ O ₂ 290.32 290.105528 C 74.47% H 4.86% N 9.65% O 11.02%
N3	2		C ₁₈ H ₁₂ N ₂ O ₃ 304.30 304.084792 C 71.05% H 3.97% N 9.21% O 15.77%
N4	3		C ₁₇ H ₁₁ BrN ₂ O 339.19 338.005474 C 60.20% H 3.27% Br 23.56% N 8.26%
N5	4		C ₁₇ H ₁₂ N ₂ O 260.30 260.094963 C 78.44% H 4.65% N 10.76% O 6.15%
N6	--		C ₁₇ H ₁₂ N ₂ O ₂ Exact Mass: 276,09 Mol. Wt.: 276,29 C, 73,90; H, 4,38; N, 10,14; O, 11,58
N7	5		C ₁₇ H ₁₁ N ₃ O ₃ 305.29 305.080041 C 66.88% H 3.63% N 13.76% O 15.72%

N9	6		$C_{19}H_{16}N_2O_3$ 320.35 320.116093 C 71.24% H 5.03% N 8.74% O 14.98%
N10	7		$C_{19}H_{16}N_2O_3$ 320.35 320.116093 C 71.24% H 5.03% N 8.74% O 14.98%
N12	8		$C_{19}H_{16}N_2O_3$ 320.35 320.116093 C 71.24% H 5.03% N 8.74% O 14.98%

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

A presente dissertação teve por objetivo avaliar, *in vitro*, o efeito de uma série de chalconas derivadas da quinoxalina sobre linhagens de glioma.

Objetivos Específicos

- Realizar um *screening in vitro* para a determinação da atividade antiproliferativa de uma série de chalconas derivadas da quinoxalina sobre linhagens de glioma;
- Analisar a ação sobre a viabilidade celular das chalconas derivadas da quinoxalina em linhagens de glioma;
- Verificar a ação das chalconas derivadas da quinoxalina sobre o ciclo celular de células de linhagens de gliomas;
- Verificar a ação do inibidor de PI3K γ , AS605240, sobre as linhagens de glioma;
- Comparar a ação das chalconas derivadas da quinoxalina com o AS605240;
- Verificar a ativação de Akt e o envolvimento da PI3K no mecanismo de ação destes compostos;
- Verificar a relevância da ERK 1/2 no mecanismo de ação dos compostos testados.

3. MANUSCRITO DO TRABALHO EXPERIMENTAL

Os resultados do presente trabalho foram submetidos à revista *European Journal of Medicinal Chemistry*®, fator de impacto 3.193 (2011) e aceitos para publicação no dia 14 de dezembro de 2011 (Anexo I, II e III).

Activity of novel quinoxaline-derived chalcones on *in vitro* glioma cell proliferation

Tânia R. Mielcke^{a,b}, Alessandra Mascarello^c, Eduardo Filippi-Chiela^d, Rafael F. Zanin^{b,f}, Guido Lenz^d, Paulo César Leal^c, Louise Domeneghini Chiaradia^c, Rosendo Augusto Yunes^c, Ricardo José Nunes^c, Ana M. O. Battastini^e, Fernanda B. Morrone^{b,f},
Maria M. Campos^{a,f,g,*}

^aPostgraduate Program in Medicine and Health Sciences, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil.

^bSchool of Pharmacy, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil.

^cDepartment of Chemistry, UFSC, Florianópolis, SC, Brazil.

^dBiophysics Department, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

^eDepartment of Biochemistry, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

^fInstitute of Toxicology and Pharmacology, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil.

^gSchool of Dentistry, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil.

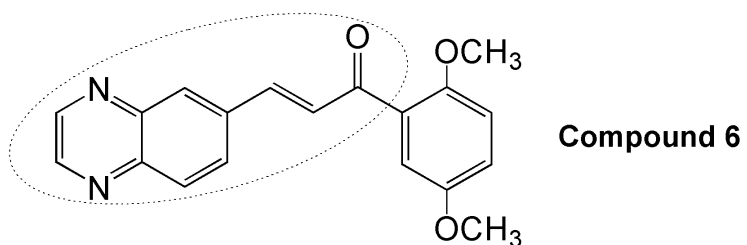
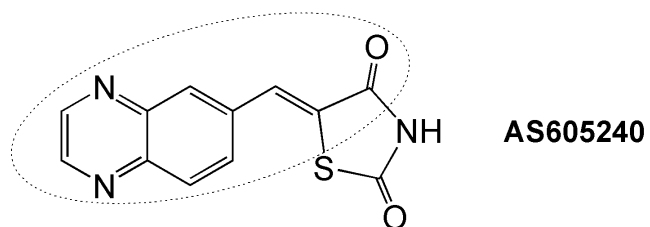
***Corresponding author:** School of Dentistry, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Partenon, 90619-900, Porto Alegre, Brazil.

Phone Number: 55(51)3320 4367; Fax Number: 55(51)3320 3868;

e-mail: camposmartha@yahoo.com.br; maria.campos@pucrs.br

Graphical Abstract

Chalcones derived from quinoxaline-6-carbaldehyde, structurally based on the selective PI3K γ inhibitor AS605240, were assayed in glioma cell lines from human and rat origin (U-138 MG and C6, respectively), and compound **6** (b) presented the best activity (2.64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for U-138 MG cells and 1.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for C6 cells).



Abstract

Gliomas are the most common and devastating tumors of the central nervous system (CNS). Many pieces of evidence point out the relevance of natural compounds for cancer therapy and prevention, including chalcones. In the present study, eight synthetic quinoxaline-derived chalcones, structurally based on the selective PI3K γ inhibitor AS605240, were evaluated for anti-proliferative activity and viability inhibition using glioma cell lines from human and rat origin (U-138 MG and C6, respectively), at different time-periods of incubation and concentrations. The results revealed that four chalcones (compounds **1**, **6**, **7** and **8**), which present methoxy groups at A-ring, displayed higher efficacies and potencies, being able to inhibit either cell proliferation or viability, in a time- and concentration-dependent manner, with an efficacy that was greater than that seen for the positive control compound AS605240. Flow cytometry analysis demonstrated that incubation of C6 cells with compound **6** led to G1 phase arrest, likely indicating an interference with apoptosis. Furthermore, compound **6** was able to visibly inhibit AKT activation, allied to the stimulation of ERK MAP-kinase. The chalcones tested herein, especially those displaying a methoxy substituent, might well represent promising molecules for the adjuvant treatment of glioma progression.

Keywords: synthesis, quinoxaline, chalcones, anti-cancer activity, anti-proliferative, glioma cells

1. Introduction

Gliomas comprise several types of primary brain tumors, accounting for approximately 50% of all neoplasms of the central nervous system (CNS) [1-3]. Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common, aggressive and deadly malignant glioma in adults [4-6]. This kind of brain tumor is characterized by marked cell proliferation and invasiveness with a rapid progression, presenting a high grade of recurrence [2,7-9]. Therefore, the prognosis for the patients with these tumors is poor. The mean survival is around one year [8,10,11] and few patients survive beyond five years [12]. Treatment options for patients with GBM are very limited, or in most situations they are ineffective. Despite the increasing advances in radiotherapy, chemotherapy, and surgical techniques, the survival rate for these patients remains low [13]. Therefore, there is an urgent need for novel and effective therapies for treating these tumors. In this regard, molecules based on natural products represent very interesting therapeutic alternatives.

Extensive research over the past decades has identified numerous dietary and botanical natural compounds with clear anti-cancer effects. They might also present synergistic beneficial effects when used in combination with known chemotherapeutic drugs [14,15]. Previous studies have shown that the simple chemical structure and the uncomplicated process of synthesis make plant-derived polyphenols an attractive scaffold for the development of new compounds [16,17].

Chalcones are a group of natural precursors of flavonoid and isoflavonoids synthesis in high plants [18-21], and they are cancer preventive components found in human diet rich in fruits and vegetables [20, 22]. Concerning the chemical structural level, these compounds are open-chained molecules, in which the two aromatic rings are joined by a three-carbon α,β -unsaturated carbonyl system (1,3-diphenyl-2-propen-1-one) [16, 23, 24]. Several studies have shown that chalcones display a wide variety of biological and pharmacological proprieties that include anti-proliferative and anti-cancer activities [25-27]. Clinical trials have shown that these compounds reach reasonable plasma concentrations, they are not associated to marked toxicity [28] and flavonoids and their derivatives are able to cross the brain blood barrier [29, 30].

A large number of chemical structures have been tested, and it was reported that hydroxy-derivatives of chalcones display marked anti-proliferative effects on cancer cells. These groups are likely necessary for the inhibitory effects of glutathione S-

transferase, what is associated to cancer cell sensitization for chemotherapy agents [15, 31]. Other chemical modifications of chalcones have been investigated, such as hydrogenation and bromination across the carbon-carbon double bond, but they failed in potentiate the anti-tumor effects of chalcones [16]. Recently, it was demonstrated that quinoxaline derivatives display a broad spectrum of biological activities. Of relevance, some of these compounds have been described as potential candidates for the treatment of cancer and disorders associated with angiogenesis [32].

The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway is implicated in a variety of cellular processes including cell growth, proliferation, and survival, which is frequently deregulated in cancer, including glioma [33, 34, 35]. The alteration of this pathway through mutation of its coding genes increases the activation status of the signaling and can thus lead to cellular transformation [33] and cancer development [36]. Given the frequency of deregulated PI3K signaling, the modulation of this pathway might have therapeutic potential in glioma and other cancer types. AS605240 [5-(quinoxalin-6-ylmethylene)thiazolidine-2,4-dione] is a low-toxicity and selective inhibitor of the PI3K γ isoform, which is able to suppress inflammation in different experimental models [37], and further studies are currently testing its effects on tumor cells [38], considering the involvement of this signaling pathway in cancer development. Then, in the present study, we have examined the *in vitro* effects of eight novel synthetic quinoxaline-derived chalcones, structurally based on the selective PI3K γ inhibitor AS605240 (Figure 1), on viability, proliferation, cell cycle, and signaling pathways, by using human U-138 MG and rat C6 glioma cell lineages.

ERK1 and ERK2 are members from the family of MAP-kinases (mitogen-activated protein kinases), and are activated by various growth factors, inducing the transition from the quiescent state into the cell cycle. ERK signaling pathways are also involved in cell proliferation, differentiation, actin cytoskeleton reorganization, and cell migration. Moreover, ERKs are also involved in the stress response and cell death [39-42]. Therefore, this is another relevant signaling pathway to be investigated in cancer research.

INSERT FIGURE 1

2. Chemistry

The quinoxaline-6-carbaldehyde (**12**) was synthesized from 3,4-diaminobenzoic acid (**9**) as previously described [43] and presented in Figure 2, with yield of 80%. Eight chalcones (**1-8**) were prepared by aldolic condensation between quinoxaline-6-carbaldehyde (**12**) and corresponding acetophenones, in methanol and KOH 50% w/v, under magnetic agitation and room temperature. The novel chalcones were obtained with yields between 41% and 93%, and the structures were confirmed by chemical identification data: ¹H NMR, ¹³C NMR, IR and elementary analysis. ¹H NMR spectra revealed that all structures were geometrically pure and configured *E* ($J_{H\alpha-H\beta} = \sim 16.0$ Hz).

INSERT FIGURE 2

3. Biological results and discussion

As a first approach, we performed a screening using both U-138 MG and C6 glioma cell lines, in order to assess the inhibitory effects of the chalcones. This was carried out following 48 h of incubation, at concentrations between 0.1 and 10 $\mu\text{g/mL}$. All tested chalcones produced a significant decrease of C6 rat glioma cell line viability, at 5 $\mu\text{g/mL}$ (Table 1). The estimated IC_{50} values (accompanied by the confidence interval) for the rat cells ranged from 2.66 (2.09 – 3.38) $\mu\text{g/ml}$ to 9.19 (8.93 – 9.48) $\mu\text{g/ml}$. Concerning the U-138MG glioma cells, with exception of the compound **5**, all other compounds produced a significant inhibition of cell viability at 5 $\mu\text{g/mL}$. However, for the human cell line, it was not possible to calculate the IC_{50} values, as the calculated percentages of inhibition did not exceed 50 % (Table 1). As demonstrated in the present study for the tested chalcones, Zamin et al. (2009) also showed that rat C6 and human U138 glioma cell lines displayed a different sensitivity to the treatment with the compounds resveratrol and quercetin, two well-studied natural polyphenols [29].

INSERT TABLE 1

From this experimental set, it was possible to observe that four of tested chalcones (compounds **1**, **6**, **7** and **8**) displayed higher efficacies and potencies. This is especially notable if we compare with the low inhibitory rates obtained for reference

chemotherapy drugs, such as cisplatin and doxorubicin [44]. Of note, these four chalcones present a similar chemical structure, having methoxy groups in the ring A. In fact, previous studies demonstrated that the activity of chalcones is largely dependent on the presence and position of the substituted groups added in both rings A and B. It has been reported that dimethoxylation and trimethoxylation are highly beneficial for the anticancer activity [17, 45-47]. In our studies, chalcone **6**, dimethoxylated in positions 2 and 5 at A-ring, displays the best activity.

As a next step, we assayed the compounds **1**, **6**, **7** and **8** in concentrations ranging from 0.1 to 10 $\mu\text{g/mL}$, at different periods of incubation (24, 48 and 72 h), by using a hemocytometer. Cell counting assay revealed marked inhibitory effects on the proliferation of either human or rat cell lines (Table 2). For this assay, the estimated IC_{50} values ranged from 2.29 (2.03 – 2.58) $\mu\text{g/ml}$ to 2.67 (2.55 – 2.80) $\mu\text{g/mL}$, indicating a high potency for these compounds (Table 2). Of high interest, the chemotherapy drug doxorubicin, incubated during 48 h, at 2- $\mu\text{g/mL}$ concentration, produced an inhibition of $27 \pm 3 \%$ and $31 \pm 4 \%$, in C6 and U-138 MG, cells, respectively (results not shown).

INSERT TABLE 2

The concentration-dependent effects of compounds **1**, **6**, **7** and **8**, at both the MTT and the cell counting assays are depicted in the Figures 3 to 6. From these figures, it is possible to observe that compounds **1**, **6**, **7** and **8** presented anti-tumor-like effects in concentrations as low as 0.1 to 0.5 $\mu\text{g/mL}$. Furthermore, it is feasible to observe that maximal inhibitions for these four chalcones were observed between 48 h and 72 h of treatment, whereas the compounds **1**, **6**, **7** and **8** failed to significantly alter cell viability and proliferation when incubated for 24 h. This assembly of results revealed a concentration-related profile of inhibition for the tested chalcones on either the cell viability or proliferation. In addition, the effects of these four chalcones were found to be time-dependent, being maximal between 48 and 72 h following *in vitro* treatment.

