



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB
FACULDADE DE CEILÂNDIA - FCe
FARMÁCIA

JOSÉ DE ALSIMIR GOMES JÚNIOR

**REATIVIDADE DA 15-DESOXI^{12,14}-PROSTAGLANDINA J-2 FRENTE A
PROTEÍNAS QUINASE A E C ϵ**

CEILÂNDIA, DF
2016

JOSÉ DE ALSIMIR GOMES JÚNIOR

**REATIVIDADE DA 15-DESOXI^{12,14}-PROSTAGLANDINA J-2 FRENTE A
PROTEÍNAS QUINASE A E C ϵ**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido
à Faculdade de Ceilândia da Universidade de
Brasília, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do Grau de Bacharel
em Farmácia

Área de Concentração: Fármacos

Orientador: Prof. Dr. Paulo Gustavo Barboni
Dantas Nascimento

CEILÂNDIA, DF

2016

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB

JOSÉ DE ALSIMIR GOMES JÚNIOR

**REATIVIDADE DA 15-DESOXI^{12,14}-PROSTAGLANDINA J-2 FRENTE A
PROTEÍNAS QUINASE A E C ϵ**

Banca Examinadora

Orientador: Prof. Dr. Paulo Gustavo Barboni Dantas Nascimento
(FCe/ Universidade de Brasília)

Prof.^a Dra. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza
(FCe/ Universidade de Brasília)

Prof.^a Dra. Carine Royer
(FCe/ Universidade de Brasília)

CEILÂNDIA, DF

2016

Gomes Júnior, José de Alsimir

Reatividade da 15-desoxi^{12,14}-prostaglandina j-2 frente a proteínas quinase A e Cε, José de Alsimir Gomes Júnior, UnB, 2016

Orientador: Paulo Gustavo Barboni Dantas de Melo

Monografia – Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia ano
2016

1. 15d-Prostaglandina J-2 2. Proteína quinase A 3. Proteína quinase Cε 4.
MALDI-TOF 5. Espectrometria de massas.

God is in the details.
Ludwig Mies van der Rohe

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha família que sempre me deixou estudar e deu total suporte para que eu pudesse concluir a minha graduação. Muito obrigado à meus pais Celina e Alsimir e a minhas irmãs Hingrid, Priscila e Gislene.

Agradeço também a algumas pessoas que mais me atrapalharam do que me ajudaram na graduação, meus sobrinhos Gilson e Nicole que não me deixam estudar e meu amigo de infância Félix Fernandes.

Tão importante quanto aprender uma profissão é encontrar alguns irmãos de graduação durante o caminho, meu agradecimento em especial vai para Leandro Pereira, Filipe Alcar, Thays Thamys, Flaviane Lara e João Bosco estes de uma forma ou de outra deixaram a graduação muito mais divertida.

Quando pensei que a faculdade não me surpreenderia com mais amigos veio “as meninas do estágio 1” para me provarem o contrário, agradeço muito por elas serem tão amigas e divertidas nesse final de curso obrigado Hellen Maniero, Isabela Karen e Ticia Rodrigues.

Gostaria de agradecer também a minha colega/amiga de iniciação que tanto me ajudou neste projeto lane Azevedo.

Durante a graduação temos oportunidades de encontrar professores que inspiradores e de grande ajuda em nossa construção profissional. Gostaria de agradecer em especial aos professores Alex Pereira e Carine Royer por terem me dado uma chance como um de seus alunos de iniciação e por terem acreditado e me ensinado boa parte do que hoje eu sei sobre laboratório de pesquisa.

Gostaria de por fim, agradecer a meu professor orientador Paulo Barboni por me “apadrinhar” desde o começo da faculdade me dando tantas oportunidades boas de atuar como monitor/tutor em matérias tão divertidas e me dando a chance agora de ser seu orientado neste trabalho final, por tudo muito obrigado.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Formação das prostaglandinas.....	14
Figura 2 – Mecanismo de ação da 15d-PGJ2.....	16
Figura 3 – Molécula 15d-PGJ2.....	19
Figura 4 – Mecanismo para a reação de Michael.....	19
Figura 5 – Reação de tio-Michael, proposta mecanística de Mukaiyama.....	21
Figura 6 – Esquematização do funcionamento de um MALDI-TOF.....	24
Figura 7 – Representação de um gráfico general de intensidade por m/z.....	26
Figura 8 – Note os carbonos α e β dessas estruturas, esses são os responsáveis pela eletrofilicidade na reação de Michael em 1) 2-ciclopenten-1-ona e em 2) 15d-Prostaglandina J-2.....	32
Figura 9 – Espectros provenientes de MALDI-TOF com várias concentrações de tampão BICINE a) 4 mM b) 20 mM e c) 50mM.....	35

LISTA DE GRÁFICOS

Gráficos 1 a 6. Espectros de massa para as 6 amostras testadas, todos os gráficos são intensidade relativa por m/z33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

↑	Aumento
↓	Diminuição
15d-PGJ2	15-desoxi ^{12,14} -prostaglandina J-2
AKT	<i>Protein Kinase B</i>
α	<i>Alfa</i>
β	<i>Beta</i>
CINC-1	<i>Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1</i>
COX2	Enzima ciclooxygenase 2
Cp	2-Ciclopenten-1-ona
Da	Dalton
epsilon	<i>Epsilon</i>
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
FDA	<i>Food and drug administration</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IFNγ	Interferon gamma
IL	Interleucinas
JNK	<i>C-Jun N-Terminal Kinase</i>
Kda	KiloDalton
L	Litro
LPS	Lipopolissacarídeo
MALDI	<i>Matrix assisted laser desorption ionization</i>
MCP1	<i>Monocyte chemoattractive protein 1</i>
mmol	Millimol
NFKb	Fator nuclear kappa Beta
PGD2	Prostaglandina D2
PGH2	Prostaglandina H2
PGJ2	Prostaglandina J2
PKA	Proteína quinase A
PKCϵ	Proteína quinase C epsilon
pmol	Pico mol
PPARγ	Receptor gama ativado por proliferador de peroxissomos

RAC1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TNFα	Fator de necrose tumoral alpha
TOF	<i>Time of flight</i>
TRPA1	<i>Transient receptor portal A1</i>
UCHL1	<i>Ubiquitin C-terminal hidrolase L1</i>
μL	Microlitro

RESUMO

A prostaglandina 15d-PGJ2 é produto final da via da enzima COX2. A 15d-PGJ2 é uma prostaglandina que apresenta efeitos anti-inflamatórios, anti-proliferativos e protetores celulares. A PKA e PKC ϵ estão envolvidas em diversas patologias, portanto, novos inibidores de proteínas quinases são importantes ferramentas farmacológicas. E a reação de Michael é altamente estudada para o desenvolvimento de novos inibidores de proteína quinase, esses inibidores já são explorados pela indústria, principalmente nas áreas de inflamação e oncologia. A molécula da 15d-PGJ2 é um eletrófilo para a reação de Michael. Um exemplo de nucleófilo para essa reação são as cisteínas presentes em proteínas celulares. Por isso, este trabalho irá analisar o potencial de ligação da 15d-PGJ2 na PKA e PKC ϵ . Foi utilizado a técnica de espectrometria de massa utilizando o MALDI-TOF. Para avaliar a ligação foi analisado o peso molecular das quinases na presença ou ausência da 15d-PGJ2. Não foi possível avaliar essa ligação através de nossos espectros provavelmente devido a problemas com nossas amostras. Nos primeiros testes acreditamos que houve supressão do sinal das proteínas por causa de excesso de sal. Em testes posteriores, já feita a dessalinização das amostras, os sinais não foram detectados. Isso deve ter acontecido provavelmente pela perda das proteínas no momento da dessalinização pelo método utilizado. A 15d-PGJ2 apresenta grande potencial como inibidora de proteínas quinase, porém, não se conseguiu avaliar esta ligação neste trabalho. Este estudo servirá como uma pré-validação para futuros preparos dessa amostra.

Palavras-chave: 15d-Prostaglandina J2, Proteína quinase A, proteína quinase C ϵ , MALDI-TOF, espectrometria de massas

ABSTRACT

The prostaglandin 15d-PGJ2 is the final product of the COX2 enzyme. 15d-PGJ2 is a prostaglandin which exhibits anti-inflammatory, anti-proliferative and cell protective effects. PKA and PKC ϵ are involved in different diseases. Therefore, new protein kinase inhibitors are valuable pharmacological tools. The reaction most studied for the development of new protein kinase inhibitors is the Michael reaction. Those inhibitors are already investigated by the industry, particularly in inflammation and oncology. 15d-PGJ2 is an electrophile for the Michael reaction. An example of a nucleophile for this reaction is the cysteines present in cellular proteins. Therefore, this paper will analyze the binding potential of 15d-PGJ2 to PKA and PKC ϵ . The method used was mass spectrometry utilizing the MALDI-TOF. To analyze the binding, the molecular weight of the protein kinases was evaluated in the presence or absence of 15d-PGJ2. Unfortunately, it was not possible to evaluate the prostaglandin binding to the protein through our spectra. Probably due to problems with our samples. In earlier tests it is believed that there was a suppression of the signal protein because of excess of salt. In later tests after desalinization the signal and noise were completely lost, this probably happened for loss of proteins in the time of desalination by the method used. The 15d-PGJ2 has great potential as an inhibitor of protein kinase, but it could not be evaluated. This study will be used as a pre-validation for future preparation of samples for this purpose.

Key-Words: 15d-Prostaglandin J2, Protein kinase A, protein kinase C ϵ , MALDI-TOF, Mass spectrometry.