INSERT FIGURES 3, 4, 5 and 6

AS605240 is a well-characterized selective PI3K γ inhibitor, which blocks human recombinant PI3K γ in an ATP-competitive manner, displaying marked anti-inflammatory effects in several animal disease models [37, 48]. The chalcones derived from quinoxaline-6-carbaldehyde analyzed in this work are structurally based on this selective PI3K γ inhibitor. Therefore, some experiments were conducted with the aim of comparing the effects of quinoxaline-derived chalcones to those displayed by AS605240. The glioma cells were treated with AS605240 at the concentrations of 100 nM, 10 μ M and 30 μ M [37], during 48 h, and subsequently evaluated in the MTT and cell counting assays. The results show that AS605240 failed to significantly affect C6 and U-138 MG cell viability and proliferation at the concentration of 100 nM, whereas this compound visibly reduced these parameters at 10 and 30 μ M (Figure 7). The percentages of inhibition for the concentration of 30 μ M were 35 \pm 2% and 73 \pm 4% for C6; and 10 \pm 3% and 10 \pm 0.2% for U-138 MG, considering the viability and the proliferation, correspondingly (Figure 8). It is worth mentioning that the concentration of 5 μ g/ml of the compound **6** (which corresponds to 16 μ M) displayed inhibitions of 50 \pm 7 % for C6 viability and 85 \pm 8 % for C6 proliferation; and 36 \pm 1 % for U-138 MG viability and 87 \pm 4 % for proliferation of this cell line. This series of results suggest a greater efficacy to compound **6**, in comparison to the reference compound AS605240, especially concerning the cell lineage U-138 MG.

INSERT FIGURES 7 and 8

Previous literature data demonstrated that natural and synthetic chalcones are able to induce cell cycle arrest and apoptosis in different cancer cell lines [17, 26]. To examine the possible mechanisms responsible for the inhibitory effects displayed by the quinoxaline-derived chalcones in our study, we have used flow cytometry analysis. For this purpose, we have selected the compound **6**, which presented the more favorable profile in our experiments. The results demonstrate that incubation of compound **6** caused an accumulation of cells in sub-G1/G1 phases in C6 cells at 6 and 12 h (results not shown). When assessed after 24 h of incubation, **6** (2.5 μ g/ml) visibly increased the cell population of the sub-G1/G1 phases from 57.9 to 66.4, when compared with the control group (Figure 8). It is feasible to suggest that part of the decrease in glioma cell viability caused by **6** is likely associated with cell cycle arrest at the G1 phase.

INSERT FIGURE 8

It has been demonstrated that alterations of the PI3K/Akt activation might lead to cellular transformation [33] and cancer development [46]. In tumor cells, PI3K plays an important role in tumor initiation, growth and proliferation. Inhibition of PI3K may thus have the potential to inhibit formation of secondary-site metastases [49-52]. To examine the possible modulation of PI3K γ , we performed flow cytometry experiments with compound **6** and the selective PI3K γ inhibitor AS605240, as the positive control drug. As expected, both the compound **6** and AS605240 were able to reduce AKT activation, according to assessment at 15 and 30 min. Of note, differently from AS605240, the compound **6** led to increased activation of ERK 1/2 MAP-kinase, indicating additional mechanisms of action for this compound (Figure 9). Nevertheless, we can infer that inhibition of PI3K signaling may be related with the reduction of cell proliferation observed in our previous results and can be one of the mechanisms involved in the anti-tumor actions of chalcone **6**. Furthermore, the ability of compound **6** in positively modulating ERK 1/2 activation might possibly accounts for cell death, likely by inducing apoptosis. In fact, previous studies suggest that apoptosis might be induced by the disruption of MAP-kinase signal transduction. The duration and intensity of ERK activation appear to be important in determining the cell fate (growth, survival or apoptosis), indicating that ERK may have a dual role in the regulation of cell survival and death [53, 54]. According to Werlen and col. (2003), depending on the affinity of the ligand, the ERK pathway is activated before p38 and JNK, resulting in cell apoptosis [55]. In support of this, our results showed that compound **6** led to marked ERK 1/2 activation, which was accompanied by increased granularity of the cells (data not shown).

INSERT FIGURE 9

It is obviously necessary to investigate the ability of these chalcones to cross the blood-brain barrier, as cerebral sites need to be reached. Of interest, previous studies have shown that flavonoids and their derivatives were able to cross this barrier [29, 30]. Further *in vitro* and *in vivo* studies should be performed for verify this matter. Thus, the

synthetic quinoxaline-derived compounds **1**, **6**, **7** and **8** might well represent promising molecules for the adjuvant treatment of glioma progression.

4. Conclusions

The present results show for the first time the activity of synthetic quinoxaline-derived chalcones in two different glioma cell lines. These results clearly suggest that compounds **1**, **6**, **7** and **8** might represent promising molecules for the treatment of glioma progression, although the *in vivo* efficacy of these chalcones remains to be confirmed in future studies. Nevertheless, these chalcones might represent potential useful alternatives for treating gliomas, even when used alone or in combination with currently available chemotherapy agents.

5. Materials and Methods

5.1. Preparation of the compounds

All reagents used were obtained commercially (Sigma–Aldrich), except the quinoxaline-6-carbaldehyde, which was obtained as previously described [43] by condensation between 3,4-diaminobenzoic acid (**9**) and glyoxal at reflux with ethanol and acetic acid, generating the quinoxalinecarboxylic acid (**10**) with yield of 25%. Compound **10** was then reduced to its primary alcohol (**11**) with LiAlH₄ in THF, which was after oxidized to aldehyde (**12**) with pyridine-chlorochromate in dichloromethane (Figure 2), with yield of 80%. The novel chalcones (**1-8**) were prepared by magnetic stirring with acetophenone (1 mmol), methanol (30 ml), KOH 50% w/v (5 ml) and quinoxaline-6-carbaldehyde (**12**) (1 mmol), at room temperature for 24 h. Distilled water and chloridric acid 10% were added in the reaction for total precipitation of the compounds. The compounds were then obtained by vacuum filtration and later recrystallized in dichloromethane/hexane. The purified chalcones were obtained with yields between 41% and 93%.

5.2. Physico-chemical data of the compounds

The structures were identified using melting points (m.p.), infrared spectroscopy (IR), ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and elementary analysis. Melting points were determined with a Microquímica MGAPF-301 apparatus

and are uncorrected. IR spectra were recorded with an Abb Bomen FTLA 2000 spectrometer on KBr disks. Elementary analyses were obtained with a CHNS EA 1110. Percentages of C and H were in agreement with the product formula (within 0.4% of theoretical values to C). NMR (^1H and ^{13}C NMR) were recorded on Varian Oxford AS-400 (400 MHz), using tetramethylsilane as internal standard. ^1H NMR spectra revealed that all the structures were geometrically pure and configured *E* ($J_{\text{H}\alpha\text{-H}\beta} = \sim 16.0$ Hz).

(2*E*)-1-(4-methoxyphenyl)-3-(quinoxalin-6-yl)prop-2-en-1-one (1). Cream solid, m.p. 160-161°C; ^1H NMR (CDCl_3) δ 3.92 (s, 3H, OCH_3), 7.02 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, $\text{H}_{3'}$, $\text{H}_{5'}$), 7.76 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz, H_α), 8.00 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz, H_β), 8.09 (m, 1H, H_3), 8.10 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, $\text{H}_{2'}$, $\text{H}_{6'}$), 8.16 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H_4), 8.33 (s, 1H, H_1), 8.88 (dd, 2H, $J = 8.0/1.0$ Hz, H_6 , H_7). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 55.34 (OCH_3), 114.15 ($\text{C}_{3'}$, $\text{C}_{5'}$), 124.76 (C_α), 128.82 ($\text{C}_{1'}$), 130.20 (C_3), 130.75 (C_1), 131.17 ($\text{C}_{2'}$, $\text{C}_{6'}$, C_4), 137.24 (C_2), 141.71 (C_β , C_{4a}), 144.02 (C_{8a}), 146.28 (C_6), 146.53 (C_7), 164.04 ($\text{C}_{4'}$), 187.27 ($\text{C}=\text{O}$). IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1654 ($\text{C}=\text{O}$), 1599 ($\text{C}=\text{C}$), 1259, 1017 ($\text{C}-\text{O}$), 3447 ($\text{C}-\text{N}$), 1504, 1416, 1367, 1223, 1181, 817, 610 (Ar) (KBr). Anal. Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$: C 74.47, H 4.86, N 9.65. Found: C 74.65, H 4.94, N 10.73. Yield: 68%.

(2*E*)-1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-(quinoxalin-6-yl)prop-2-en-1-one (2). Yellow solid, m.p. 225-226°C; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 6.16 (s, 2H, $-\text{OCH}_2\text{O}-$), 7.09 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, $\text{H}_{5'}$), 7.70 (s, 1H, $\text{H}_{2'}$), 7.91 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, $\text{H}_{6'}$), 7.92 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz, H_α), 8.12 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H_3), 8.14 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz, H_β), 8.43 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H_4), 8.53 (s, 1H, H_1), 8.95 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, H_6 , H_7). ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 102.85 ($-\text{OCH}_2\text{O}-$), 108.71 ($\text{C}_{2'}$), 108.93 ($\text{C}_{5'}$), 125.25 (C_α), 126.16 ($\text{C}_{6'}$), 129.89 (C_3), 130.26 (C_1), 131.26 (C_4), 132.74 ($\text{C}_{1'}$), 137.34 (C_2), 142.60 (C_β), 143.13 (C_{4a}), 143.84 (C_{8a}), 146.95 (C_6), 147.16 (C_7), 148.78 ($\text{C}_{3'}$), 152.50 ($\text{C}_{4'}$), 187.56 ($\text{C}=\text{O}$). IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1651 ($\text{C}=\text{O}$), 1595 ($\text{C}=\text{C}$), 1255, 1034 ($\text{C}-\text{O}$), 3440 ($\text{C}-\text{N}$), 3048, 2909, 1496, 1444, 1367, 1314, 1114, 969, 925, 793, 651 (Ar) (KBr). Anal. Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$: C 71.05, H 3.97, N 9.21. Found: C 71.76, H 4.04, N 10.94. Yield: 88%.

(2*E*)-1-(4-bromophenyl)-3-(quinoxalin-6-yl)prop-2-en-1-one (3). Cream solid, m.p. 131-132°C; ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.69 (dd, 2H, $J = 8.0/1.0$ Hz, $\text{H}_{3'}$, $\text{H}_{5'}$), 7.70 (d, 1H, J

= 16.0 Hz, H α), 7.95 (d, 2H, J = 8.0 Hz, H2', H6'), 8.02 (d, 1H, J = 16.0 Hz, H β), 8.08 (m, 1H, H3), 8.17 (d, 1H, J = 8.0 Hz, H4), 8.34 (s, 1H, H1), 8.89 (dd, 2H, J = 8.0/1.0 Hz, H6, H7). ^{13}C NMR (CDCl₃) δ 124.35 (C α), 128.82 (C3), 129.46 (C4'), 130.27 (C2', C6'), 130.73 (C3', C5'), 131.17 (C1), 132.03 (C1'), 132.18 (C4), 137.14 (C2), 143.15 (C β , C4a), 144.14 (C8a), 146.46 (C6), 146.62 (C7), 188.31 (C=O). IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1656 (C=O), 1589 (C=C), 1279, 1026 (C-O), 3447 (C-N), 1070 (C-Br), 3000, 1493, 1393, 1370, 1218, 1179, 1000, 866, 820, 516 (Ar) (KBr). Anal. Calcd for C₁₇H₁₁BrN₂O: C 60.20, H 3.27, N 8.26. Found: C 59.79, H 3.24, N 8.91. Yield: 72%.

(2E)-1-phenyl-3-(quinoxalin-6-yl)-2-propen-1-one (4). Cream solid, m.p. 158-159°C; ^1H NMR (CDCl₃) δ 7.60 (t, 2H, J = 8.0 Hz, H3', H5'), 7.69 (t, 1H, J = 8.0 Hz, H4'), 8.03 (d, 1H, J = 16.0 Hz, H α), 8.14 (d, 1H, J = 8.0 Hz, H10), 8.16 (d, 1H, J = 16.0 Hz, H β), 8.24 (d, 2H, J = 8.0 Hz, H2', H6'), 8.40 (dd, 1H, J = 8.0/1.0 Hz, H9'), 8.48 (s, 1H, H2), 8.95 (dd, 2H, J = 8.0/1.0 Hz, H5, H6). ^{13}C NMR (CDCl₃) δ 124.77 (C α), 128.81 (C3', C5'), 128.97 (C2', C6', C10), 130.25 (C2), 131.01 (C9), 133.28 (C4'), 137.05 (C1'), 138.22 (C1), 142.57 (C β , C8), 143.34 (C3), 146.37 (C6), 146.56 (C5), 189.12 (C=O). IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1656 (C=O), 1601 (C=C), 1279, 1018 (C-O), 3421 (C-N), 3053, 1497, 1440, 1367, 1308, 1216, 984, 864, 828, 770, 692, 659 (Ar) (KBr). Anal. Calcd for C₁₇H₁₂N₂O: C 78.44, H 4.65, N 10.76. Found: C 81.01, H 4.69, N 13.65. Yield: 41%.

(2E)-1-(4-nitrophenyl)-3-(quinoxalin-6-yl)prop-2-en-1-one (5). Ocher solid, m.p. 235-236°C; ^1H NMR (CDCl₃) δ 7.67 (d, 1H, J = 16.0 Hz, H α), 8.02 (s, 1H, H1), 8.06 (d, 1H, J = 8.0 Hz, H3), 8.17 (d, 1H, J = 8.0 Hz, H4), 8.19 (d, 2H, J = 8.0 Hz, H2', H6'), 8.36 (d, 2H, J = 8.0 Hz, H3', H5'), 8.37 (d, 1H, J = 16.0 Hz, H β), 8.88 (d, 2H, J = 8.0 Hz, H6, H7). ^{13}C NMR (CDCl₃) δ 123.80 (C α), 124.24 (C3', C5'), 128.54 (C3), 129.75 (C2', C6'), 130.71 (C1), 131.37 (C4), 136.20 (C2), 140.32 (C4a), 143.32 (C8a), 145.08 (C1', C β), 146.23 (C6), 147.08 (C7), 153.96 (C4'), 188.72 (C=O). IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1661 (C=O), 1588 (C=C), 1281, 1030 (C-O), 3418 (C-N), 1516, 1348, 847 (NO₂), 3107, 1315, 1215, 1105, 985, 826, 755, 706, 515 (Ar) (KBr). Anal. Calcd for C₁₇H₁₇N₃O₃: C 66.88, H 3.63, N 13.76. Found: C 65.63, H 3.36, N 13.08. Yield: 77%.

(2E)-1-(2,5-dimethoxyphenyl)-3-(quinoxalin-6-yl)prop-2-en-1-one (6). Yellow solid, m.p. 142-144°C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 3.83 (s, 3H, OCH₃), 3.91 (s, 3H, OCH₃), 6.98 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H3'), 7.08 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H4'), 7.27 (s, 1H, H6'), 7.68 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz, Hα), 7.86 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz, Hβ), 8.03 (dd, 1H, *J* = 8.0/1.0 Hz, H3), 8.13 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H4), 8.28 (s, 1H, H1), 8.87 (dd, 2H, *J* = 8.0/1.0 Hz, H6, H7). ¹³C NMR (CDCl₃) δ 56.11 (OCH₃), 56.72 (OCH₃), 113.60 (C3'), 114.69 (C6'), 120.19 (C4'), 128.92 (Cα), 129.57 (C3), 129.36 (C1'), 130.32 (C1), 130.42 (C4), 137.32 (C2), 141.09 (Cβ, C4a), 143.40 (C8a), 145.64 (C6), 145.93 (C7), 153.15 (C5'), 153.93 (C2'), 191.83 (C=O). IR ν_{max}/cm⁻¹ 1659 (C=O), 1588 (C=C), 1276, 1027 (C-O), 3444 (C-N), 3042, 2929, 2832, 1497, 1456, 1407, 1367, 1323, 1222, 1159, 977, 861, 818, 713 (Ar) (KBr). Anal. Calcd for C₁₉H₁₆N₂O₃: C 71.24, H 5.03, N 8.74. Found: C 70.56, H 4.41, N 8.60. Yield: 56%.

(2E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(quinoxalin-6-yl)prop-2-en-1-one (7). Yellow solid, m.p. 143-144°C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 4.00 (s, 6H, OCH₃), 6.97 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H5'), 7.67 (s, 1H, H2'), 7.74 (dd, 1H, *J* = 8.0/1.0 Hz, H6'), 7.77 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz, Hα), 8.01 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz, Hβ), 8.09 (dd, 1H, *J* = 8.0/1.0 Hz, H3), 8.16 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H4), 8.34 (s, 1H, H1), 8.88 (dd, 2H, *J* = 8.0/1.0 Hz, H6, H7). ¹³C NMR (CDCl₃) δ 56.11 (OCH₃), 56.17 (OCH₃), 110.03 (C5'), 110.75 (C2'), 123.24 (C6'), 124.19 (Cα), 128.64 (C3), 130.18 (C1', C1, C4), 136.88 (C2), 142.10 (Cβ), 143.18 (C4a), 143.90 (C8a), 145.52 (C6), 145.80 (C7), 149.40 (C3'), 153.60 (C4'), 187.24 (C=O). IR ν_{max}/cm⁻¹ 1654 (C=O), 1581 (C=C), 1281, 1022 (C-O), 3487 (C-N), 1518, 1453, 1419, 1358, 1316, 1161, 984, 918, 776, 718, 636 (Ar) (KBr). Anal. Calcd for C₁₉H₁₆N₂O₃: C 71.24, H 5.03, N 8.74. Found: C 70.98, H 4.33, N 8.11. Yield: 51%.

(2E)-1-(2,4-dimethoxyphenyl)-3-(quinoxalin-6-yl)prop-2-en-1-one (8). Cream solid, m.p. 119-120°C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 3.90 (s, 3H, OCH₃), 3.96 (s, 3H, OCH₃), 6.53 (s, 1H, H3'), 6.60 (dd, 1H, *J* = 8.0/1.0 Hz, H5'), 7.77 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz, Hα), 7.84 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H6'), 7.88 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz, Hβ), 8.04 (dd, 1H, *J* = 8.0/1.0 Hz, H3), 8.12 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H4), 8.28 (s, 1H, H1), 8.86 (dd, 2H, *J* = 8.0/1.0 Hz, H6, H7). ¹³C NMR (CDCl₃) δ 55.62 (OCH₃), 55.85 (OCH₃), 98.62 (C3'), 105.45 (C1'), 109.77 (C5'), 128.84 (Cα), 129.77 (C3), 129.85 (C1), 130.01 (C4), 133.23 (C6'), 137.46 (C2),

139.84 (C β), 143.21 (C4a), 143.75 (C8a), 145.28 (C6), 145.65 (C7), 160.69 (C2'), 164.63 (C4'), 189.71 (C=O). IR $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 1651 (C=O), 1609 (C=C), 1274, 1026 (C-O), 3447 (C-N), 2967, 1500, 1473, 1422, 1367, 1323, 1214, 1128, 974, 865, 821, 632 (Ar) (KBr). Anal. Calcd for C₁₉H₁₆N₂O₃: C 71.24, H 5.03, N 8.74. Found: C 70.80, H 4.77, N 8.29. Yield: 93%.

5.3. Pharmacology

5.3.1. General cell culture procedures

U-138 MG human and C6 rat GBM cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, USA). The cells were grown in culture flasks in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 15% and 5% fetal bovine serum (FBS), for U138-MG and C6 lines, respectively. Culture cells were maintained at 37 °C, a minimum relative humidity of 95%, at atmosphere of 5% CO₂, and were allowed to reach confluence.

5.3.2. Cell viability assay

Glioma cell lines were seeded at 1 x 10³ cells/well in DMEM/5% FBS for C6 line, or DMEM/15% FBS for U-138 MG in 96-well plates. They were then exposed to increasing concentrations (0.1, 0.5, 1, 5 and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of the eight quinoxaline-derived chlacones, for 24 h, 48 h or 72 h. Parallel control experiments were carried out with the addition of 5% and 15% FBS (cell viability control) or DMSO (vehicle control, 0.01%), in the absence of chalcones. The glioma cell lines were also treated with the PI3K γ inhibitor, AS605240, at the concentrations of 100 nM, 10 μM and 30 μM , for 48 h.

Cell viability was evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay [56]. This assay measures the activity of cellular dehydrogenases (mainly from mitochondria) and, indirectly, the cell viability, even of the spontaneously detached cells in the culture medium. The method is based on the reduction of a tetrazolium bromide salt (MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]). It provides a quantitative measure of the number of metabolically viable cells. The results were expressed as the percentage of cell viability in relation to the control.

5.3.3. Cell counting

U 138 MG and C6 cells were seeded at 1×10^4 and 5×10^3 cells/well, respectively, in appropriate medium. Both lineages were seeded in 24-well plates and allowed to grow for 24 h. The medium was changed prior to treatment with the different chalcones (0.1, 0.5, 1, 5 and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and also with AS605240 (100 nM, 10 μM and 30 μM). After 48 h of treatment the medium was removed, the cells were washed with calcium- and magnesium-free phosphate-buffered saline (CMF), and 200 μl of 0.5% trypsin/EDTA solution (Gibco, BRL) was added to detach the cells. After that, the cells were counted in a Neubauer chamber.

5.3.4. Cell cycle analysis

The effects of compound **6** on C6 cell cycle phase distribution was assessed using flow cytometry. The cells (3×10^5 cells per well) were cultured in triplicate in 6-well plates. After 6, 12 or 24 h of incubation, the cells were treated with vehicle (0.1% DMSO) or compound **6** (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Cells were harvested, fixed with 70% ethanol and stained with PSSI solution (Triton, RNase, Propidium Iodide and PBS). Data acquisition and analysis were performed on flow cytometer (Guava EasyCyte 8HT Flow Cytometry System, Millipore Corporation, MA, USA), and data from 10,000 cells were collected for each data file. Cell cycle analysis was performed with CellQuest software (Becton Dickinson, Canada, Inc.).

5.3.5. PI3K and ERK 1/2 MAP-kinase analysis

C6 rat glioma cells (2×10^5 cells per well) were plated in 6-well plates, with 5% FBS DMEM medium and allowed to grow for 24 h. The cells remained incubated for more 24 h with DMEM 0.5%, to stop the cell cycle. Cells were treated with the compound **6** (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), AS605240 (30 μM), or vehicle (0.1 % DMSO), in the presence of FBS 5 % (used to induce protein activation). After 15 min and 30 min of incubation, the cells were detached with 0.5% trypsin/EDTA solution (Gibco, BRL), and then incubated with Phosflow Fix Buffer (BD) for 10 min, and permeabilized with Phosflow Perm Buffer III (BD). The antibodies for AKT and ERK 1/2 were incubated during 30 min. Data acquisition and analysis was performed on flow cytometer (Facsanto) and FlowJo 7.6.3software.

5.3.6. Statistical analysis

The percentage of inhibition is presented as mean \pm standard error mean. The estimated IC₅₀ values are provided as the geometric means accompanied by the 95% confidence limit. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's or Bonferroni's tests, depending on the experimental protocol, using the software GraphPad Prism® 4.02. P values less than 0.05 ($P < 0.05$) were considered as indicative of significance.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil. T.R.M. is a post-graduate student in Medicine and Health Sciences supported by the Institution (PROBOLSAS Program/PUCRS). The authors thank Mr. Juliano Soares by his excellent technical assistance.

References

- [1] M. Preusser, C. Haberler, J.A. Hainfellner, Wien. Med. Wochenschr. 156 (2006) 332-337.
- [2] L.T. Yin, Y.J. Fu, Q.L. Xu, J. Yang, Z.L. Liu, A.H. Liang, X. Fan, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 362 (2007) 225-229.
- [3] G.P. Dunn, I.F. Dunn, W.T. Curry, Cancer Immun. 7 (2007) 12-28.
- [4] R.P. Nagarajan, J.F. Costello, Semin. Cancer Biol. 19 (2009) 188-197.
- [5] O.O. Kanu, B. Hughes, C. Di, N. Lin, J. Fu, D.D. Bigner, H. Yan, C. Adamson, Clin. Med. Oncol. 3 (2009) 39-52.
- [6] I.H. Robins, S. Chang, N. Butowski, M. Mehta, Curr. Oncol. Rep. 9 (2007) 66-70.
- [7] S.A. Goldust, G.M. Turner, J.F. Goren, M.L. Gruber, Hosp. Phys. 39 (2008) 9-22.
- [8] G.V. Koukourakis, V. Kouloulis, G. Zacharias, C. Papadimitriou, P. Pantelakos, G. Maravelis, A. Fotineas, et al., Molecules 14 (2009) 1561-1577.
- [9] R. Stupp, M.E. Hegi, M.J. van den Bent, W.P. Mason, M. Weller, R.O. Mirimanoff, G. Cairncross, Oncologist. 11(2006) 165-180.
- [10] E. Braganhol, L.L. Zamin, A.D. Canedo, F. Horn, A.S.K. Tamajusuku, M.R. Wink, C. Salbego, et al. Anticancer Drugs 17 (2006) 663-671.

- [11] B.P. de la Fuente, J. Dalmau, M. Rosenfeld, *Neurol.* 22 (2007) 159-169.
- [12] J.J. Vredenburg, A. Desjardins, D.A. Reardon, H.S. Friedman, *Neuro Oncol.* 11 (2009) 80-91.
- [13] M.J. Van den Bent, M. E. Hegi, R. Stupp, *Eur. J. Can.* 42 (2006) 582-588.
- [14] A.R. Amin, O. Kucuk, F.R. Khuri, D.M. Shin, *J. Clin. Oncol.* 27(2009) 2712-2725.
- [15] L. Bonfili, V. Cecarini, M. Amici, M. Cuccioloni, M. Angeletti, J.N. Keller, A.M. Eleuteri, *FEBS J.* 275 (2008) 5512-5526.
- [16] R. Romagnoli, P.G. Baraldi, M.D. Carrion, C.L. Cara, O.C. Lopez, D. Preti, M. Tolomeo, et al. *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 5367-5376.
- [17] M.L. Go, X. Wu, X.L. Liu, *Curr. Med. Chem.* 12 (2005) 483-499.
- [18] K.H. Shen, J.K. Chang, Y.L. Hsu, P.L. Kuo, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 101 (2007) 254-261.
- [19] A. Kamal, G. Ramakrishna, P. Raju, A. Viswanath, M.J. Ramaiah, G. Balakishan, M. Pal-Bhadra, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 4865-4869.
- [20] C. Lou, M. Wang, G. Yang, H. Cai, F. Zhao, H. Yang, L. Tong, et al., *Toxicol. in Vitro* 23 (2009) 906-910.
- [21] J. Mojzis, L. Varinska, G. Mojzisova, I. Kostova, L. Mirossay, *Pharmacol. Res.* 57 (2008) 259-265.
- [22] A. Sharma, B. Chakravarti, M.P. Gupta, J.A. Siddiqui, R. Konwar, R.P. Tripathi, *Bio. Med. Chem.* 18 (2010) 4711-4720.
- [23] T. Sasayama, K. Tanaka, K. Mizukawa, A. Kawamura, T. Kondoh, K. Hosoda, E. Kohmura, *J. Neurooncol.* 58 (2007) 123-132.
- [24] M. Reddy, C. Su, W. Chiou, Y. Liu, R. Chen, K. Bastow, C. Lee, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 7358-7370.
- [25] A. Boumendjel, X. Ronot, J. Boutonnat, *Curr. Drugs Targets.* 10 (2009) 363-371.
- [26] M. Pilatova, L. Varinska, P. Perjesi, M. Sarissky, L. Mirossay, P. Solar, A. Ostro, J. Mojzis, *Toxicol. in vitro* 24 (2010) 1347-1355.
- [27] J.H. Cheng, C.F. Hung, S.C. Yang, J.P. Wang, S.J. Won, C.N. Lin, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 7270-7276.
- [28] D.I. Batovska, I.T. Todorova, *Curr. Clin. Pharmacol.* 5 (2010) 1-29.
- [29] L.L. Zamin, E.C. Filippi-Chiela, P. Dillenburg-Pilla, F. Horn, C. Salbego, G. Lenz. *Cancer Sci.* 100 (2009)1655-1662.