SUMÁRIO

1. Introdução	14
1.1 15-desoxi^{12,14}-prostaglandina J-2	14
1.2 Reação de Michael e a 15d-PGJ2	18
1.3 Proteína quinase A e proteína quinase Cε	22
1.4. MALDI-TOF	23
2. Justificativas	26
3. Objetivos	27
3.1 Objetivos gerais	27
3.2 Objetivos específicos.	27
4. Materiais e Métodos	28
4.1 Materiais	28
4.1.1 Reagentes Orgânicos	28
4.1.2 Reagentes Inorgânicos	28
4.1.3 Equipamentos	28
4.2. Métodos	29
4.2.1 Aliquotagem e reação	29
4.2.2 Purificação	30
4.2.3 Análise	30
5. Resultados e discussão	32
6. Considerações finais	38
7. Referências bibliográficas	39

1. Introdução

1.1 15-desoxi^{12,14}-prostaglandina J-2

A 15-desoxi^{12,14}-prostaglandina J-2 (15d-PGJ2) é uma prostaglandina produto final da via da enzima ciclooxygenase-2 (COX-2). A 15d-PGJ2 apesar de ser uma prostaglandina apresenta efeitos anti-inflamatórios, anti-proliferativos e protetores celulares. Esta prostaglandina que é abundantemente produzida em sítios inflamatórios, pode ter como papel biológico a proteção do tecido e diminuição da inflamação(SCHER; PILLINGER, 2005; SURH et al., 2011).

Para a formação de prostaglandinas (figura 1) fosfolipídios presentes na membrana plasmática são liberados na corrente sanguínea, após essa sofrer alguma lesão, esses são substratos para a enzima fosfolipase A2 e se convertem em ácido araquidônico, precursor comum de todos os eicosanoides (prostanoides e leucotrienos)(ONOFRE ALVES NETO, PAULO GUSTAVO BARBONI DANTAS MELO, 2009).

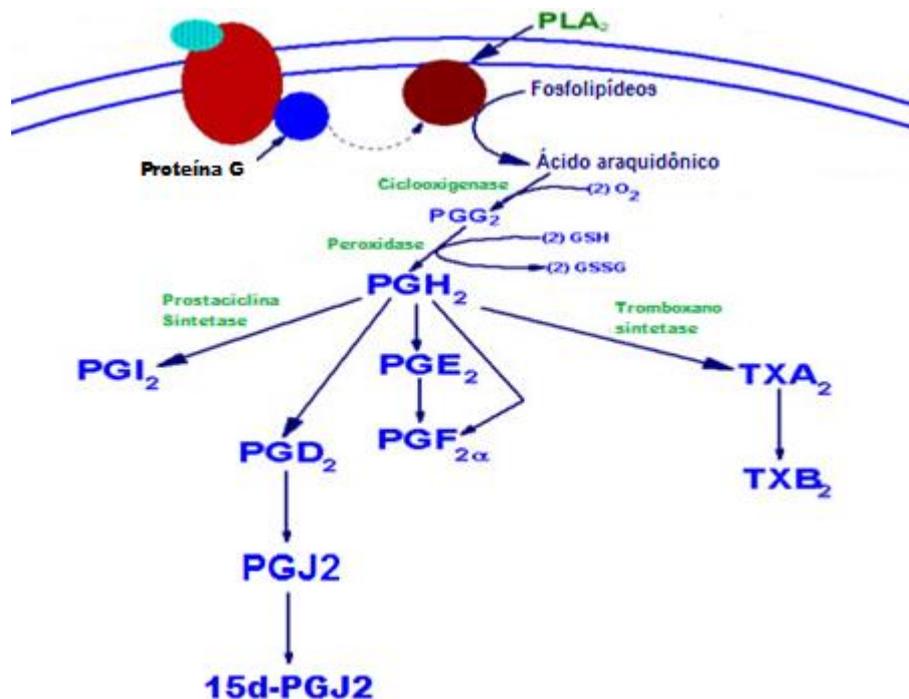


Figura 1. Formação das prostaglandinas.

Fonte: Imagem adaptada de http://www.ff.up.pt/monografias_toxicologia/monografias/ano0708/g3_nimesulide/Imagens/sintesepeg.jpg acessada em junho de 2016

Após formação do ácido araquidônico, esse pode seguir por duas vias principais, a via das ciclooxigenases e a via das lipooxigenases. Pela via das ciclooxigenases são produzidos os prostanoides, as prostaglandinas E2, D2, F2 e a prostaciclina PGL2 (ONOFRE ALVES NETO, PAULO GUSTAVO BARBONI DANTAS MELO, 2009).

A etapa limitante da formação de 15d-PGJ2 é a síntese de prostaglandina H2 (PGH2). A PGH2 é metabolizada em prostaglandina D2 (PGD2) pela enzima prostaglandina D2 sintetase. A PGD2 é espontaneamente convertida em Prostaglandina J2 (PGJ2). A PGJ2 sofre um rearranjo molecular de suas ligações com subsequente desidratação e formação de 15d-PGJ2 (SURH et al., 2011).

O papel protetor da 15d-PGJ2 pode ser explicado por diversos mecanismos, exemplo disto seria a ligação da 15d-PGJ2 aos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ), esta ligação é de alta afinidade. Ao ativar o PPAR γ a 15d-PGJ2 é uma repressora da atividade de diversos genes relacionados à inflamação em macrófagos como a NO sintase e fator de necrose tumoral. 15d-PGJ2 é encontrada *in vivo* durante a fase de resolutividade da inflamação (GILROY, D. W., COLVILLE-NASH, P. R., WILLIS, D., CHIVERS, J., PAUL-CLARK; WILLOUGHBY, 1999).

Assim que é formada, a 15d-PGJ2 também pode agir como um ligante para seus alvos, reagindo com nucleófilos no meio celular, como os grupos tiol (grupo hidrogênio e enxofre) de cisteínas. Já foi evidenciado também que a 15d-PGJ2 pode inibir a expressão da NF-K β , tanto indiretamente se ligando a PPAR γ quanto diretamente através de ligação ao sítio de cisteína de IKB quinase (que nesta via ativaria NF-K β) e também com modificação no sítio de ligação do DNA das subunidades da NF-K β (figura 2). Estes mecanismos diminuem a produção de COX-2, e diminuição da produção de prostaglandinas (STRAUS et al., 2000).

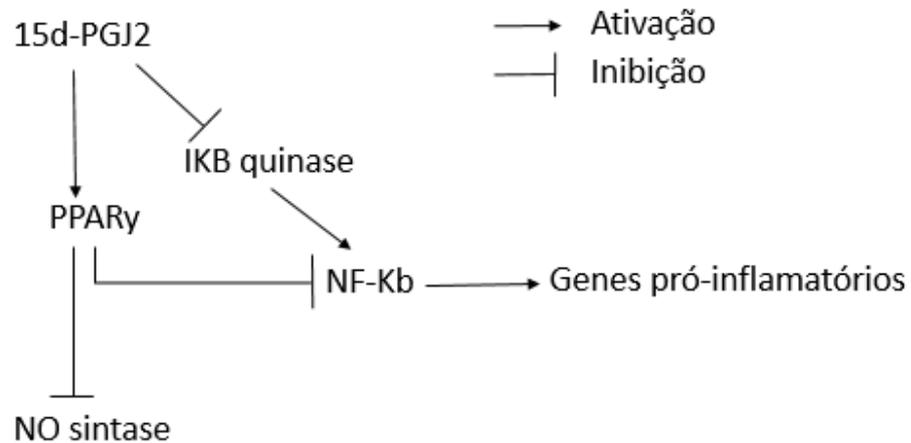


Figura 2. Mecanismo de ação da 15d-PGJ2.

Esta prostaglandina ainda é altamente estudada e vem apresentando uma variedade de efeitos. Na tabela 1 podemos observar uma revisão de estudos dos últimos 5 anos sobre os efeitos desta prostaglandina, em quais proteínas/ genes ela atuou (no modelo testado) e a possível aplicação sugerida pelos autores.

Tabela 1. Revisão de estudos dos anos de 2012 a 2016 que utilizaram a 15d-PGJ2 como molécula ativa. Foi privilegiado estudos que conseguiram demonstrar efeito sobre alguma proteína ou gene. Para tentar delimitar como esta prostaglandina exerce seu papel protetor.

Alvo de ação	Modelo testado	Efeito observado da 15d-PGJ2	Conclusões	Referência
Hu antígeno R	Cultura primária de astrócitos de ratos	↑ da MKP-1 via ligação direta a Hu antígeno R, ligação ocorre na cisteína 245 dessa proteína.	-	(WOO JH, LEE JH, KIM H, CHOI Y, PARK SM, JOE EH, 2015)
ROS, AKT e JNK	Células de carcinoma hepático LM3, SMMC-7721, e Huh-7 HCC	Ativação de JNK e ↑ da expressão de AKT, essa indução foi dependente de ROS	15d-PGJ2 causou apoptose nas células de linhagem carcinogênica de maneira dose dependente.	(CHEN et al., 2015)
RAC1	Células vasculares endoteliais	15d-PGJ2 forma um aduto com a proteína RAC1 via cisteína 178, também foi observado menor mobilidade e espalhamento	-	(WALL et al., 2015)
ROS	Cultura primária de	15d-PGJ2 diminuiu a migração primária das	Essa capacidade alterada de migrar	(LIU et al., 2015)

	células da medula óssea de ratos	células da medula óssea dependente de produção de ROS essa ação foi independente de PPAR γ	para os tecidos pode representar uma nova estratégia de tratamento de fibrose hepática	
Várias	Hepatite autoimune em ratos	Bloqueio da degradação de Ikba inibição da NFKb com ativação de PPAR γ , reduziu IL2, IL6 e IL12	15d-PGJ2 pode ser utilizado como um protetor contra hepatite por \downarrow citocinas pró-inflamatórias.	(CHEN et al., 2014)
Scores de toxicidade	Ratos wistar em modelo de dano renal por ciclosporina	Ciclosporina + 15d-PGJ2 acarretou em \downarrow do estresse oxidativo e \downarrow da toxicidade em marcadores microscópicos. Foi visto efeito semelhante com um agonista de PPAR γ	A combinação de drogas nesses casos poderia diminuir a nefrotoxicidade causada pela ciclosporina	(KOROLCZUK et al., 2014)
ERK1/2 e ELK1	Células de câncer de mama MDA-MB-231	A 15d-PGJ2 através de ligação a ERK1/2 ativa a ELK1.	A 15d-PGJ2 funciona como um supressor de tumor, nessa linhagem celular estudada	(KIM HR, LEE HN, LIM K, SURH YJ, 2014)
Várias	Ratos wistar em modelo de dano agudo em pulmão.	\downarrow atividade da mieloperoxidase, TNF α , ICAM-1, CINC-1, NFKb e p65; \uparrow a produção de IKBa;	A 15d-PGJ2 protegeu os pulmões de dano agudo provavelmente por \downarrow níveis de proteínas pró inflamatórias e \uparrow de proteínas anti-inflamatórias.	(LIU D, GENG Z, ZHU W, WANG H, CHEN Y, 2014)
Caspases 3 e 9	Células sinoviais de coelho	Ativação de caspases 3 e 9	A 15d-PGJ2 foi capaz de causar apoptose em células através de uma via mitocondrial independente de PPAR γ e p53.	(SAKABA Y, AWATA H, MORISUGI T, KAWAKAMI T, SAKUDO A1, 2014)
TRPV1	Células PC12	Diretamente se liga à TRPV1 aumentando fator de crescimento do nervo (NGF) via TRPV1	-	(Shibata T et al. 2014)
Várias	Modelo de artrite em ratos induzida por antígenos	\downarrow extravasamento do plasma, migração leucocitária, e IL6, IL12 e IL18; \uparrow a expressão da molécula anti-adesão CD55 e da citocina anti-inflamatória IL10	A 15d-PGJ2 pode ser utilizada como um anti-inflamatório em potencial para o tratamento de inflamação por artrite.	(Silva Quinteiro M et al. 2014)
B7-H1	Células de melanoma	\downarrow da B7-H1 esta molécula é responsável pela evasão do tumor frente a resposta imune, este	-	(Su-Kil Seo et al. 2014)

		aumento é em comparação a IFN γ (estimulador desta proteína)		
NFkB	Células T Jurkat E6	↓ da secreção de IL13, mecanismo independente de PPAR γ	Autor propõe ligação a NFkB como mecanismo de ação	(DOYLE MC, TREMBLAY S, 2013)
Várias	Células do epitélio pigmentar da retina ARPE19	Quando comparado ao controle + LPS a 15d- PGJ2 ↓ IL-6, MCP1, e ICAM1. Estes resultados foram independentes de PPAR γ	Estes resultados sugerem ↓ de inflamação causada por LPS	(PARK, 2013)
NRF2	Cultura celular de astrócitos	15d-PGJ2 protege neurônios da oxidação por mecanismos específicos de astrócitos via NRF2	-	(Haskew- Layton et al. 2013)
TRPA1	Modelo de inflamação periférica em ratos	↓ da dor causada por óleo de mostarda, esse efeito não foi observado em ratos <i>knockout</i> para TRPA1	-	(WENG et al., 2012)

Os estudos demonstraram que a 15d-PGJ2 pode agir por diversas vias e muitas dessas vias são independentes de PPAR γ . Para que essa independência pudesse ser mostrada no geral foram utilizados inibidores de PPAR γ .

Pode ser observado pela tabela que a 15d-PGJ2 foi altamente explorada nos últimos anos por causa de seu efeito anti-inflamatórios e também pode ser observado uma tendência em novos ensaios com modelos para controle de células tumorais, no geral os estudos com esta prostaglandina nos últimos anos apresentaram resultados positivos e promissores.

1.2 Reação de Michael e a 15d-PGJ2

A molécula da 15d-PGJ2 é capaz de se ligar a um resíduo de cisteína por que apresenta um anel ciclopentênico que contém uma carbonila α , β – insaturada altamente eletrófila (figura 3) que pode reagir covalentemente como um acceptor para a reação de Michael (também conhecida como adição de Michael). Um exemplo de nucleófilo que pode reagir com a 15d-PGJ2, como já foi dito, são os resíduos de

cisteína em proteínas celulares, que serão doadores para a reação de Michael (STRAUS et al., 2000).

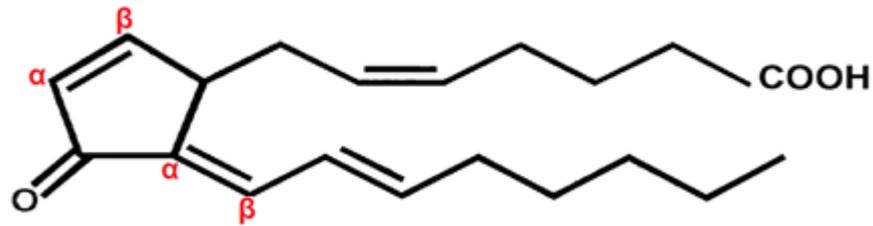


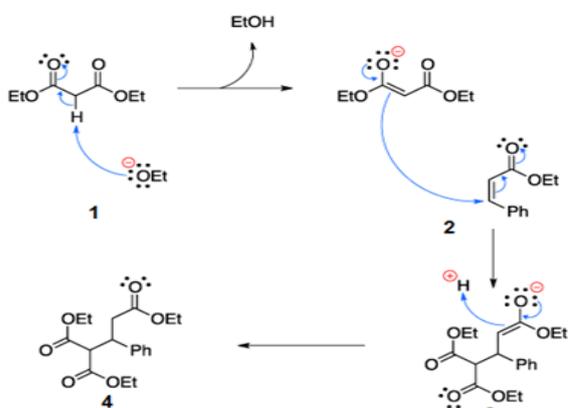
Figura 3. Molécula 15d-PGJ2. O anel ciclopentênico desta molécula apresenta carbonos α e β insaturado. Este padrão é importante porque a carbonila atrai a densidade eletrônica da molécula, deixando as posições α e β vulneráveis a adições eletrofílicas. Usualmente a ligação é realizada no carbono β (T. W. GRAHAM SOLOMONS, CRAIG B. FRYHLE, 2014).

Fonte: Imagem adaptado de Cayman disponível em www.caymanchem.com/product/18570, acessado em abril de 2016.

O mecanismo de ação para essa reação é mostrado na figura 4 e tem as seguintes etapas (Hunt, n.d.; Little, R. D. et. al. 1995) :

1. A carbonila do grupamento 1 é o nucleófilo para a reação de Michael. A molécula em 1 sofre abstração de um próton por uma base do meio reacional, formando um carbânion ou um enolato.

2. O intermediário formado é estabilizado pela sua estrutura de ressonância. Ainda no 2º passo o eletrófilo formado reage com alcenos próximos para formar uma nova ligação carbono-carbono nesse passo ocorre o ataque nucleofílico ao carbono beta do acceptor de Michael (passo 2, etapa lenta da reação), formando um intermediário aniônico, isso é chamado de conjugado da adição de Michael.



3. A perda de um próton no passo 3 é um dos passos finais para a reação de Michael. Com subsequente formação de um novo composto.

Figura 4. Mecanismo para a reação de Michael.

Fonte: Imagem adaptada de <http://www.name-reaction.com/michael-addition> acessado em maio de 2016.

A reação de Michael é altamente utilizada para a formação de ligação carbono-carbono e é uma das reações mais importantes na química orgânica. Uma das variantes dessa reação é a reação tio-Michael onde a molécula nucleófila contém enxofre fazendo com que haja uma nova ligação carbono-enxofre (MATTOS, 1998; MOVASSAGH; SHAYGAN, 2006).

O enxofre é importante em reações biológicas por que cadeias laterais de cisteínas podem ser consideradas os pontos nucleófilos mais potente entre todos os aminoácidos, em condições fisiológicas. Essa reatividade acontece pela presença do grupamento tiol. Tióis são moléculas análogas de álcoois, mas a pequena diferença em eletronegatividade entre eles faz com que a ligação S-H seja menos polarizada do que a ligação O-H. Em contraste, tióis são grupamentos muito mais ácidos pela ligação mais fraca ao H, ou seja, há maior propensão em haver a desprotonação e a densidade eletronegativa da carga restante ficará com o enxofre (CARROLL, 2012; TAJC, SG, TOLBERT, BS, BASAVAPPA, R, & MILLER, 2004).

O grupo tiol nas cisteínas tem grande importância por que no geral fazem papéis importante em sistemas biológicos principalmente em mecanismos de catálises de enzimas e são um importante alvo para reações por serem altamente nucleófilos. Outro ponto importante é que cisteínas tem baixa abundância se comparado com os outros aminoácidos e usualmente desempenham papéis fundamentais na proteína. Essas características fazem dele um importante alvo para inibidores enzimáticos (CARROLL, 2012; CHALKER, JM, BERNARDES, GJL, LIN, YA, & DAVIS, 2009).

O esquema para a reação de tio-Michael está demonstrado abaixo (figura 3). Nesta proposta a carbonila α, β – insaturada (eletrofilica) reage com a molécula 2 (nucleófila) que contém uma ligação tiol, formando assim o produto com uma nova ligação carbono-enzofre (FRANCISCO, 2014; MUKAIYAMA, T., A. IKEGAWA, 1981).