- [30] K.A. Youdim, M.Z. Qaiser, D.J. Begley, C.A. Rice-Evans, N.J. Abbott. *Free Radic Biol Med*, 36 (2004) 592-604.
- [31] O. Sabzevari, G. Galati, M. Moridani, A. Siraki, P. Brien, *Chem. Biol. Interact.* 148 (2004) 57-67.
- [32] P. Corona, A. Carta, M. Loriga, G. Vitale, G. Paglietti, *Eur. J. Med. Chem.* 2009, 44, 1579-1591.
- [33] C.A. Castaneda, H.C. Funes, H. L. Gomes, E.M. Ciruelos, *Cancer Metastasis Rev.* 29 (2010) 751-759.
- [34] S. Guillard, P.A. Clarke, R. te Poele, Z. Mohri, L. Bjerke, M. Valenti, F. Raynaud, S.A. Accles, P. Workmann, *Cell Cycle* 8 (2009) 443-453.
- [35] B.H. Jiang, L.Z. Liu, *Biochim Biophys Acta* 1784 (2008) 150-158.
- [36] J.A. Engelman, *Nat Rev Cancer.* 9 (2009) 550-562.
- [37] X. Wei, J. Han, Z.Z. Chen, B.W. Qi, G.C. Wang, Y.H. Ma, H. Zheng, Y.F. Luo, Y.Q. Wei, L.J. Chen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 397 (2010) 311-317.
- [38] V. Spitezenberg, C. König, S. Ulm, R. Marone, L. Röpke, J.P. Müller, M. Grün, R. Bauer, I. Rubio, M.P. Wymann, A. Voigt, R. Wetzker, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 136 (2010) 1881-1890.
- [39] G.L. Johnson, R. Lapadat, *Science*, 298 (2002), G. Werlen, B. Hausmann, D. Naehre, E. Palmer, *Science* 299 (2003) 1859–1863.
- [40] T. Wada, J.M. Penninger, *Oncogene* 23 (2004) 2838-2849.
- [41] K.b. Reddy, S.M. Nabha, N. Atanaskova, *Cancer Metastasis Re.*, 22 (2003) 395-403.
- [42] A. Carnero. A.C. Blanco, O. Renenr, W. Link, J.F. Leal. *Curr. Cancer Drug Targets*, 8 (2008) 187-98.
- [43] C. Perez-Melero, A.B.S. Maya, B. Del Rey, R. Peláez, E. Caballero, M. Medarde, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 3771–3774.
- [44] J. Wolff, T. Trilling, G. Mölenkamp, R. Egeler, H. Jürgens, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 125 (1999) 481-486.
- [45] S. Ducki, D. Rennison, M. Woo, A. Kendall, J.F.D. Chabert, A.T. McGown, N.J. Lawrence, *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009), 7698-7710.
- [46] J. Loa, P. Chow, K. Zhang *Cancer Chemother. Pharmacol.* 63 (2009) 1007-1016.
- [47] S. Ducki, *IDrugs* 10 (2007) 42-46.

- [48] M. Camps, T. Rückle, H. Ji, V. Ardissonne, F. Rintelen, J. Shaw, C. Ferrandi, C. Chabert, C. Gillieron, B. Françon, T. Martin, D. Gretener, D. Perrin, D. Leroy, P.A. Vitte, E. Hirsch, M.P. Wymann, R. Cirillo, M.K. Schwartz, C. Rommel, *Nature Med.* 11 (2005) 936-943.
- [49] T.L. Yuan, L.C. Cantley, *Oncogene* 27 (2008) 5497-5510.
- [50] Samuels Y, Ericson K, *Curr. Opin. Oncol.* 18 (2006) 77-82.
- [51] L.C. Cantley, *Science* 296 (2002) 1655-1657
- [52] M. Osaki, M. Oshimura, H. Ito, *Apoptosis* 9 (2004)667-676.
- [53] Y.N. Chen, C.C. Cheng, J.C. Chen, W. Tsauer, S.L. Hsu, *Br J Pharmacol.* 140 (2003) 461-470.
- [54] P.Y. Yang, M.F. Chen, Y.H. Kao, D.N. Hu, F.R. Chang, Y.C. Wu, *Toxicol in vitro.* 25 (2011) 699-707.
- [55] G. Werlen, B. Hausmann, D. Naeher, E. Palmer, *Science* 299 (2003) 1859-1863.
- [56] T.J. Mosmann, *J. Immunol. Methods* 65 (1983), 55.

Legends to Figures

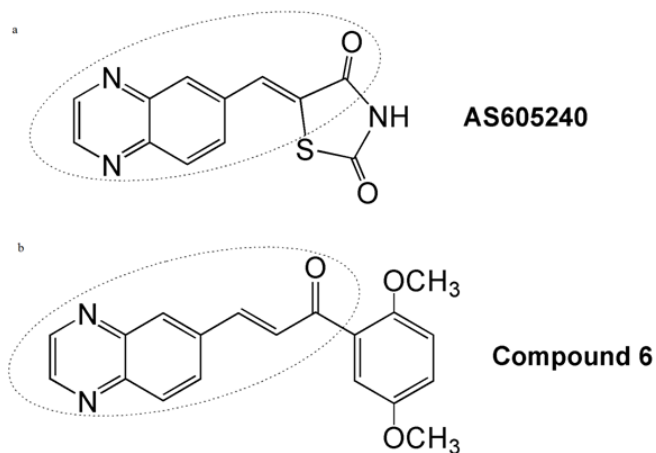


Figure 1. PI3K γ inhibitor AS605240 (a) and chalcones proposed in this research (b).

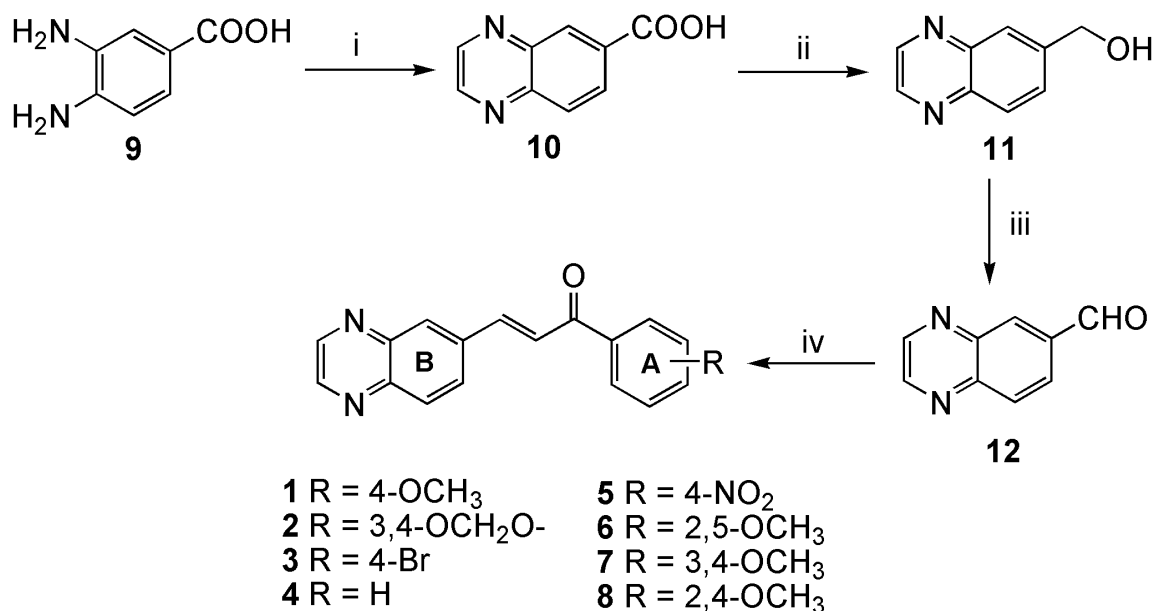


Figure 2. Synthesis of compounds. (i) glyoxal, AcOH, EtOH, reflux; (ii) LiAlH₄, THF; (iii) CCP, DCM; (iv) corresponding acetophenones, MeOH, KOH 50% w/v, magnetic agitation, 24h, r.t.

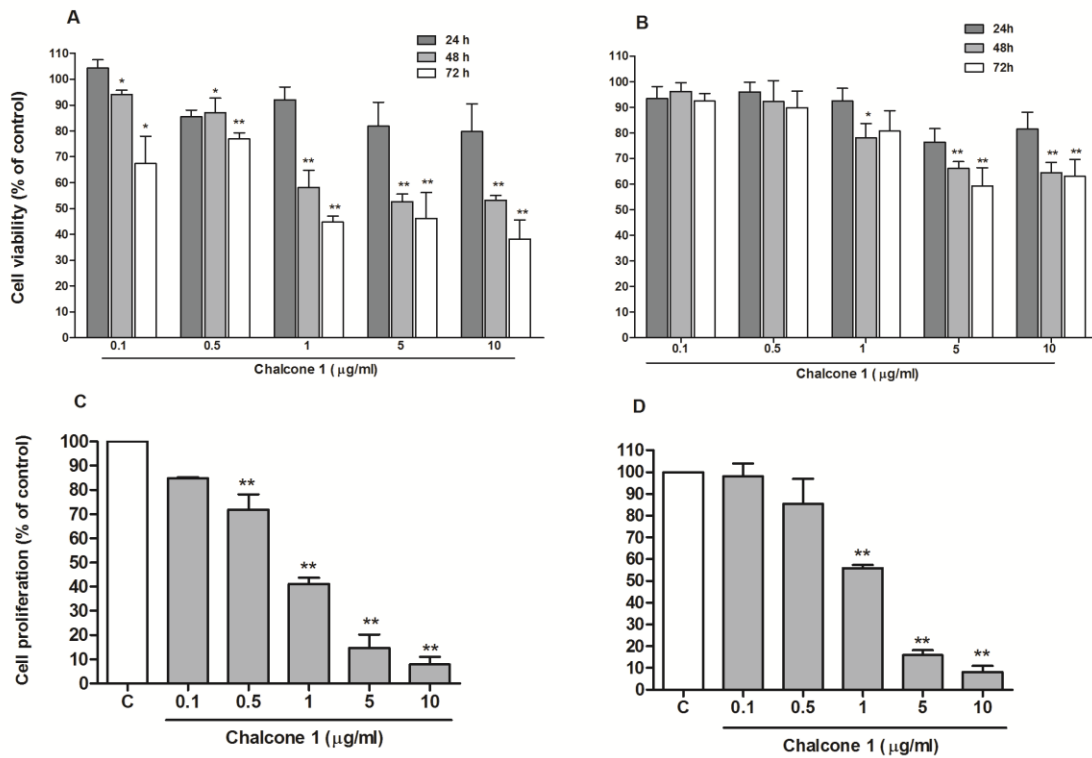


Figure 3. Effects of compound **1** on glioma cell viability and proliferation. The viability of rat glioma cells C6 (A) and human glioma cells U-138 MG (B) were assessed by MTT assay. Cell viability is provided as the percentage of control group viability. Proliferation of C6 (C) and U-138 MG (D) cells was assessed by cell counting in a hemocytometer. Each column represents the mean of 3 independent experiments performed in triplicate and the lines indicate the standard error means. Data were analyzed by oneway ANOVA, followed by multiple comparisons post-hoc test (Tukey test). *Significantly different from the control group ($P < 0.05$); ** ($P < 0.01$).

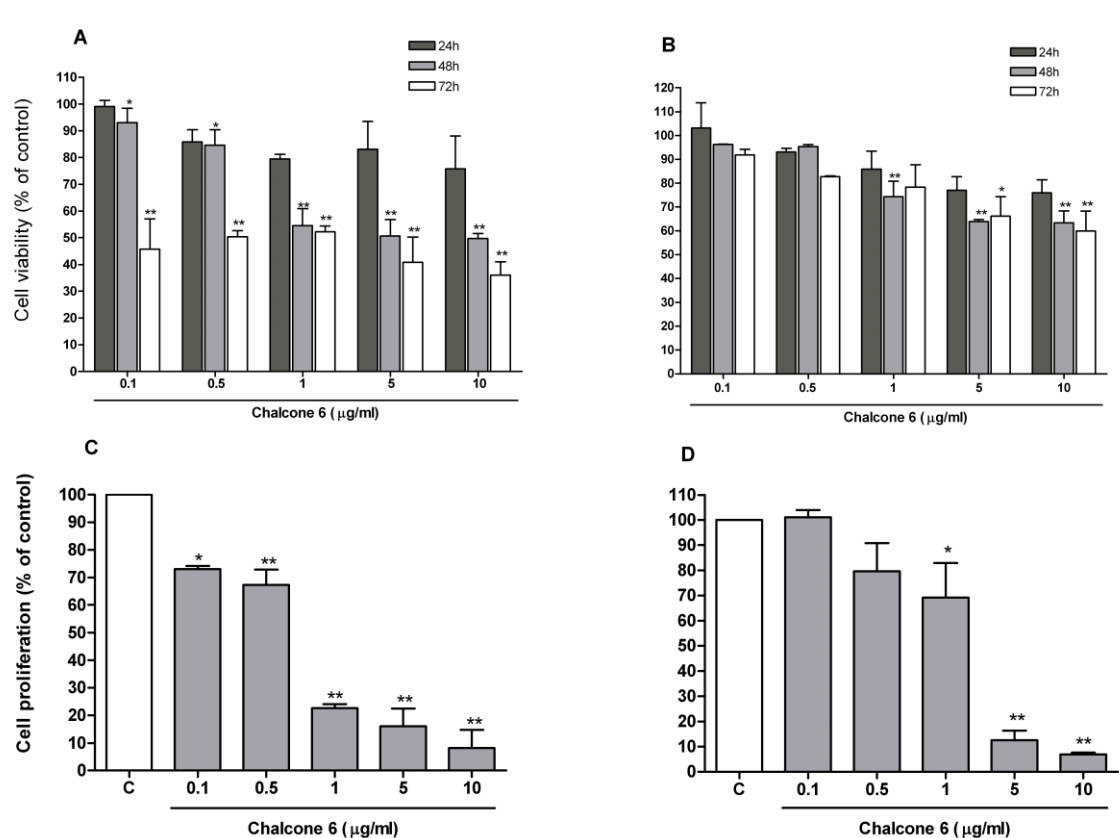


Figure 4. Effects of compound **6** on glioma cell viability and proliferation. The viability of rat glioma cells C6 (A) and human glioma cells U-138 MG (B) were assessed by MTT assay. Cell viability is provided as the percentage of control group viability. Proliferation of C6 (C) and U-138 MG (D) cells was assessed by cell counting in a hemocytometer. Each column represents the mean of 3 independent experiments performed in triplicate and the lines indicate the standard error means. Data were analyzed by oneway ANOVA, followed by multiple comparisons post-hoc test (Tukey test). *Significantly different from the control group ($P < 0.05$); ** ($P < 0.01$).