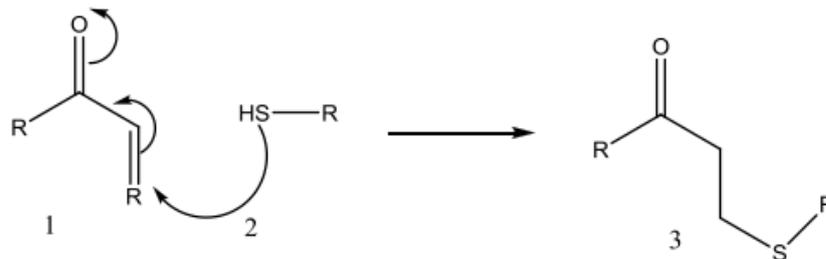


Figura 5. Reação de tio-Michael, proposta mecanística de Mukaiyama

Fonte: Imagem adaptada de Francisco, 2014.

Em alguns estudos já foram comprovados a ligação específica da 15d-PGJ2 em resíduos de cisteína. Por exemplo, em um estudo a 15d-PGJ2 se ligou a proteína UCH-L1, envolvida na etiologia da doença de Parkinson através de uma ligação específica a resíduos de cisteína. Ao se trocar o resíduo cisteína-162 desta proteína, que contém outras cinco cisteínas, por alanina (aminoácidos de propriedades parecidas) a 15d-PGJ2 falhou em se ligar. Esta ligação foi comprovada por espectrometria de massa (utilizando-se *electro spray ionisation*), observando se havia a adição ou não da massa molecular da 15d-PGJ2 em análise de fragmentação da proteína (KOHARUDIN et al., 2010).

Observe na tabela 1 que recentemente Li et al. 2015 e Woo JH et al. 2015 também demonstraram a ligação da 15d-PGJ2 a proteína através de ligação a uma cisteína específica, além de demonstrar que estas cisteínas eram importantes para a função da proteína estudada que eram nesse caso Hu antígeno R e RAC1 em astrócitos e células vasculares respectivamente.

1.3 Proteína quinase A e proteína quinase C ϵ

As proteínas quinases têm esse nome pela sua capacidade catalisar a fosforilação de outras proteínas, modificando sua funcionalidade (ONOFRE ALVES NETO, PAULO GUSTAVO BARBONI DANTAS MELO, 2009). Quinases são passíveis de serem encontradas em praticamente todos os tecidos biológicos e vias de sinalização. Por essa função ubíqua, a desregulação destas proteínas por fatores ambientais ou genéticos podem ser desencadeadoras de diversas patologias (HANAHAN D, 2011).

Um grande número de proteínas quinase contem resíduos de cisteínas próximos de seu sítio catalítico. Porém, ainda não há conhecimento de resíduos de cisteína altamente conservados nestas quinases. Estes resíduos são altamente estudados como possíveis alvos para inibidores de proteínas quinase. Isso ocorre pela alta eletrofilicidade desses grupamentos além de outros fatores que já foram citados nesse trabalho (LIU et al., 2014).

A Proteína quinase A (PKA) tem sua atividade regulada pela adenosina 3,5-monofosfato cíclico (AMPc) que funciona como segundo-mensageiro na célula e foi o primeiro segundo-mensageiro a ser implicado com a sinalização celular da dor inflamatória. A produção de AMPc é necessária como um amplificador do sinal que começou na membrana celular. O AMPc é ativado através de receptores metabotrópicos acoplados a proteína G. O AMPc também pode estar relacionada com a ativação de outras proteínas quinase (Onofre Alves Neto, Paulo Gustavo Barboni Dantas Nascimento, 2009).

A PKA já mostrou atividade em manter a hiperalgesia causada pelo estímulo doloroso, e essa manutenção foi interrompida ao se administrar inibidores seletivos da PKA nos animais em experimentação. Esse estudo demonstra a importância dessa proteína em vias de sinalização na dor (KOCHUVELIKAKAM O. ALEY, 1999).

A ativação da proteína quinase C ϵ (PKC ϵ) está mais relacionada com aumento de cálcio intracelular, trifosfato inositol (IP3) e de diacilgliceróis (DAG). A PKA e a PKC ϵ tem implicações em seu potencial de modificar proteínas, fazendo algumas modificações no padrão de abertura e fechamento de canais podendo mudar assim o desfecho do estímulo doloroso (Onofre Alves Neto, Paulo Gustavo Barboni Dantas Nascimento, 2009).

A PKC ϵ está envolvida em inúmeras rotas celulares de patogênese da resposta inflamatória como a produção de eicosanoides. Alguns estudos já demonstraram que inibidores da PKC ϵ podem diminuir a inflamação em modelos com ratos. Utilizando modelo com lesão inflamatória específica foi demonstrado diminuição da mieloperoxidase (marcador de neutrófilos), prostaglandina E2 e também redução do edema (DEMPSEY EC, NEWTON AC, MOCHLY-ROSEN D, FIELDS AP, REYLAND ME, 2000; KUCHERA S1, BARTH H, JACOBSON P, METZ A, SCHAECHTELE C, 1993).

1.4. MALDI-TOF

Matrix assisted laser desorption ionization (MALDI) é um sistema de ionização em espectrometria de massa, esse sistema provê vaporização de peptídeos e proteínas, através da ionização por laser. Nas análises em MALDI-TOF o analíto é primeiramente cristalizado com um excesso de matriz, usualmente um ácido que absorve bem luz na faixa do ultravioleta (UV) (F. Hillenkamp, M. Karas, D. Holtkamp, 1986; Lewis et al., 2000).

Ao ser exposto ao laser, a matriz será vaporizada juntamente com o analíto. Esta matriz é responsável por absorver energia advinda do laser, protegendo assim a amostra testada. A matriz é também extremamente importante ao agir como um ionizante da amostra, essa ionização ocorre por transferência de prótons. Esse passo é intimamente ligado a combinação da matriz e do analíto (LEWIS; WEI; SIUZDAK, 2000; R.C. BEAVIS, B.T. CHAIT, 1990).

Um dos analisadores de massa mais usuais para uso com o MALDI é o *time of flight* (TOF), este analisador consiste na aceleração de íons gerados com a vaporização através do feixe de laser, até o detector (figura 6). Como estes íons terão massas diferentes eles chegarão ao detector de carga iônica em tempos diferentes, sendo que os mais leves chegarão primeiro ao detector e os mais pesados chegarão depois, este tempo de voo é calculado e transformado em dados no detector (LEWIS; WEI; SIUZDAK, 2000).

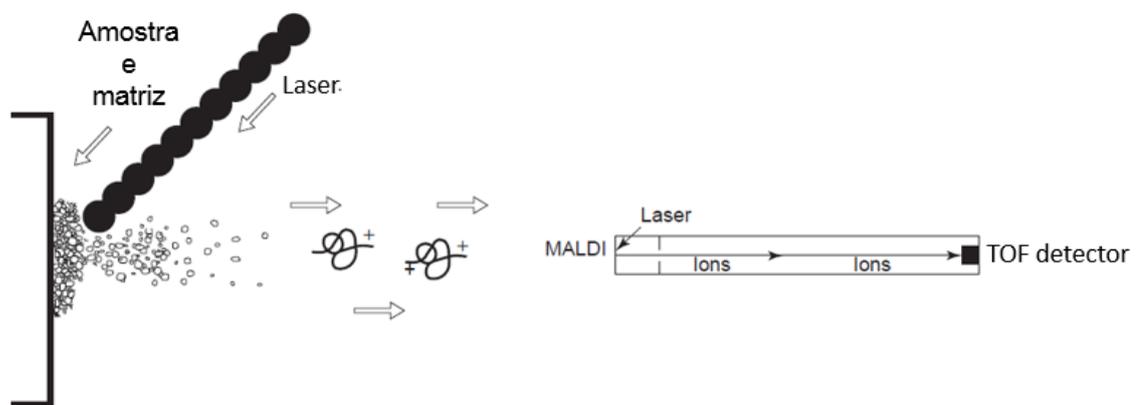


Figura 6. Esquemática do funcionamento de um MALDI-TOF.

Fonte: imagem adaptada de (LEWIS; WEI; SIUZDAK, 2000)

A massa dos íons é determinada por esta propriedade em atingir o detector em diferentes tempos. O composto deve estar na forma ionizada para poder ser acelerado até o detector, após passagem pela detecção é gerado o gráfico massa/carga (m/z) (figura 7), este nome é dado, pois o detector detecta a carga dos compostos e o tempo de voo deles determina o peso molecular das amostras testadas (LEWIS; WEI; SIUZDAK, 2000).

Na figura 7 pode se ver diversos parâmetros que são avaliados quando se estuda um gráfico intensidade (também chamado de abundância) por m/z que foi gerado pelo detector de íons do MALDI-TOF. O ruído se refere a flutuação no sinal de fundo do instrumento. O sinal é a representação nas mudanças do sistema frente a presença de uma substância na amostra que ele consiga detectar (ex. peptídeos, proteínas...), os pontos iniciais e finais do sinal representam a sensibilidade em detectar a massa exata do analíto testada, sendo que quanto menor esta faixa maior a sensibilidade (GREG WELLS; HARRY PREST; CHARLES WILLIAM RUSS IV, 2011; WELLS; PREST; RUSS, 2011).