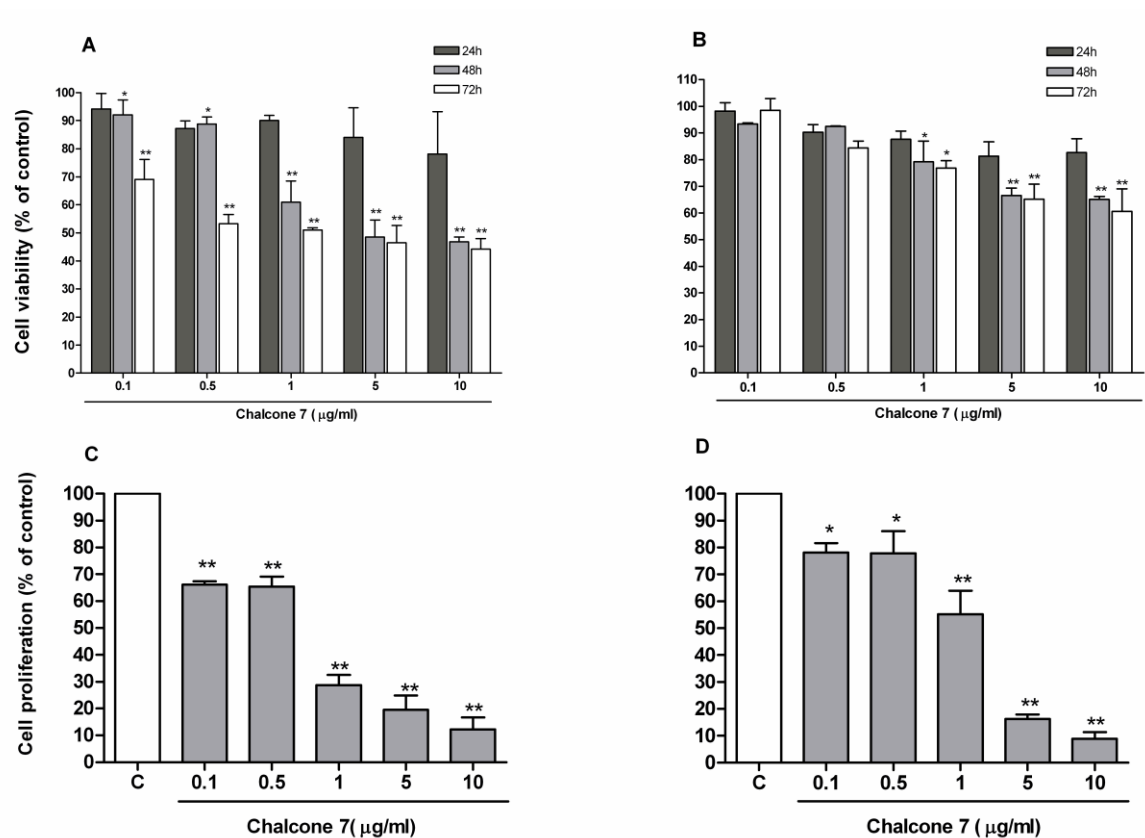


Figure 5. Effects of compound **7** on glioma cell viability and proliferation. The viability of rat glioma cells C6 (A) and human glioma cells U-138 MG (B) were assessed by MTT assay. Cell viability is provided as the percentage of control group viability. Proliferation of C6 (C) and U-138 MG (D) cells was assessed by cell counting in a hemocytometer. Each column represents the mean of 3 independent experiments performed in triplicate and the lines indicate the standard error means. Data were analyzed by oneway ANOVA, followed by multiple comparisons post-hoc test (Tukey test). *Significantly different from the control group *($P < 0.05$); ** ($P < 0.01$).

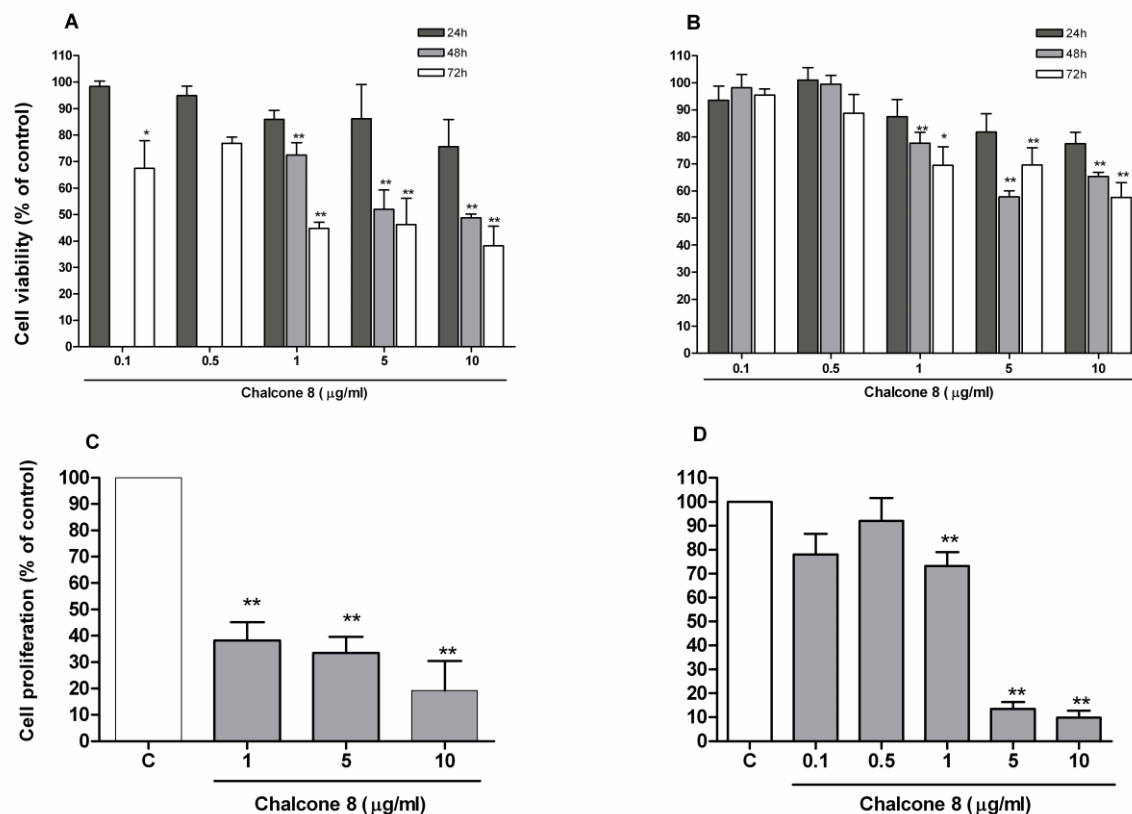


Figure 6. Effects of compound **8** on glioma cell viability and proliferation. The viability of rat glioma cells C6 (A) and human glioma cells U138 (B) were assessed by MTT assay. Cell viability is provided as the percentage of control group viability. Proliferation of C6 (C) and U138 (D) cells was assessed by cell counting in a hemocytometer. Each column represents the mean of 3 independent experiments performed in triplicate and the lines indicate the standard error means. Data were analyzed by oneway ANOVA, followed by multiple comparisons post-hoc test (Tukey test). *Significantly different from the control group *($P < 0.05$); ** ($P < 0.01$).

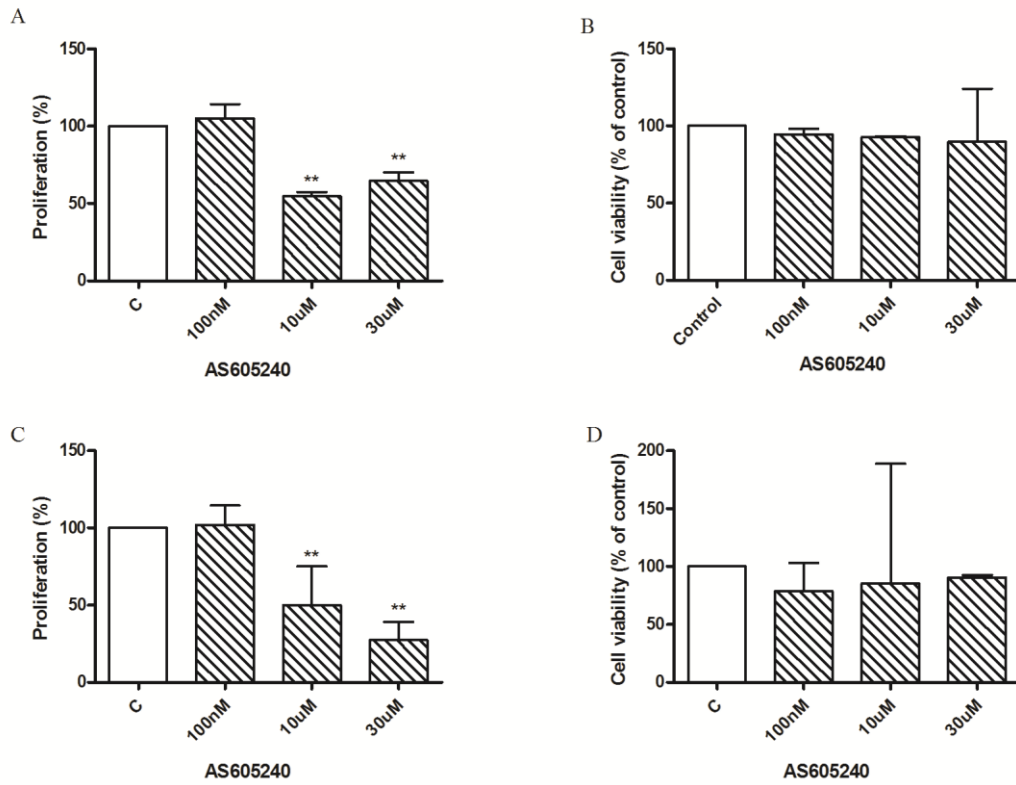


Figure 7. Effects of AS605240 on glioma cell viability and proliferation. The viability of rat glioma cells C6 (A) and human glioma cells U-138 MG (B) were assessed by MTT assay. Cell viability is provided as the percentage of control group viability. Proliferation of C6 (C) and U-138 MG (D) cells was assessed by cell counting in a hemocytometer. Each column represents the mean of 3 independent experiments performed in triplicate and the lines indicate the standard error means. Data were analyzed by oneway ANOVA, followed by multiple comparisons post-hoc test (Tukey test). *Significantly different from the control group *($P < 0.05$); ** ($P < 0.01$).

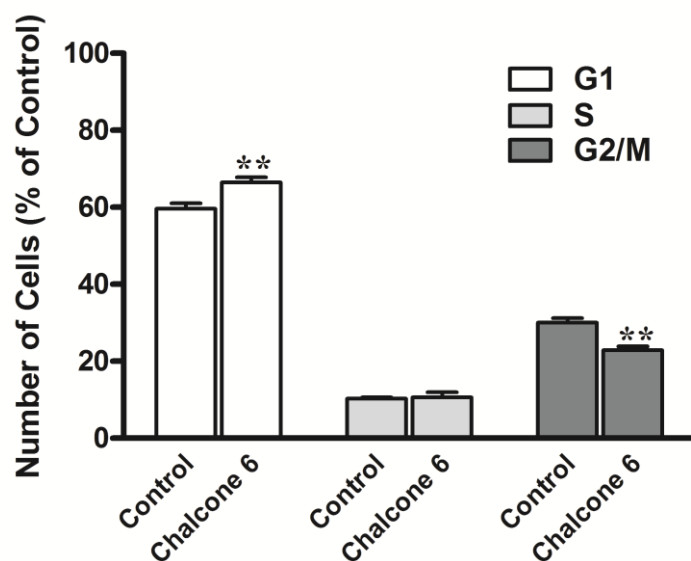


Figure 8. Effect of compound **6** treatment on cell cycle distribution. C6 cells were treated for 6, 12 and 24 h with dimethylsulfoxide (control) or chalcone **6** (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), collected, fixed, stained with PSSI solution and subjected to flow cytometry cell cycle analysis. Values are the relative number of cells in the sub-G1/G1, S and G2/M phases of cell cycle. Each column represents the mean of 6 independent experiments performed in triplicate and the lines indicate the standard error means. Data were analyzed by oneway ANOVA, followed by Bonferroni's post-hoc test. *Significantly different from the control group *($P < 0.05$); ** ($P < 0.01$).

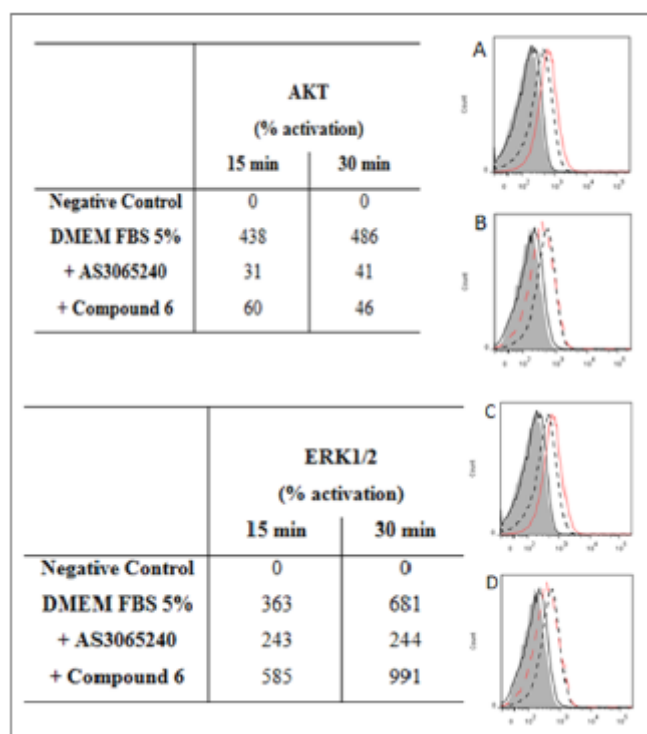


Figure 9. Effects of compound **6** (5 $\mu\text{g/ml}$, red line) and AS605240 (30 μM , black line) on AKT (A and B) and ERK 1/2 MAP-kinase (C and D) activation, following addition of cell culture medium supplemented with 5% FBS. Cells were treated with compound **6** (5 $\mu\text{g/ml}$) or AS605240 (30 μM) during 15 (A and C) and 30 min (B and D). The antibodies for AKT and ERK 1/2 were incubated during 30 min and the cells were subjected to flow cytometry cell cycle analysis. The gray line represents the negative control, and the dotted line indicates the positive control with 5% FBS plus DMSO 0.01%.

Table 1. Effects of quinoxaline-derived chalcones on the viability of rat and human glioma cell lines, according to assessment by MTT assay.

Chalcones	Glioma Cell Line			
	Rat C6		Human U-138 MG	
	Imax (%) ^a	IC ₅₀ (µg/ml) ^b	Imax (%) ^a	IC ₅₀ (µg/ml) ^b
1	53 ± 3	4.42 (4.03 – 4.84)	34 ± 3	--
2	55 ± 5	8.39 (7.66 – 9.20)	15 ± 5	--
3	56 ± 6	9.19 (8.93 – 9.48)	16 ± 5	--
4	60 ± 6	4.63 (3.40 – 6.30)	21 ± 7	--
5	26 ± 6	--	9 ± 2	--
6	50 ± 7	2.66 (2.09 – 3.38)	36 ± 1	--
7	51 ± 7	4.16 (3.51 – 4.93)	33 ± 3	--
8	52 ± 7	4.60 (4.07 – 5.20)	42 ± 2	--

^aThe maximal percentages of inhibition were calculated at the concentration of 5 µg/ml.

^bThe compounds were tested at concentrations ranging between 1 and 10 µg/ml.

Table 2. Effects of quinoxaline-derived chalcones **1**, **6**, **7** and **8** on the proliferation of rat and human glioma cell lines, as assessed by cell counting in a hemocytometer.

Chalcones	Glioma Cell Line			
	Rat C6		Human U-138 MG	
	Imax (%) ^a	IC ₅₀ (µg/ml) ^b	Imax (%) ^a	IC ₅₀ (µg/ml) ^b
1	90 ± 4	2.19 (1.85 - 2.59)	84 ± 2	2.67 (2.55 – 2.80)
6	85 ± 8	1.35 (1.10 - 1.65)	87 ± 4	2.64 (2.46 – 2.84)
7	82 ± 6	1.00 (0.21 – 4.65)	84 ± 3	2.29 (2.03 – 2.58)
8	67 ± 7	1.53 (1.21 – 1.95)	86 ± 3	2.48 (2.17 – 2.79)

^aThe maximal percentages of inhibition were calculated at the concentration of 5 µg/ml.

^bThe compounds were tested at concentrations ranging between 1 and 10 µg/ml.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Anualmente, a indústria farmacêutica investe milhões de dólares no desenvolvimento de novas moléculas e medicamentos. Nos últimos anos, uma das áreas em crescente expansão e na qual estão sendo feitos os maiores investimentos no desenvolvimento de moléculas promissoras e fármacos inovadores é a área da oncologia. Isto ocorre porque a incidência dos mais variados tipos de câncer vem aumentando drasticamente e a necessidade de medicamentos mais eficazes, seletivos e com menos efeitos colaterais se tornou uma urgência. Estima-se que hoje o desenvolvimento destes medicamentos esteja dentre as três principais áreas de investimentos das indústrias farmacêuticas. De acordo com *Medco Research Institute*, o maior número de novos fármacos em estudos clínicos são os da área da oncologia (Figura 5).

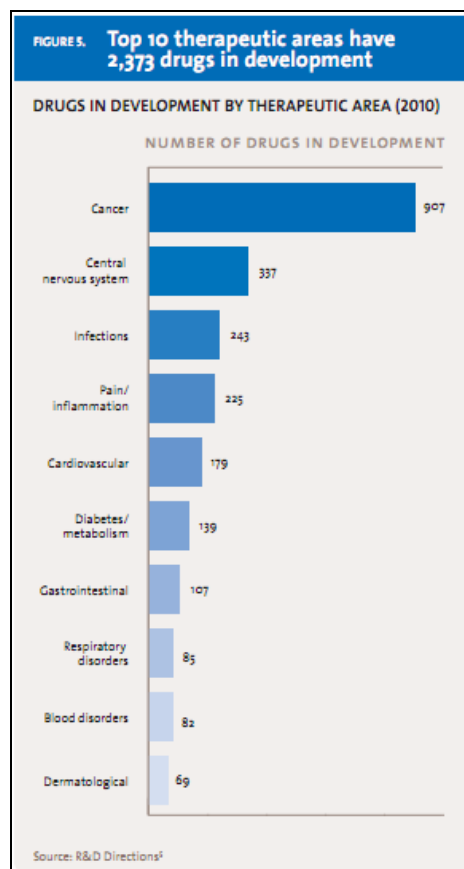


Figura 5. A figura demonstra o número de novos fármacos em estudos clínicos de fase I - IV no ano 2010. Obtido de: <http://www.drugtrendreport.com/Medco-2011-Drug-Trend-Report-Executive-Summary.pdf>

Os gliomas compõem um grupo heterogêneo de tumores cerebrais primários, que continuam sendo um grande desafio para a oncologia (Rich e Bigner, 2004). Dentre os gliomas de alto grau o com maior prevalência está o glioblastoma multiforme, que

também é o mais agressivo, letal e com pior prognóstico (Robins et al., 2007; Nagarajan et al, 2009; Kanu, et al., 2009). Ao longo dos últimos anos, inúmeros estudos de novas moléculas estão sendo realizados e diversos estudos clínicos sendo conduzidos com o intuito de identificar novos fármacos que possam ser utilizados no tratamento destes pacientes (Stupp et al., 2007). Desde a década de 80, quando foi desenvolvida a TMZ, nenhuma alternativa terapêutica que eleve a sobrevida livre de progressão e a sobrevida global dos pacientes foi identificada para que pudesse ser utilizada em combinação com a TMZ como tratamento de primeira linha, para pacientes com GBM recorrentes ou de maneira isolada no que diz respeito ao tratamento quimioterápico. Com o desenvolvimento da genômica e a melhor compreensão das vias moleculares, muitos mecanismos tumorais estão sendo elucidados e se tornando alvos para novas moléculas e novas terapias. A necessidade de mais medicamentos eficazes no tratamento destes tumores é fundamental, pois muitos pacientes são resistentes a ação da TMZ e, outros tantos pacientes não possuem acesso a esta medicação.

Diante da gravidade do prognóstico dos pacientes diagnosticados com GBMs ou com outros gliomas e considerando as poucas alternativas terapêuticas, no presente trabalho, foi investigada a ação *in vitro* de chalconas derivadas da quinoxalina sobre a proliferação e a viabilidade celular de linhagens de gliomas. As chalconas são compostos da via da biossíntese de flavonóides, que apresentam inúmeras atividades farmacológicas conhecidas, dentre elas, atividade anti-tumoral (Cheng et al., 2008; Boumendjel et al., 2009; Pilatova, et al., 2010). Por serem compostos com uma estrutura química simples e de fácil síntese, diversos estudos estão sendo realizados com o objetivo de desenvolver moléculas mais eficazes e promissoras, através de alterações estruturais destes compostos (Go et al., 2005; Romagnoli et al., 2008).

Após a realização de um *screening in vitro*, observou-se que quatro compostos apresentaram maior capacidade de inibir a viabilidade e a proliferação das linhagens de gliomas, possuindo em comum radicais metóxi no anel A do núcleo fundamental das chalconas, o 1-3-diarilpropano. Estudos prévios demonstram que a capacidade anti-tumoral das chalconas esteja relacionada com sua capacidade de inibir o ciclo celular em diferentes fases. Hsu et al. (2006), Nishimura et al. (2007), Shen et al. (2007), assim como outros grupos de pesquisa, demonstraram que suas chalconas foram capazes de inibir o ciclo celular na fase G2/M. Em contrapartida, outros autores como Rao et al. (2010), Park et al. (2008) demonstraram que seus compostos possuíam a capacidade de inibir o

ciclo celular na fase G1. Considerando a importância de inibição do ciclo celular no controle tumoral, os diferentes pontos de controle no ciclo celular e diversas publicações com resultados distintos, nosso grupo realizou experimentos para tentar elucidar possíveis mecanismos envolvidos na inibição da proliferação e viabilidade celular. Assim como Rao et al. (2010) e Park et al. (2008), os resultados encontrados demonstraram que as chalconas derivadas da quinoxalina são capazes de inibir o ciclo celular na fase G1. A modulação do ciclo celular na fase G1 pode estar relacionada com a inibição de quinases dependentes de ciclinas (CDKs), mais especificamente as CDK2, CDK4 e CDK6 (Lapenna e Giordano, 2009; Malumbres e Barbacid, 2009), assim como com a inibição das ciclinas D e E (Viallard, 2001).

A PI3K γ , um membro da família PI3K, é ativada via receptores acoplados à proteína G ou receptores do tipo tirosina-quinase, como receptores de insulina (Wey et al., 2010; Cantley, 2002). Evidências sugerem, especialmente nos últimos 10 anos, que esta isoforma desempenha um papel crucial durante o processo inflamatório (Rückle et al., 2006; Ghigo et al., 2010; Peng et al., 2010). Isso se deve principalmente à capacidade de ativar e recrutar macrófagos, neutrófilos e células T durante a resposta inflamatória (Ruckle et al., 2006; Passos et al., 2010). Diversos estudos demonstram que o aumento constitutivo da sinalização da via da PI3K pode ter efeito deletério nas células, levando à transformação celular (Castaneda et al., 2010), ao descontrole da proliferação, migração facilitada e adesão independente de crescimento. A inibição de PI3K possui a capacidade de inibir a formação de metástases (Cantley, 2002; Osaki et al., 2004; Samuel e Ericson, 2006; Yuan e Cantley, 2008).

No presente trabalho, examinou-se a possível modulação da PI3K γ causada pelo composto N9, identificado no artigo como composto 6, em células de gliomas. Para comparação e como controle positivo, foi utilizado o composto AS605240, no qual as chalconas derivadas da quinoxalina foram estruturalmente baseadas. O AS605240 (5-quinoxalin-6-ilmetileno-tiazolidina-2,4-diona) é um inibidor de PI3K γ capaz de reduzir a recombinação de PI3K γ , α , β e δ através de competição de ATP, sendo eficaz em processos inflamatórios e doenças auto-imunes (Camps et al., 2005; Spitzenberg et al., 2010; Wey et al., 2010). Ambos os compostos foram capazes de inibir a ativação de AKT, sendo possível inferir que a inibição da sinalização de PI3K pode estar relacionada com a inibição da proliferação celular causada pelas chalconas derivadas da

quinoxalina, podendo ser um dos mecanismos envolvidos na ação antitumoral destes compostos.

ERK1 e ERK2, membros da família das MAPK, são ativadas por diversos fatores de crescimento e induzem a transição das células do estado quiescente para o ciclo celular. A via da ERK está relacionada com proliferação celular, diferenciação, reorganização do citoesqueleto e migração celular. Por outro lado, ERK1/2 também estão envolvidas na resposta celular ao estresse e com morte celular (Wada e Penninger, 2004; Johnson, 2002).

Foi possível observar que a chalcona N9, identificada no artigo como composto 6, apresentou capacidade de modular a resposta das ERK1/2, acentuando sua ativação. Desta maneira, é possível sugerir que esta ativação possa estar relacionada com a inibição da proliferação celular demonstrada por este composto. Estudos prévios sugerem que a apoptose pode ser induzida por desregulação da transdução de sinal das MAPK. A duração e a intensidade da ativação também mostraram importância na determinação do desfecho, sobrevivência e proliferação ou morte celular. Segundo Werlen e colaboradores (2003), a afinidade do ligante também está relacionada com dualidade da ação da ERK. Se houver ativação da via da ERK antes dos demais membros da família, p38 e JNK, a apoptose prevalecerá (Werlen et al., 2003)

Com base nos dados aqui apresentados é possível inferir que: (i) as chalconas derivadas da quinoxalina são capazes de inibir a proliferação e a viabilidade celular de gliomas; (ii) houve bloqueio do ciclo celular na fase G1 por ação das chalconas; (iii) observou-se inibição da PI3K em células tratadas com a chalconas N9; (iv) foi observada a ativação da ERK1/2 por ação destes compostos. Desta maneira é possível sugerir que as chalconas derivadas da quinoxalina podem representar alvos de grande relevância para o desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento de gliomas e diversos mecanismos de ação podem estar envolvidos na inibição tumoral. Outros estudos estão em andamento a fim de avaliar o efeito in vivo destes compostos, bem como, a sua toxicidade, quando comparada a outros agentes quimioterápicos disponíveis clinicamente.

REFERENCE

- Armstrong TS, Prabhu S, Aldape K, Hossan B, Kang S, Childress A, Tolentino L, Gilbert MR. (2010). A case of soft tissue metastasis from glioblastoma and review of the literature. *J Neurooncol.*, **103**, 167-172.
- Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF, Delattre JY. (2003). Primary brain tumours in adults. *Lancet.*, **361**, 323-331.
- Boumendjel A, Boccard J, Carrupt PA, Nicolle E, Blanc M, Geze A, Choisnard L, Wouessidjewe D, Matera EL, Dumontet C. (2008) Antimitotic and Antiproliferative Activities of Chalcones: Forward Structure–Activity Relationship. Antimitotic and Antiproliferative Activities of Chalcones: Forward Structure–Activity Relationship. *J. Med. Chem.*, **51**, 2307–2310.
- Braganhol, E.; Zamin, L. L.; Canedo, A. D.; Horn, F.; Tamajusuku, A. S. K.; Wink, M. R.; Salbego, C.; et al. Antiproliferative effect of quercetin in human U138MG glioma cell line. *Anti-Cancer Drug* 2006, **17**, 663-671.
- Brandes A.A., Tosoni A., Franceschi E., Reni M., Gatta G., Vecht C. (2008). Glioblastoma in adults. *Crit Rev Oncol Hematol.*, **67**, 139-152.
- Brat D.J., Scheithauer, B.M., Fuller, G.N., Tihan, T. (2007) Newly Codified Glial Neoplasms of the 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System: Angiocentric Glioma, Pilocytic Astrocytoma and Pilocytic Astrocytoma. *Brain Pathol.*, **17**, 319-324.
- Brennan C., Momota H., Hambarzumyan D., Ozawa T., Tandon A., Pedraza A., Holland E. (2009). Glioblastoma Subclasses Can Be Defined by Activity among Signal Transduction Pathways and Associated Genomic Alterations. *PLoS One*, **4**, e7752.
- Bromberg JE, van den Bent MJ. (2009). Oligodendrogliomas: molecular biology and treatment. *Oncologist.*, **14**, 155-163.
- Burton EC, Prados MD. (2000). Malignant gliomas. *Curr Treat Options Oncol.*, **1**, 459-68.
- Camps, M., Rückle, T., Ji, H., Ardisson, V., Rintelen, F., Shaw, J., Ferrandi, C., Chabert, C., Gillieron, C., Françon, B., Martin, T., Gretener, D., Perrin, D., Leroy, D., Vitte, P.A., Hirsch, E., Wymann, M.P., Cirillo, R., Schwarz, M.K. & Rommel, C. (2005). Blockade of PI3Kgamma suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. *Nat Med*, **11**, 936-943.
- Cantley L.C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, **296**, 1655–1657.