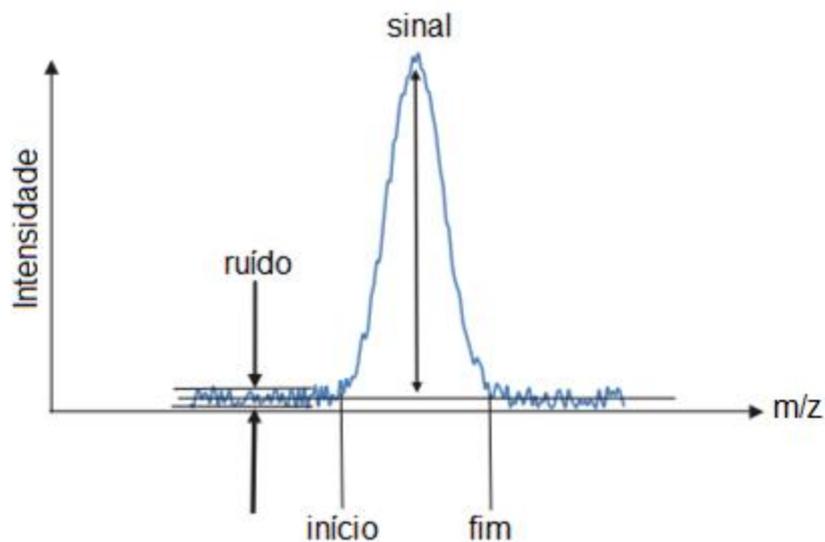


Figura 7. Representação de um gráfico general de intensidade por m/z

Fonte: Adaptado de (GREG WELLS; HARRY PREST; CHARLES WILLIAM RUSS IV, 2011)

Quanto aos dois eixos do gráfico (figura 7) o eixo y o da intensidade seria a representação de quanto deste analíto está presente na amostra. Lembrando que a técnica de MALDI-TOF não é indicada para análises quantitativas. O eixo da m/z é o eixo que representa a massa calculada do composto através do seu tempo de voo no caso do TOF (GREG WELLS; HARRY PREST; CHARLES WILLIAM RUSS IV, 2011; WELLS; PREST; RUSS, 2011).

2. Justificativas

O desenvolvimento de inibidores de proteína quinase são altamente explorados pela indústria de desenvolvimento de novas drogas, principalmente nas áreas de inflamação e oncologia. Mais que 40 quinases são estudadas como alvo terapêutico e 14 inibidores de quinase já receberam aprovação regulatória pelo *food and drug administration* (FDA) nos últimos anos (BARF T, 2012).

Estudos com novos inibidores contendo sítios eletrófilos (como a 15d-PGJ2) que podem interagir com nucleófilos como a cisteína, lisina ou tirosina já foram testados como inibidores irreversíveis da proteína quinase. A Reação de Michael é a reação mais utilizada para tentar elucidar novos inibidores destas proteínas. A inibição irreversível já é altamente utilizada na prática clínica tendo outras proteínas como alvo, alguns exemplos de inibidores irreversíveis são anti-inflamatórios como o ácido acetilsalicílico e antibióticos beta-lactâmicos como a penicilina (BARF T, 2012; LIU et al., 2014).

Existem diversas situações patológicas onde a PKA e a PKC ϵ estão envolvidas. Além de estabelecer um modelo para inovação farmacêutica de proteínas quinases, novos inibidores são importantes ferramentas farmacológicas para testes experimentais por exemplo (GX, 2003; KUCHERA S1, BARTH H, JACOBSON P, METZ A, SCHAECHTELE C, 1993).

Levando em consideração tudo apresentado, este trabalho tem a intenção de analisar o potencial de ligação da 15d-PGJ2 a PKA e PKC ϵ tendo em vista o grande potencial destas proteínas de sofrer inibição através da reação de Michael e da 15d-PGJ2 em ser um acceptor para essa reação.

3. Objetivos

3.1 Objetivos gerais

Este trabalho tem como objetivo averiguar se há interação química entre a 15d-PGJ2 e as enzimas PKA e PKC ϵ em um modelo *in vitro* utilizando MALDI-TOF.

3.2 Objetivos específicos.

- Avaliar se a interação que ocorre entre a 15d-PGJ2 e as enzimas PKA e PKC ϵ é devida a resíduos aceptores de Michael presentes nestas enzimas.

4. Materiais e Métodos

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes Orgânicos

- 15d-PGJ2 produzida pela *Cayman* (peso molecular de 316,4 g/mol);
- 2-Ciclopentenona produzida pela *sigma aldrich* (peso molecular de 84,12g/mol);
- Proteína quinase A extraída de coração bovino produzida pela *sigma aldrich* (peso molecular de 43 KDA);
- Proteína quinase C ϵ produzida por *mybiousource* (peso molecular de 83,674 KDA);

4.1.2 Reagentes e solventes

- Solventes todos em pureza no mínimo para análise (P.A.): Água deionizada, acetonitrila, Álcool etílico, Ácido trifluoroacético, Ácido Clorídrico, Ácido acético, Ácido fórmico, Tris Base e ácido sinapínico

4.1.3 Equipamentos

- *Ziptips*® C18 para purificação produzida por *Merck millipore*;
- MALDI-TOF/TOF modelo 5800 para análise produzido pela *sciex*;
- Vidrarias de uso geral;
- Equipamentos de laboratório de uso geral.

4.2 Métodos

4.2.1 Alíquotas e reação

A partir das soluções estoques, foram feitas alíquotagens das PKA, PKC ϵ , 15d-PGJ2 e 2-Ciclopenten-1-ona (Cp) nas concentrações desejadas para o experimento.

Foram separadas em tubos de micropipetagem da seguinte forma:

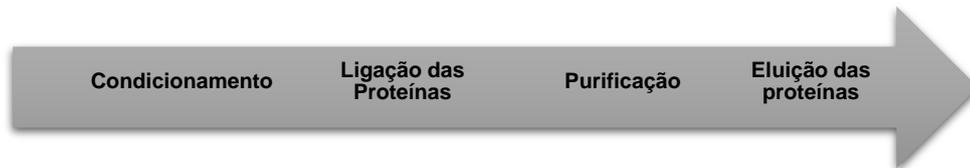
PKA	PKA + 15d-PGJ2	PKA +Cp	PKC ϵ	PKC ϵ + 15d-PGJ2	PKC ϵ + Cp
-----	----------------	---------	----------------	---------------------------	---------------------

A relação de proteína para 15d-PGJ2 foi de 1:2 e a relação de proteína para Cp foi de 1:5, considerando seus respectivos pesos moleculares e a estequiometria de reação de cada molécula. A Cp em nossos experimentos irá servir como um controle para a reação de Michael, se a 15d-PGJ2 reagir com as proteínas quinase através da reação de Michael a Cp também irá reagir.

Após preparo das soluções contendo as proteínas sozinhas, ou proteínas mais prostaglandina ou Cp, este preparo foi deixado em temperatura ambiente por 30 minutos para que ocorresse a reação entre as moléculas. A concentração das PKa foi de 100 pmol/ μ L e a concentração da PKC ϵ foi de 2 a 2,4 pmol/ μ L e o pH da solução final foi de 7.6 (KOHARUDIN et al., 2010).

4.2.2 Purificação

Foi evidenciada após primeiros experimentos a necessidade de dessalinização das amostras, para isso, foram utilizadas ponteiros *ziptip*® C18 e seguidos os protocolos segundo os fabricantes. Foi seguido o seguinte esquema para purificação.



Primeiramente as amostras são acidificadas com ácido trifluoroacético, em quantidades menores do que 1%. Logo em seguida, as *ziptips*® são condicionadas com solvente orgânico, neste caso a aceto nitrila. E então, o solvente orgânico é lavado da ponteira com água também acidificada.

Agora com a ponteira já condicionada se pode pipetar a amostra, esta ficará ligada a camada de C18 da ponteira, e após algumas pipetagens se começa o processo de dessalinização lavando a amostra com água acidificada. Após alguns ciclos se pode eluir a amostra da ponteira com ajuda de um solvente orgânico, este eluído é acondicionado em um tubo de micropipetagem e essa que agora purificado será analisada junto ao MALDI-TOF.

4.2.3 Análise

As soluções agora purificadas são misturadas a uma matriz polimérica no nosso caso, o ácido sinapínico e inseridas no MALDI-TOF. O ácido sinapínico é uma matriz e elas são utilizadas em MALDI-TOF por seu papel em absorver a radiação do laser e também em doar prótons para a amostra testada. A matriz utilizada foi o ácido sinapínico por ser a mais indicada para proteínas com o peso molecular das proteínas que testamos (R.C. BEAVIS, B.T. CHAIT, 1990).

A matriz junto com a amostra é irradiada por um laser que irá vaporizar e ionizar a amostra, esta amostra agora ionizada pode ser detectada pelo detector massa/carga do equipamento, através desta detecção o equipamento irá gerar um gráfico onde demonstrará a abundância em que os íons aparecem nessa amostra e sua respectiva massa por número atômico (m/z) também conhecido como gráfico massa/carga.

Para testar se a 15d-PGJ2 reagiu com a PKA ou PKC ϵ em um sistema in vitro ela foi adicionada proporcionalmente a quantidade molar de PKA/PKC ϵ , e após isso, foi analisada no MALDI-TOF. Gerando agora o gráfico m/z x intensidade da PKA/PKC ϵ + 15d-PGJ2. Também será analisado se a Cp tem sucesso a se ligar nestas proteínas.

5. Resultados e discussão

Em nossos experimentos não foi possível demonstrar a ligação da 15d-PGJ2 a PKA ou PKC ϵ através da técnica de MALDI-TOF. Isso ocorreu por erros analíticos provavelmente durante o processamento das amostras. Estes erros serão discutidos mais afundo neste trabalho.