- Castaneda CA, Cortes-Funes H, Gomez HL, Ciruelos EM (2010). The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev*, **29**, 751-759.
- Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, Link W, Leal JF (2008). The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Current Cancer Drug Targets*, **8**, 187-198.
- Chen YN, Cheng CC, Chen JC, Tsauer W, Hsu SL. (2003). Norcantharidin-induced apoptosis is via the extracellular signal-regulated kinase and c-Jun-NH2-terminal kinase signaling pathways in human hepatoma HepG2 cells. *Br J Pharmacol*. **140**, 461-470
- Chen C.K., Fan Q.W., Weiss W.A. (2009). PI3K signaling in gliomas – Animal models and therapeutic challenges. *Brain Pathology*, **19**, 112-120.
- Cheng JH, Hung CH, Yang SC, Wang JP, Won SJ, Lin CN (2008). Synthesis and cytotoxic, anti-inflammatory, and anti-oxidant activities of 20,50-dialkoxylchalcones as cancer chemopreventive agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **16**, 7270–7276.
- Clarke J., Butowski N., Chang S. (2010). Recent Advances in Therapy for Glioblastoma. *Arch Neurol*, **67**, 279-283.
- Corona P, Carta A, Loriga M, Vitale G, Paglietti G. (2009). Synthesis and in vitro antitumor activity of new quinoxaline derivatives. *Eur J Med Chem*, **44**, 1579-1591.
- Darkes M., Plosker G.L., Jarvis B. (2002). Temozolomide A Review of its Use in the Treatment of Malignant Gliomas, Malignant Melanoma and Other Advanced Cancers. *Am J Cancer*, **1**, 55-58
- Desjardins A, Reardon DA, Herndon JE 2nd, Marcello J, Quinn JA, Rich JN, Sathornsumetee S, Gururangan S, Sampson J, Bailey L, Bigner DD, Friedman AH, Friedman HS, Vredenburgh JJ. (2008). Bevacizumab plus irinotecan in recurrent WHO grade 3 malignant gliomas. *Clin Cancer Res*, **14**, 7068-7073.
- Ducki S. (2007). The development of chalcones as promising anticancer agents. *IDrugs*, **10**, 42-46.
- Dunn, G. P.; Dunn, I. F.; Curry, W. T.(2007). Focus on TILs; Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human glioma. *Cancer Immunity*, **7**, 12-28.
- Figarella-Branger D, Colin C, Coulibaly B, Quilichini B, Maues De Paula A, Fernandez C, Bouvier C. (2008). Histological and molecular classification of gliomas. **164**, 505-515.
- Fuller GN, Scheithauer BW. (2007) .The 2007 Revised World Health Organization (WHO) Classification of Tumours of the Central Nervous System: newly codified entities. *Brain Pathol.*, **17**, 304-307.

- Friedmann H.S., Kerby T., Calvert H. (2000). Temozolomide and Treatment of Malignant Glioma. *Clin Cancer Res.* **6**, 2585-2597.
- Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C, Chin L, DePinho RA, Cavenee WK. (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.*, **21**, 2683-2710.
- Gan HK, Kaye AH, Luwor RB. (2009). The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. *J Clin Neurosci.*, **16**, 748-754.
- Gharbi, S.I., Zvelebil, M.J., Shuttleworth, S.J., Hancox, T., Saghir, N., Timms, J.F. & Waterfield, M.D. (2007). Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. *Biochem J*, **404**, 15-21.
- Ghigo, A., Damilano, F., Braccini, L. & Hirsch, E. (2010). PI3K inhibition in inflammation: Toward tailored therapies for specific diseases. *Bioessays*, **32**, 185-96.
- Go ML, Wu X, Liu XL. (2005). Chalcones: an update on cytotoxic and chemoprotective properties. *Curr Med Chem*, **12**, 481-499.
- Goldust, S. A.; Turner, G. M.; Goren, J. F.; Gruber, M. L. (2008). Glioblastoma Multiforme: Multidisciplinary Care and Advances in Therapy. *Hospital Physician*, **39**, 9-22.
- Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, Mehta MP, Gilbert MR. (2008). Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol.* **26**, 4189-4199.
- Holland EC. (2001). Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nat Rev Genet.*, **2**, 120-129.
- Hsu YL, Kuo PL, Tzeng WS, Lin CC. (2006). Chalcone inhibits the proliferation of human breast cancer cell by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. *Food and Chemical Toxicology*, **44**, 704-713.
- Ito, K., Caramori, G. & Adcock, I.M. (2007). Therapeutic potential of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors in inflammatory respiratory disease. *J Pharmacol Exp Ther*, **321**, 1-8.
- James C.D., Carlbom E., Nordenskjold M., Collins V.P., Cavenee W.K. (1989). Mitotic recombination of chromosome 17 in astrocytomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **86**, 2858-2862.

- Jansen M., Yip S., Luis D.N. (2010). Molecular pathology in adults gliomas: diagnostic, prognostic, and predictive markers. *Lancet Neurol*, **9**, 717-726.
- Jiang H, Martin V, Gomez-Manzano C, Johnson DG, Alonso M, White E, Xu J, McDonnell TJ, Shinojima N, Fueyo J. (2010). The RB-E2F1 pathway regulates autophagy. *Cancer Res.*,**70**,7882-7893.
- Jin X, Yin J, Kim SH, Sohn YW, Beck S, Lim YC, Nam DH, Choi YJ, Kim H. (2011) EGFR-AKT-Smad Signaling Promotes Formation of Glioma Stem-like Cells and Tumor Angiogenesis by ID3-Driven Cytokine Induction. *Cancer Res*, **71**, 7125-34.
- Johnson G.L., Lapadat R. (2002). Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases. *Science*, **298**, 1911-1912.
- Kaina B., Christmann M., Naumann S., Roos W.P. (2007). MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair*, **6**, 1079-1099.
- Kaloshi G, Psimaras D, Mokhtari K, Dehais C, Houillier C, Marie Y, Laigle-Donadey F, Taillibert S, Guillemin R, Martin-Duverneuil N, Sanson M, Hoang-Xuan K, Delattre JY. (2009). Supratentorial low-grade gliomas in older patients. *Neurology.*, **73**, 2093-2098.
- Kanu O.O., Hughes B., Di C., Lin N., Fu J., Bigner D.D., Yan H., Adamson C. (2009). Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways. *Clin Med Oncol*, **3**, 39-52.
- Kazufumi S., Hisahiro M. (2011). Recent Advances in p53 Research and Cancer Treatment. *J Biomed Biotechnol.* **2011**, 1-7.
- Kim E.O., Kim H.J., Eom K.S., Cho B.S., Lee S.E., Yahng S.A., Lee J.W., Min W.S. (2011). Second Primary Glioblastoma Multiforme Following Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation in a Patient with Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Res Treat*, **43**, 195-198
- Kitange G.J., Carlson B.L., Schroeder M.A., Grogan P.T., Lamont J.D., Decker P.A., Wu W., James D., Sarkaria J.N. (2009) Induction of MGMT expression is associated with temozolamide resistance in glioblastoma xenografts. *Neuro-oncol*, **11**, 281–291.
- Knudsen ES, Knudsen KE. (2008). Tailoring to RB: tumour suppressor status and therapeutic response. *Nat Rev Cancer.*, **8**,:714-724.
- Knudsen ES, Wang JY. (1996). Differential regulation of retinoblastoma protein function by specific Cdk phosphorylation sites. *J Biol Chem.*, **271**, 8313-8320.

- Ko H.H., Tsao L.T., Yu K.L., Liu C.T., Wang J.P., Lin C.N. (2003). Structure–Activity Relationship Studies on Chalcone Derivatives: The Potent Inhibition of Chemical Mediators Release. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **11**, 105–111.
- Kong, D. & Yamori, T. (2007). ZSTK474 is an ATP-competitive inhibitor of class I phosphatidylinositol 3 kinase isoforms. *Cancer Sci*, **98**, 1638-1642.
- Kontogiorgis C, Mantzanidou M, Hadjipavlou-Litina D (2008). Chalcones and their Potential Role in Inflammation. *Mini Rev Med Chem*, **8**, 1224-1242.
- Koukourakis G.V., Kouloulis V., Zacharias G., Papadimitriou C., Pantelakos P., Maravelis G., Fotineas A., Beli I., Chaldeopoulos D., Kouvaris J. (2009). Temozolamide with radiation therapy in high grade brain gliomas: pharmaceuticals considerations and efficacy; a review article. *Molecules*. **14**, 1561-1577.
- Lapenna S, Giordano A (2009). Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Drug Discov*, **8**, 547-566.
- Laws ER Jr, Shaffrey ME. (1999). The inherent invasiveness of cerebral gliomas: implications for clinical management. *Int J Dev Neurosci.*, **7**, 413-420.
- Li Y, Guessous F, Zhang Y, Dipierro C, Kefas B, Johnson E, Marcinkiewicz L, Jiang J, Yang Y, Schmittgen TD. et al.(2009). MicroRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes. *Cancer Res.*, **69**, 7569–7576.
- Liptons S.A., Rosenberg P.A. (1994). Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med*, **330**, 613-622.
- Loa J, Chow P, Zhang K. (2009). Studies of structure–activity relationship on plant polyphenol-induced suppression of human liver cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, **63**, 1007-1016.
- Louis D. N., Ohgaki H., Wiestler O. D., et al. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*, **114**, 97–109
- Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D., Cavenee W.K. (2007). Pathology and genetics of tumors of the nervous system. In: World Health Organization Classification of Tumors of the Nervous System, Editorial and Consensus Conference Working Group. Lyon, France: IARC Press.
- Maehama T, Dixon JE. (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem.*, **273**, 13375-13378.
- Makita H, Tanaka T, Fujitsuka H, Tatematsu N, Satoh K, Hara A, Mori H. (1996). Chemoprevention of 4-Nitroquinoline 1-Oxide-induced Rat Oral Carcinogenesis by the Dietary Flavonoids Chalcone, 2-Hydroxychalcone, and Quercetin. *Cancer Research*, **56**, 4904-4900.

- Malumbres M, Barbacid M (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Rev Cancer*, **9**, 153-166
- Marone, R., Cmiljanovic, V., Giese, B. & Wymann, M.P. (2008). Targeting phosphoinositide 3-kinase: moving towards therapy. *Biochim Biophys Acta*, **1784**, 159-185.
- Matsubara H, Takeuchi T, Nishikawa E, Yanagisawa K, Hayashita Y, Ebi H, Yamada H, Suzuki M, Nagino M, Nimura Y, Osada H, Takahashi T. (2007). Apoptosis induction by antisense oligonucleotides against miR-17-5p and miR-20a in lung cancers overexpressing miR-17-92. *Oncogene*. **26**, 6099-6105.
- Medina PP, Nolde M, Slack FJ. (2010). OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature.*, **467**, 86-90.
- Michotte A, Neyns B, Chaskis C, Sadones J, In 't Veld P. (2004). Neuropathological and molecular aspects of low-grade and high-grade gliomas. *Acta Neurol Belg.*, **104**, 148-153.
- Minniti G, Muni R, Lanzetta G, Marchetti P, Enrici RM. (2009) Chemotherapy for glioblastoma: current treatment and future perspectives for cytotoxic and targeted agents. *Anticancer Res*, **29**, 5171-4184.
- Mojzis J, Varinska J, Mojzisova G, Kostova I, Mirossay L (2008). Antiangiogenic effects of flavonoids and chalcones. *Pharmacol Res*, **57**, 259–265.
- Monteiro G.T.R.K. (2003). Mortalidade por tumores de cérebro no Brasil: 1980-1998. *Caderno de Saúde Pública*. **19(4)**, 1139-1151.
- Moore LM, Zhang W. (2010) Targeting miR-21 in glioma: a small RNA with big potential. *Expert Opin Ther Targets*. **14**, 1247–1257.
- Myers MP, Stolarov JP, Eng C, Li J, Wang SI, Wigler MH, Parsons R, Tonks NK. (1997). P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **94**, 9052-9057.
- Nagarajan R.P., Costello J.F. (2009) Epigenetic mechanisms in glioblastoma multiforme. *Semin Cancer Biol*. **19**, 188-197.
- Nakazato Y. (2008). Revised WHO classification of brain tumours. *Brain Nerve.*, **60**, 59-77.
- Nevins JR. (2001). The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum Mol Genet*. **10**, 699-703.
- Nishimura R, Tabata K, Arakawa M, Ito Y, Kimura Y, Akihisa T, Nagai H, Sakuma A, Kohno H, Suzuki T. (2007). Isobavachalcone, a Chalcone Constituent of *Angelica keiskei*, Induces Apoptosis in Neuroblastoma. *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 1878-1883.