Já se sabe que o preparo da amostra é um dos passos mais importantes para a qualidade do espectro em um MALDI-TOF, esse preparo é importante tanto para conseguir um bom sinal, para conseguir o mínimo de ruído e também uma boa resolução em seu sinal. Existem diversas formas de preparar amostras para o MALDI-TOF, porém, mesmo aplicando a mesma técnica pode haver grande diferenças entre repetições em um ensaio e entre amostras (F. HILLENKAMP, M. KARAS, D. HOLTKAMP, 1986).

Em nossos experimentos foram separadas as proteínas quinases da seguinte forma: proteína quinase sozinha, proteína quinase contendo 15d-PGJ2 ou proteína quinase mais Cp. Se a 15d-PGJ2 interagisse com as proteínas quinases, seria avaliado então se essas interagiriam com a Cp, se houvesse interação essa seria a prova de que essa interação ocorreria por reação de Michael. Levando em consideração que a Cp também é capaz de ser um eletrófilo para a reação de Michael, note a semelhança entre essas duas moléculas, principalmente na parte quimicamente ativa da molécula para essa reação (figura 8) (KOHARUDIN et al., 2010).

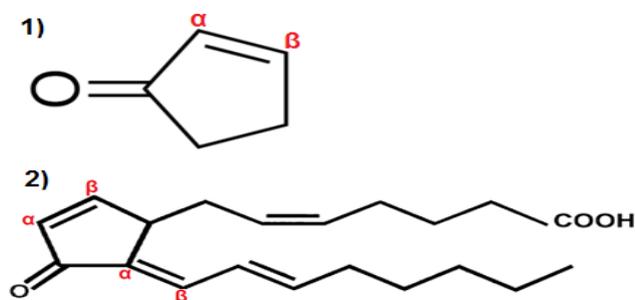


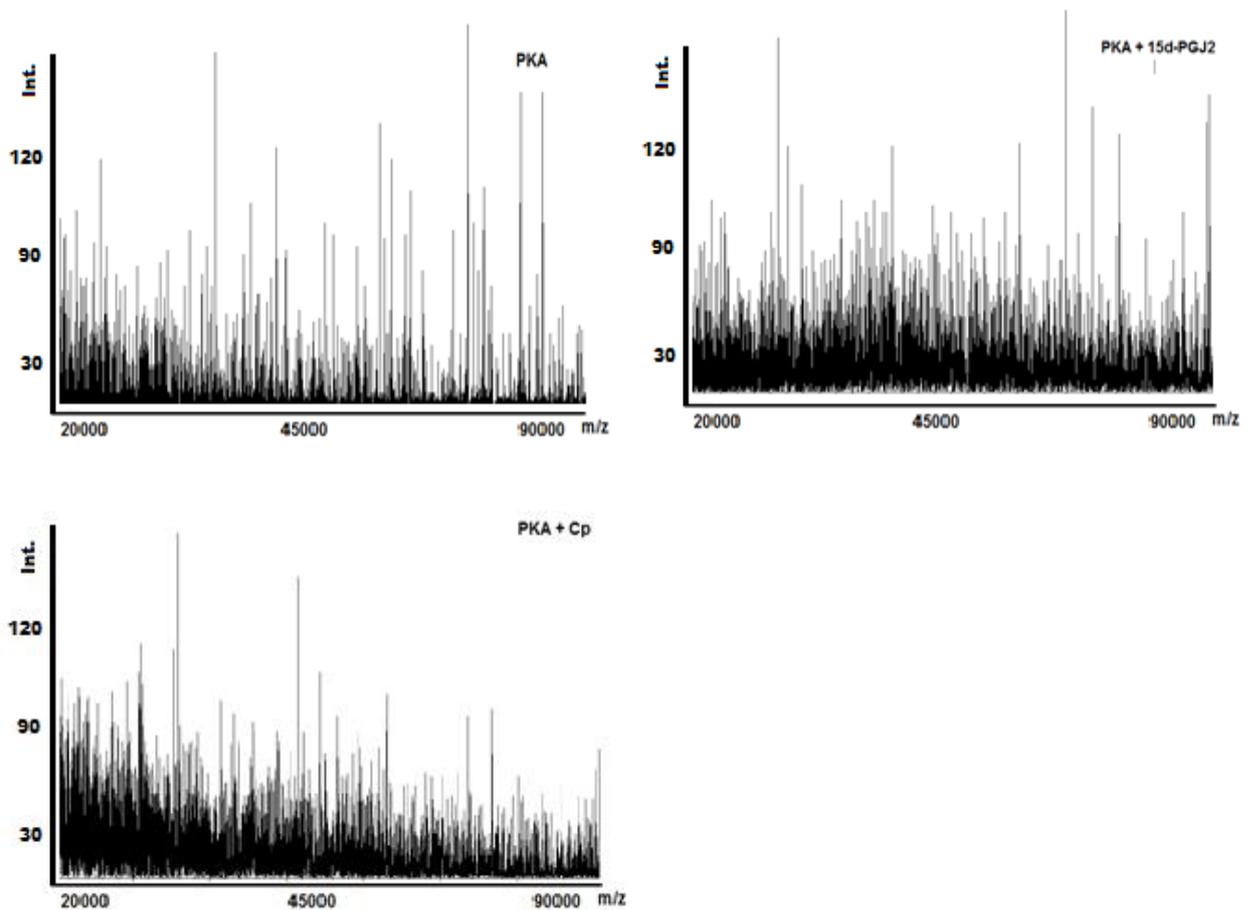
Figura 8. Note os carbonos α e β dessas estruturas, esses são os responsáveis pela eletrofilicidade na reação de Michael em 1) 2-ciclopenten-1-ona e em 2) 15d-Prostaglandina J-2

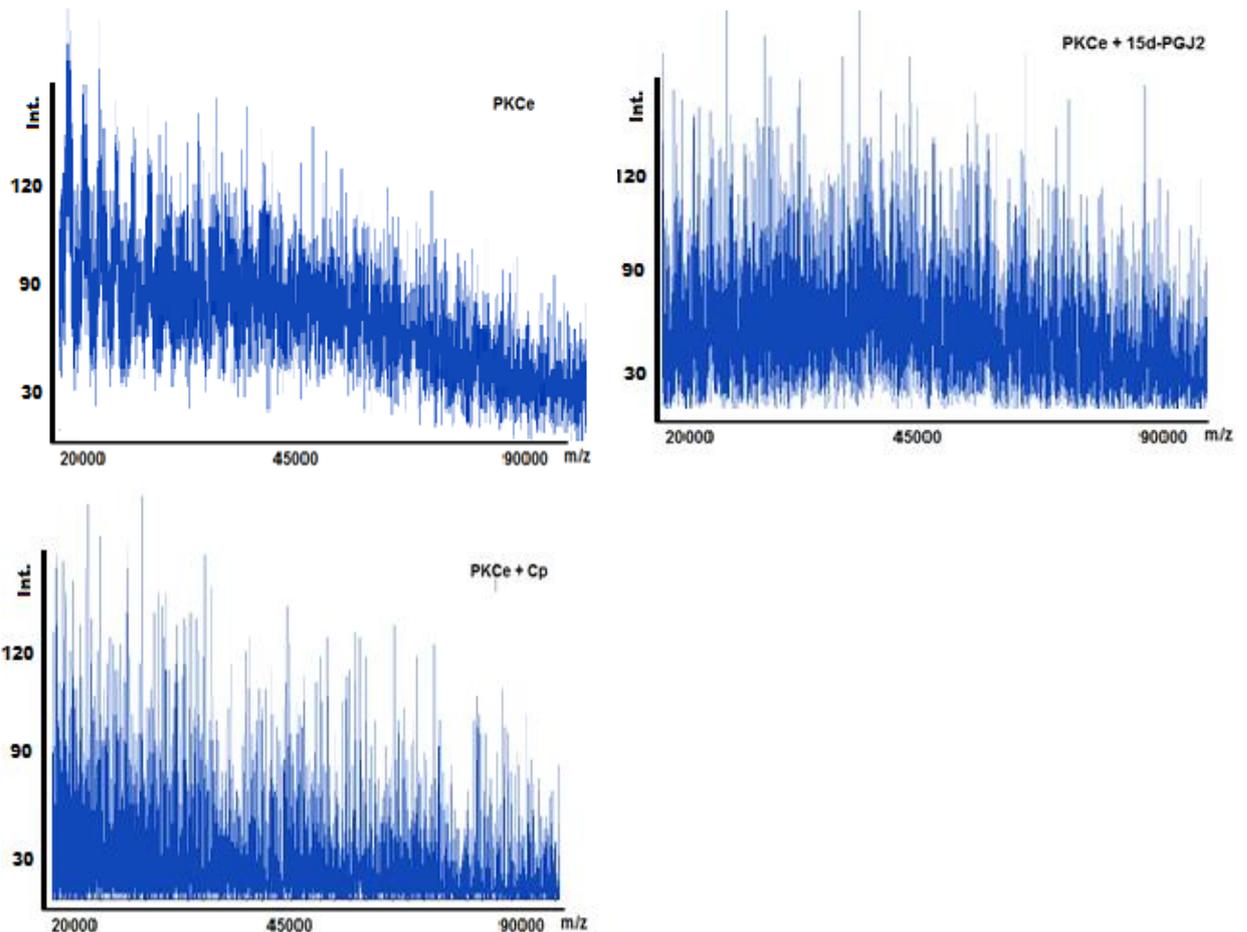
Fonte: adaptado de http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/structure8/103/mfcd00001401.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00001401-medium.png e de www.caymanchem.com/product/18570 acessado em maio de 2016

Nossos controles do peso molecular seriam as PKA e PKCε os pesos moleculares já descritos na literatura seriam analisados com os pesos moleculares experimentalmente aferidos. E seria visto se há ou não interação com as prostaglandinas. Se houvesse interação essa interação poderia ser potencialmente inibitória já que em uma revisão recente da literatura foi observado que a reação de Michael é a reação mais utilizada para se tentar promover inibição irreversível em proteínas quinases (BARF T, 2012).