- Nikiforova MN, Hamilton RL. (2011). Molecular diagnostics of gliomas. *Arch Pathol Lab Med.*, **135**, 558-568.
- Ohgaki H., Kleihues P. (2005). Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)*, **109**, 93-108.
- Ohka F, Natsume A, Motomura K, Kishida Y, Kondo Y, Abe T, Nakasu Y, Namba H, Wakai K, Fukui T, Momota H, Iwami K, Kinjo S, Ito M, Fujii M, Wakabayashi T. (2011). The global DNA methylation surrogate LINE-1 methylation is correlated with MGMT promoter methylation and is a better prognostic factor for glioma. *PLoS One*, **6**, e23332.
- Osaki M., Oshimura M., Ito H. (2004). PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*, **9**, 667-676.
- Park JH, Lim HJ, Lee KS, Lee S, Kwak HJ, Cha JH, Park HY. (2008). Anti-proliferative effect of licochalcone A on vascular smooth muscle cells. *Biol Pharm Bull*, **31**, 1996-2000.
- Passos, G.F., Figueiredo, C.P., Prediger, R.D., Silva, K.A., Siqueira, J.M., Duarte, F.S., Leal, P.C., Medeiros, R. & Calixto, J.B. (2010). Involvement of phosphoinositide 3-kinase gamma in the neuro-inflammatory response and cognitive impairments induced by beta-amyloid 1-40 peptide in mice. *Brain Behav Immun*, **24**, 493-501.
- Paulus W, Tonn JC (1995). Interactions with glioma cells and extracellular matrix. *J Neurooncol*, **24**, 87-91.
- Peng, X.D., Wu, X.H., Chen, L.J., Wang, Z.L., Hu, X.H., Song, L.F., He, C.M., Luo, Y.F., Chen, Z.Z., Jin, K., Lin, H.G., Li, X.L., Wang, Y.S. & Wei, Y.Q. (2010). Inhibition of phosphoinositide 3-kinase ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, **332**, 46-56.
- Piccirillo SG, Vescovi AL. (2007). Brain tumour stem cells: possibilities of new therapeutic strategies. *Expert Opin Biol Ther.*, **7**, 1129-1135.
- Piccirillo SG, Binda E, Fiocco R, Vescovi AL, Shah K. (2009). Brain cancer stem cells. *J Mol Med (Berl)*, **87**, 1087-1095.
- Preusser M., Haberler C., Hainfellner J.A., Wien. Med. Wochenschr. 156 (2006) Malignant glioma: neuropathology and neurobiology. *Wien Med Wochenschr.* **156** 332-337.
- Purow B, Schiff D. (2009). Advances in the genetics of glioblastoma: are we reaching critical mass? *Nat Rev Neurol.*, **5**, 419-26.
- Rao RD, James CD. (2004). Altered molecular pathways in gliomas: an overview of clinically relevant issues. *Semin Oncol.*, **31**, 595-604.

- Rao YK, Kao TY, Ko JL, Tzeng YM. (2010). Chalcone HTMC causes in vitro selective cytotoxicity, cell-cycle G1 phase arrest through p53-dependent pathway in human lung adenocarcinoma A549 cells, and in vivo tumor growth suppression. *Bioorg Med Chem Lett.*, **20**, 6508-6512.
- Reddy KB, Nabha SM, Atanaskova N. (2003). Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev.*, **22**, 395-403.
- Rich JN, Bigner DD (2004). Development of novel target therapies in the treatment of malignant glioma. *Nat. Rev. Drug Disc.*, **5**, 430-446.
- Robins, I. H.; Chang, S.; Butowski, N.; Mehta, M. (2007). Therapeutic Advance for Glioblastoma Multiforme: Current Status and Future Prospects. *Curr. Oncol. Rep.* **9**, 66-70.
- Romagnoli, R.; Baraldi, P. G.; Carrion, M. D.; Cara, C. L.; Lopez, O. C.; Preti, D.; Tolomeo, M.; et al. (2008). Design, synthesis, and biological evaluation of thiphenes analogues of chalcones. *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 5367-5376.
- Roy, P., Kalra, N., Prasad, S., George, J. & Shukla, Y. (2009). Chemopreventive potential of resveratrol in mouse skin tumors through regulation of mitochondrial and PI3K/AKT signaling pathways. *Pharm Res*, **26**, 211-217.
- Ruckle T., Schwarz M.K., Rommel C. (2006). PI3Kgamma inhibition: towards an 'aspirin of the 21st century'?, *Nat Rev. Drug Discov.* **5**, 903-918.
- Samuels Y, Ericson K. (2006). Oncogenic PI3K and its role in cancer. *Curr Opin Oncol.*, **18**, 77-82.
- Sathornusumette S., Rich J.N. (2008). Designer Therapies for Glioblastoma Multiforme. *Ann N Y Acad Sci.*, **1142**, 108-132.
- See SJ, Gilbert MR. (2004). Anaplastic astrocytoma: diagnosis, prognosis, and management. *Semin Oncol.*, **31**, 618-634.
- Shi L, Cheng Z, Zhang J, Li R, Zhao P, Fu Z, You Y. (2008). hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells. *Brain Res.* **1236**, 185-193.
- Shen K.H., Chang J.K., Hsu Y.L., Kuo P.L. (2007). Chalcone Arrests Cell Cycle Progression and Induces Apoptosis through Induction of Mitochondrial Pathway and Inhibition of Nuclear Factor Kappa B Signalling in Human Bladder Cancer Cells. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, **101**, 254-261.
- Simões CMO *et al.* Farmacognosia – da planta ao medicamento. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 5ªed, 2003.

- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.*, **432**, 396-401.
- Smeitink J (2010). Metabolism, gliomas, and IDH1. *N Engl J Med*, **362**, 1144-1145.
- Soussi T, Bérout C. (2001). Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nature Reviews Cancer.*, **1**, 233–240.
- Spitzenberg V, König C, Ulm S, Marone R, Röpke L, Müller JP, Grün M, Bauer R, Rubio I, Wymann MP, Voigt A, Wetzker R. (2010). Targeting PI3K in neuroblastoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, **136**, 1881-1890.
- Stieber VW. (2001). Low-grade gliomas. *Curr Treat Options Oncol.*, **2**, 495-506.
- Stupp, R.; Hegi, M. E.; van den Bent, M. J.; Mason, W. P.; Weller, M.; Mirimanoff, R. O.; Cairncross, G. (2006). Changing Paradigms – An Update on the Multidisciplinary Management of Malignant Glioma. *The Oncologist*, **11**, 165-180.
- Stupp, R., Hegi, M.E., Gilbert, M.R., Chakravarti, A. (2007). Chemoradiotherapy in Malignant Gliomas: Standard of Care and Future Directions. *J. Clin Oncol*, **25**, 4127-4134.3
- Stupp, R., Mason, W.P., Van den Bent, M.J., et al (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolamide for glioblastoma, *N Eng J Med*, **352**, 987-996.
- Stupp R, Pica A, Mirimanoff RO, Michielin O (2007). A practical guide for the management of gliomas. *Bull Cancer.*, **94**, 817-822.
- Takashi S, Tanaka K, Mizukawa K, Kawamura A, Kondoh T, Hosoda K, Kohmura E. (2007). Trans-4-Iodo,4'-boranyl-chalcone induces antitumor activity against malignant glioma cell lines in vitro and in vivo. *J Neurooncol*, **85**, 123–132.
- Tentori L, Graziani G. (2009). Recent approaches to improve the antitumor efficacy of temozolomide. *Curr Med Chem.* **16**, 245-257.
- Van den Bent MJ. (2007). Anaplastic oligodendroglioma and oligoastrocytoma. *Neurol Clin.*, **25**, 1089-1109.
- Van den Bent MJ, Reni M, Gatta G, Vecht C. (2008). Oligodendroglioma. *Crit Rev Oncol Hematol.*, **66**, 262-272.
- Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, Shu HK, Wen PY, Olson JJ. (2010). Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin.*, **60**, 166-193.

- Viallard JF, Lacombe F, Belloc F, Pellegrin JL, Reiffers J (2001). Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology. *Cancer Radiother.*, **5**, 109-129.
- Villano J.L., Seery T.E., Bressler L.R. (2009). Temozolamide in malignant gliomas: current use and future targets. *Cancer Chemother Pharmacol*, **64**, 647-655.
- Vougioukas VI, Omran H, Gläsker S, Van Velthoven V. (2005). Far lateral supracerebellar infratentorial approach for the treatment of upper brainstem gliomas: clinical experience with pediatric patients. *Childs Nerv Syst.*, **21**, 1037-1041.
- Vousden KH, Prives C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell.*, **137**, 413-431.
- Vredenburgh J.J., Desjardins, A., Reardon, D.A., Friedman, H.S. (2009). Experience with irinotecan for the treatment of malignant glioma. *Neuro-oncol*, **11**, 80-89.
- Wada T., Penninger J.M. (2004). Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation, *Oncogene*, **23**, 2838–2849.
- Wang XW, Harris CC. (1996). TP53 tumour suppressor gene: clues to molecular carcinogenesis and cancer therapy. *Cancer Surv.*, **28**, 169-196.
- Weng Q., Zhang J., Cao J., Xia Q., Wang D., Hu Y., Sheng R., Wu H., Zhu D., Zhu H., He Q., Yang B. (2011). Q39, a quinoxaline 1,4-Di-N-oxide derivative, inhibits hypoxia-inducible factor-1 α expression and the Akt/mTOR/4E-BP1 signaling pathway in human hepatoma cells. *Invest New Drug*, **29**, 1177-1187.
- Wei X, Han J, Chen ZZ, Qi BW, Wang GC, Ma YH, Zheng H, Luo YF, Wei YQ, Chen LJ. (2010) A phosphoinositide 3-kinase-gamma inhibitor, AS605240 prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, **397**, 311-317
- Werlen G., et al. (2003). Signaling Life and Death in the Thymus: Timing Is Everything. *Science*, **299**, 1859-1863.
- Wick W, Weller M. (2010). Anaplastic glioma. Neuropathology, molecular diagnostics and current study concepts. *Nervenarzt.*, **81**, 928-930
- Wick W, Weller M, Weiler M, Batchelor T, Yung AW, Platten M. (2011) Pathway inhibition: emerging molecular targets for treating glioblastoma. *Neuro Oncol.* **13**, 556-579
- Won S.J., Liu C.T., Tsao L.T., Weng J.R., Ko H.H., Wang J.P., Lin C.N. (2005) Synthetic chalcones as potential anti-inflammatory and cancer chemopreventive agents. *Eur J Med Chem*, **40**, 103–112.

- Wong AJ, Bigner SH, Bigner DD, Kinzler KW, Hamilton SR, Vogelstein B. (1987). Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **84**, 6899-6903.
- Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, Grzeschik CH, Humphrey PA, Bigner DS, Vogelstein B. (1992). Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **89**, 2965-2969.
- Yan W, Zhang W, Jiang T. (2011). Oncogene addiction in gliomas: implications for molecular targeted therapy. *J Exp Clin Cancer Res.*, **17**, 30-58.
- Yang P.Y., Chen M.F., Kao Y.H., Hu D.N., Chang F.R., Wu Y.C. (2011). Norcantharidin induces apoptosis of breast cancer cells: involvement of activities of mitogen activated protein kinases and signal transducers and activators of transcription. *Toxicol in vitro*, **25**, 699-707.
- Yin, L. T.; Fu, Y. J.; Xu, Q. L.; Yang. J.; Liu, Z. L.; Liang, A. H.; Fan, X. J.; et al. (2007). Potential biochemical therapy of glioma cancer. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, **362**, 225-229.
- Yu W., Liao Q.Y., Hantash F.M., Sabders B.G., Kline K. (2001). Activation of Extracellular Signal-regulated Kinase and c-Jun-NH2-terminal Kinase but not p38 Mitogen-activated Protein Kinases Is Required for RRR- α -Tocopheryl Succinate-induced Apoptosis of Human Breast Cancer Cells. *Cancer Res.*, **61**, 6569-6576.
- Yuan T.L., Cantle L.C. (2008). PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*, **27**, 5497-551.

ANEXO I

Documento de confirmação de submissão do manuscrito

A manuscript number has been assigned: EJMECH-D-11-01162R1

DE: Herve Galons

PARA: camposmmartha@yahoo.com, taniregina@yahoo.com.br

Quinta-feira, 27 de Outubro de 2011 08:27

Ms. Ref. No.: EJMECH-D-11-01162R1

Title: Activity of quinoxaline-derived chalcones on in vitro glioma cell proliferation

European Journal of Medicinal Chemistry

Dear Dr Campos,

Your submission, referenced above, has been assigned the manuscript number EJMECH-D-11-01162R1 and has been assigned to an Editor who will handle peer review.

Please note that in most cases at least two reviews may be required before a decision on a manuscript is made. You will be notified by e-mail each time a reviewer agrees to review your manuscript.

To track the progress of your manuscript, please log in to <http://ees.elsevier.com/ejmech/> and click on the "Submissions Being Processed" folder.

Your username is: mmarthacampos

Thank you for submitting your manuscript to European Journal of Medicinal Chemistry.

Kind regards,

European Journal of Medicinal Chemistry

ANEXO II

Documento de confirmação de resubmissão do manuscrito

A manuscript number has been assigned: EJMECH-D-11-01162R2

DE: Herve Galons

PARA: camposmmartha@yahoo.com, taniregina@yahoo.com.br

Segunda-feira, 13 de Dezembro de 2011 04:48

Ms. Ref. No.: EJMECH-D-11-01162R2

Title: Activity of novel quinoxaline-derived chalcones on in vitro glioma cell proliferation

European Journal of Medicinal Chemistry

Dear Dr Campos,

Your submission, referenced above, has been assigned the manuscript number EJMECH-D-11-01162R2 and has been assigned to an Editor who will handle peer review.

Please note that in most cases at least two reviews may be required before a decision on a manuscript is made. You will be notified by e-mail each time a reviewer agrees to review your manuscript.

To track the progress of your manuscript, please log in to <http://ees.elsevier.com/ejmech/> and click on the "Submissions Being Processed" folder.

Your username is: mmarthacampos

Thank you for submitting your revision. Please do not hesitate to contact me if you have any queries.

Kind regards,

European Journal of Medicinal Chemistry

ANEXO III

Your Submission

DE: Herve Galons

PARA: camposmmartha@yahoo.com, taniregina@yahoo.com.br

Segunda-feira, 14 de Dezembro de 2011 14:58

Ms. Ref. No.: EJMECH-D-11-01162R2

Title: Activity of novel quinoxaline-derived chalcones on in vitro glioma cell proliferation

European Journal of Medicinal Chemistry

Dear Prof. Campos,

I am pleased to confirm that your paper "Activity of novel quinoxaline-derived chalcones on in vitro glioma cell proliferation" has been accepted for publication in European Journal of Medicinal Chemistry.

Comments from the Editor and Reviewers can be found below.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,

Salvatore Guccione

Editor

European Journal of Medicinal Chemistry