Em primeira tentativa de se obter o espectro de massa das proteínas testadas, seguindo protocolo como consta nos métodos, se obteve os seguintes espectros:

Gráficos 1 a 6. Espectros de massa para as 6 amostras testadas, todos os gráficos são intensidade relativa por m/z





Como pôde ser observado, nos gráficos de 1 a 6, não se pode evidenciar nenhum pico na faixa de peso molecular das proteínas testadas que são para a PKA 43 Kda e para a PKC ϵ 83,6 Kda. Nestes primeiros espectros somente pôde ser observado ruído. Este ruído foi ocasionado provavelmente devido a um excesso de sal na amostra proveniente da solução de tamponamento utilizada nos experimentos.

Como já foi exemplificado o MALDI-TOF funciona com um laser que se é irradiado para a matriz que contém a amostra, essa matriz absorverá energia do laser e será a doadora de prótons para a amostra (esta estará apta a recebê-los com a ajuda da energia do laser). Por causa deste processo de ionização amostras contendo sal competem pela fonte de Íons, pois tendem a se ionizar com maior facilidade (KELLER et al., 2008; LANCER, 2009).

Proteínas são compostos orgânicos e no geral esses compostos raramente sofrem ionização espontaneamente por que necessitam de uma grande energia de ionização por, preferencialmente, compartilharem elétrons por ligações covalentes, diferente de compostos inorgânicos como sais que fazem ligações iônicas. (CAREY,

2009) Para se contornar este problema analítico deve-se então diminuir ao máximo a concentrações destes interferentes no nosso caso sais através de processos de purificação da amostra.

Existem algumas ferramentas de termoquímica computacionais para a elucidação da energia de ionização de compostos orgânicos, além de seus pontos preferencias de fragmentação. Para que haja a protonação a basicidade intrínseca em fase gasosa das espécies (já que os compostos são retirados da forma em solução e colocados em gasosa pela irradiação do laser) e a afinidade protônica da espécie devem ser consideradas. Essas duas variáveis são utilizadas para tentar explicar a maioria dos íons formados no espectro, porém, ainda não é o suficiente para explicar alguns íons presentes no espectro. Isso é explicado também pela competição que alguns íons que possuem energias de ionização baixas com formação de moléculas protonadas como por exemplo $M + Na^+$ ou $M + K^+$ (VESSECCHI et al., 2008).

Já foi demonstrado anteriormente como os sais presentes na maioria dos tampões podem suprimir o sinal de um espectro. Yao 1998 e colaboradores já demonstraram que um aumento da concentração do tampão em soro bovino pode suprimir o sinal das proteínas até esse ser inexistente (figura 9) (YAO et al., 1998).

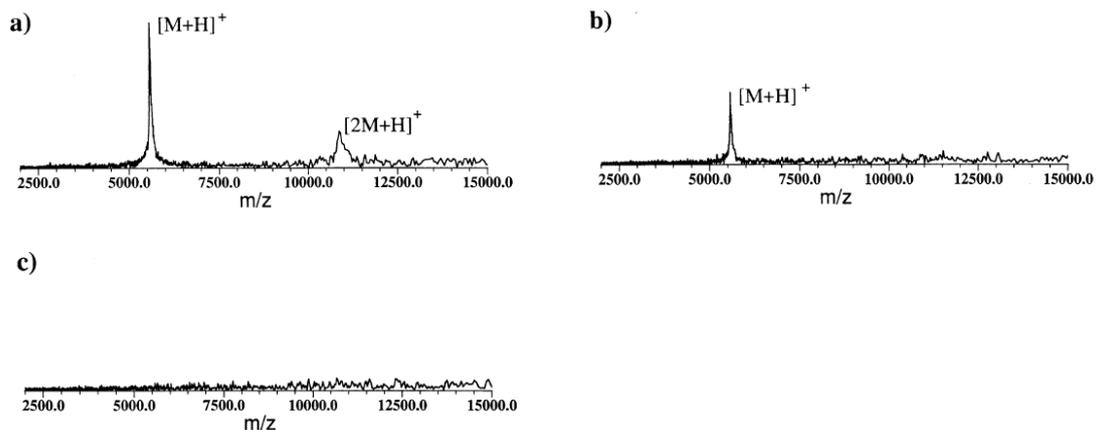


Figura 9. Espectros provenientes de MALDI-TOF com várias concentrações de tampão

BICINE a) 4 mM b) 20 mM e c) 50mM

Fonte : Adaptada de (YAO et al., 1998)

Nesse mesmo artigo há uma proposta que seja aumentada a razão entre tampão e amostra em até 10 vezes para que haja uma menor interferência do sal na cristalização da amostra.(YAO et al., 1998) Esse método será também testado por nossa equipe em experimentos futuros.

Após essa discussão dos resultados, foi então evidenciada a necessidade de dessalinização das amostras, para evitar supressão do sinal da proteína de interesse como foi discutido acima, foi feito dessalinização com a *ziptip*® C18, como foi descrito nos métodos.

A *Ziptip*® C18 é uma ponteira de 10µL como uma camada cromatográfica em sua ponta. Essa camada serve para que proteínas e peptídeos se liguem possibilitando assim sua purificação em amostras contaminadas com outros solventes ou sais. Esta ponteira também permite aumentar a concentração de proteínas no volume final da amostra (Millipore Corporation, 2005).

Após refazer o experimento adicionando esta nova etapa, não foi evidenciado em nossos gráficos (gráficos omitidos) pico na região de massa das proteínas testadas. Foi evidenciado também perda de todo o ruído.

Isso ocorreu provavelmente por problemas na fase de dessalinização das amostras. Um problema comum da *Ziptip*® é que algumas amostras falham em se ligar na camada de C18 ou falham na hora de eluir-se dessa camada ficando assim impregnadas nesta ponteira (Millipore Corporation, 2005).

Em especificações do fabricante é relatado que a maioria dos problemas ligados ao processo de dessalinização com a *ziptip*® são decorrentes a problemas de ligação da proteína com a C18. Para evitar estes problemas de ligação/eluição o fabricante recomenda mudanças nas concentrações dos solventes que ativam a ponteira. Para evitar problemas na hora de eluição também é recomendado mudar a concentração do solvente orgânico que elui as proteínas das ponteiras (Millipore Corporation, 2005).

Em experimentações futuras tentaremos fazer diferentes gradientes de concentração dos nossos solventes tanto na fase de ligação da proteína quanto na fase de eluição, para tentar achar a melhor faixa de ligação das proteínas a C18.

Outro método de purificação/dessalinização das amostras que poderá ser explorado em experimentos futuros é a cromatografia líquida acoplada ao espectro de massas. Ela funciona baseada na afinidade do analito em passar por uma coluna cromatográfica, onde por ter maior afinidade pela coluna (fase estacionária) irá migrar mais lentamente pela coluna enquanto que sais e outros contaminantes por não terem

afinidade pela coluna irão ser eluídos primeiramente. As proteínas irão ficar retidas na coluna sendo eluídas posteriormente (PITT, 2009).

A fase móvel para proteínas usualmente é um solvente orgânico e a fase estacionário é uma coluna de C18. O diferencial principal desta técnica para a técnica com a *ziptip*® é que essa como já é acoplada ao espectrômetro de massas já prepara o plaqueamento para o espectrômetro de massas, alcançando assim maior pureza nas análises por diminuir erro humano no processamento da amostra.

6. Considerações finais

A PKA e a PKC ϵ são alvos promissores para novos fármacos, e moléculas que possam ser aceptoras para a reação de Michael e são potenciais inibidores para estas moléculas.

Não foi possível neste trabalho demonstrar a ligação da 15d-PGJ2 as enzimas PKA e PKC ϵ utilizando espectrometria de massa, houve problemas analíticos com nossos experimentos, esses erros foram discutidos e analisados aqui para correção em experimentos futuros.

Esse trabalho serve como uma pré-validação para o uso do MALDI-TOF com esse tipo de amostra e como um guia para o preparo de futuras amostras.

7. Referências bibliográficas

BARF T, K. A. Irreversible Protein Kinase Inhibitors: Balancing the Benefits and Risks. **j. Med Chem.**, 2012.

CAREY, F. A. **Química orgânica**. [s.l.] AMGH editora, 2009.

CARROLL, M. L. C. AND K. S. THE CHEMISTRY OF THIOL OXIDATION AND DETECTION. **Oxidative Stress and Redox Regulation**, 2012.

CHALKER, JM, BERNARDES, GJL, LIN, YA, & DAVIS, B. Chemical modification of proteins at cysteine: opportunities in chemistry and biology. **Chem Asian J**, 2009.

CHEN, K. et al. 15-Deoxy- γ 12,14-prostaglandin J2 reduces liver impairment in a model of ConA-induced acute hepatic inflammation by activation of PPAR γ and reduction in NF- κ B activity. **PPAR Research**, v. 2014, 2014.

CHEN, K. et al. Inhibitive effects of 15-deoxy- Δ 12 , 14 -prostaglandin J 2 on hepatoma-cell proliferation through reactive oxygen species-mediated apoptosis. p. 3585–3593, 2015.

CORPORATION, M. **User Guide for Reversed-Phase ziptip**, 2005.

DEMPSEY EC, NEWTON AC, MOCHLY-ROSEN D, FIELDS AP, REYLAND ME, ET AL. Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 279, p. L429–43, 2000.

DOYLE MC, TREMBLAY S, D. N. 15-Deoxy- Δ (12,14)-prostaglandin J2 inhibits IL-13 production in T cells via an NF- κ B-dependent mechanism. **biochim. biophysic. res, community**, 2013.

F. HILLENKAMP, M. KARAS, D. HOLTKAMP, P. K. Energy Deposition in Ultraviolet Laser Spectrometry of Biomolecules. **Int. J.Mass Spectrom. Ion Phys.**, v. 69, p. 265–276, 1986.

FRANCISCO, E. LINCOLN. **SÍNTESE E ANÁLISE CONFORMACIONAL DE DERIVADOS DA 3-FENILSULFANILCICLOHEXANONAS 4'-SUBSTITUÍDAS.** [s.l: s.n.].

GILROY, D. W., COLVILLE-NASH, P. R., WILLIS, D., CHIVERS, J., PAUL-CLARK, M. J. & WILLOUGHBY, D. A. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. **Nat. Med.**, v. 5, p. 698–701, 1999.

GREG WELLS; HARRY PREST; CHARLES WILLIAM RUSS IV. Why Use Signal-To-Noise As a Measure of MS Performance When It Is Often Meaningless? **Current Topics in Mass Spectrometry**, p. 28–33, 2011.

GX, S. Selective protein kinase C inhibitors and their applications. **Current drug targets, cardiovascular & haematological disorders**, v. 4, n. 301-7, 2003.

HANAHAN D, W. R. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, p. 646–674, 2011.

HASKEW-LAYTON, R. E. et al. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) protects neurons from oxidative death via an Nrf2 astrocyte-specific mechanism independent of PPAR α . **Journal of Neurochemistry**, v. 124, n. 4, p. 536–547, 2013.

HUNT, I. **Enols and Enolates – The Michael Addition reaction.** [s.l: s.n.].

KELLER, B. O. et al. Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 627, n. 1, p. 71–81, 2008.

KIM HR, LEE HN, LIM K, SURH YJ, N. H. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ induces expression of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase through Elk-1 activation in human breast cancer MDA-MB-231 cells. **mutation res.**, v. 768, p. 6–15, 2014.

KOCHUVELIKAKAM O. ALEY, J. D. L. Role of Protein Kinase A in the Maintenance of Inflammatory Pain. **The journal of neuroscience**, v. 19, p. 2181–2186, 1999.

KOHARUDIN, L. M. I. et al. Cyclopentenone prostaglandin-induced unfolding and aggregation of the Parkinson. 2010.

KOROLCZUK, A. et al. The role of peroxisome-proliferator-activating receptor gamma agonists: Rosiglitazone and 15-deoxy-delta^{12,14}-prostaglandin J₂ in chronic experimental cyclosporine a-induced nephrotoxicity. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 65, n. 6, p. 867–876, 2014.

KUCHERA S1, BARTH H, JACOBSON P, METZ A, SCHAECHTELE C, S. D. Anti-inflammatory properties of the protein kinase C inhibitor, 3-[1-[3-(dimethylamino)propyl]-1H-indol-3-yl]-4-(1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione monohydrochloride (GF109203X) in the PMA-mouse ear edema model. **Agents Actions.**, v. 39, 1993.

LANCER, F. M. **A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”?**, 2009.

LEWIS, J. K.; WEI, J.; SIUZDAK, G. Matrix-assisted Laser Desorption / Ionization Mass Spectrometry in Peptide and Protein Analysis. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, p. 5880–5894, 2000.

LI, X. Y. et al. in a rat model of chronic obstructive pulmonary disease and human bronchial epithelial cells via Nrf2 activation. v. 14, n. 4, p. 14037–14042, 2015.

LITTLE, R. D. MASJEDIZADEH, M. R. WALLQUIST, O. MCLOUGHLIN, J. I. The Intramolecular Michael Reaction. **Org. React.**, p. 315–552, 1995.

LIU D, GENG Z, ZHU W, WANG H, CHEN Y, L. J. 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ ameliorates endotoxin-induced acute lung injury in rats. **Chinese medical journal**, v. 127, 2014.

LIU, Q. et al. NIH Public Access. v. 20, n. 2, p. 146–159, 2014.

LIU, X. et al. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂ Inhibits Homing of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Triggered by Chronic Liver Injury via Redox Pathway. **PPAR Research**, v. 2015, p. 1–11, 2015.

MATTOS, M. C. DE. Aspectos mecanísticos da adição de Michael. **Química nova**, v. 22(5), 1998.

MOVASSAGH, B.; SHAYGAN, P. Michael addition of thiols to α , β -unsaturated carbonyl compounds under solvent-free conditions. v. 2006, n. xii, p. 130–137, 2006.

MUKAIYAMA, T., A. IKEGAWA, AND K. S. HIGHLY ENANTIOSELECTIVE MICHAEL ADDITION OF THIOLS TO 2-CYCLOHEXENONE BY USING (2S,4S)-2-(ANILINOMETHYL)-1-ETHYL-4-HYDROXYPYRRQLIPINE AS A CHIRAL CATALYST. **Chemistry Letters**, p. 165–168, 1981.

ONOFRE ALVES NETO, PAULO GUSTAVO BARBONI DANTAS MELO, A. M. I. **Dor : princípios e práticas**. I ed. Porto Alegre: [s.n.].

PARK, W. The 15-deoxy- δ 12,14-prostaglandin J2 inhibits LPS-stimulated inflammation via enhancement of the platelet-activating factor acetylhydrolase activity in human retinal pigment epithelial cells. **International Journal of Molecular Medicine**, p. 449–456, 2013.

PITT, J. J. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. **The Clinical biochemist. Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists**, v. 30, n. 1, p. 19–34, 2009.

R.C. BEAVIS, B.T. CHAIT, K. G. No Title. **Standing, Physics**, v. 66, p. 269, 1990.

SAKABA Y, AWATA H, MORISUGI T, KAWAKAMI T, SAKUDO A1, T. Y. 15-Deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 induces PPAR γ - and p53-independent apoptosis in rabbit synovial cells. **prostaglandins other lipid mediators**, v. 109-111, 2014.

SCHER, J. U.; PILLINGER, M. H. 15d-PGJ 2: The anti-inflammatory prostaglandin? **Clinical Immunology**, v. 114, n. 2, p. 100–109, 2005.

SHIBATA T, TAKAHASHI K, MATSUBARA Y, TAKAHASHI N, MORI Y, U. K. 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 as a potential TRPV1-dependent atopic dermatitis enhancer. **free rad. bio. med.**, 2014.

SILVA QUINTEIRO M, HENRIQUE NAPIMOGA M, GOMES MACEDO C, FURTADO FREITAS F, BALASSINI ABDALLA H, BONFANTE R, T. C.-N. J. 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 reduces albumin-induced arthritis in temporomandibular joint of rats. **european journal of pharmacology**, v. 5, n. 740, p. 58–65, 2014.

STRAUS, D. S. et al. 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 9, p. 4844–4849, 2000.

SU-KIL SEOA, DAE-IL SEOB , WON SUN PARKC, WON-KYO JUNGD, DAE-SUNG LEEE, SAE-GWANG PARKA, JUNG SIK CHOIF, MI-SEON KANGG, YOUNG HYUN CHOIH, INHAK CHOIA, B. C. Y. Attenuation of IFN- γ -induced B7-H1 expression by 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 via downregulation of the Jak/STAT/IRF-1 signaling pathway. **Life sciences**, v. 112, n. 1-2, p. 82–89, 2014.

SURH, Y. J. et al. 15-Deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J 2, an electrophilic lipid mediator of anti-inflammatory and pro-resolving signaling. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, n. 10, p. 1335–1351, 2011.

T. W. GRAHAM SOLOMONS, CRAIG B. FRYHLE, S. A. S. **Organic chemistry - ed. Willey**. [s.l: s.n.].

TAJC, SG, TOLBERT, BS, BASAVAPPA, R, & MILLER, B. Direct determination of thiol pKa by isothermal titration microcalorimetry. **J Am Chem Soc**, v. 126, p. :10508–10509., 2004.

TATIANA V. PETROVA, KEITH T. AKAMA, AND L. J. V. E. Cyclopentenone prostaglandins suppress activation of microglia: Down-regulation of inducible nitric-oxide synthase by 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2. **PNAS**, v. 96, p. 4668–4673, 1999.

VESSECCHI, R. et al. Aplicação da química quântica computacional no estudo de processos químicos envolvidos em espectrometria de massas. **Quimica Nova**, v. 31, n. 4, p. 840–853, 2008.

WALL, S. B. et al. Rac1 modification by an electrophilic 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 analog. **Redox Biology**, v. 4, p. 346–354, 2015.

WELLS, G.; PREST, H.; RUSS, C. W. Signal , Noise , and Detection Limits in Mass Spectrometry. **Technical Note (Agilent)**, p. 8, 2011.

WENG, Y. et al. Prostaglandin metabolite induces inhibition of TRPA1 and channel-dependent nociception. **Molecular pain**, v. 8, n. 1, p. 1, 2012.

WOO JH, LEE JH, KIM H, CHOI Y, PARK SM, JOE EH, J. I. MAP kinase phosphatase-1 expression is regulated by 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 via a HuR-dependent post-transcriptional mechanism. **biochim. biophysic. acta**, 2015.

YAO, J. et al. Importance of Matrix : Analyte Ratio for Buffer a Matrix in Matrix-Assisted Laser Desorption / Spectrometry and Matrix-Assisted Laser. v. 0305, n. 98, 1998.