



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Nayara Rodrigues Vieira Cavassan

**Expressão Diferencial de Proteínas no Exsudato
Inflamatório de Úlceras Venosas Crônicas Antes e
Após o Tratamento com Selante Heterólogo de
Fibrina: Uma Coorte Prospectiva**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Doenças Tropicais.

Nayara Rodrigues Vieira Cavassan

**Expressão Diferencial de Proteínas no Exsudato
Inflamatório de Úlceras Venosas Crônicas Antes e
Após o Tratamento com Selante Heterólogo de
Fibrina: Uma Coorte Prospectiva**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Lucilene Delazari dos Santos

Botucatu
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCN. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Cavassan, Nayara Rodrigues Vieira.

Expressão diferencial de proteínas no exsudato
inflamatório de úlceras venosas crônicas antes e após o
tratamento com selante heterólogo de fibrina : uma coorte
prospectiva / Nayara Rodrigues Vieira Cavassan. - Botucatu,
2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Lucilene Delazari dos Santos
Capes: 40101096

1. Úlceras - Prognóstico. 2. Marcadores bioquímicos.
3. Proteômica. 4. Cicatrização. 5. Proteínas. 6. Adesivo
tecidual de fibrina.

Palavras-chave: Biomarcadores; Cicatrização; Proteômica;
Proteína; Úlcera venosa crônica.

Dedicatória

*Dedico o presente trabalho ao meu filho, Francisco, que me trouxe
sentido novo e me mostrou que a vida é feita de inúmeros recomeços.
Sempre recomeçarei por você.*

Agradecimientos

A Deus por toda Sua honra e glória. Agradeço imensamente por Seu amor incondicional, pelas conquistas, família e amigos. Suas promessas me surpreendem todos os dias.

Ao meu companheiro, melhor amigo e esposo **Caio Cavassan**, por todo amor, dedicação e companheirismo. Por sempre me motivar, incentivar e acalmar frente às dificuldades. Você foi meu farol nos dias tempestuosos e meu espelho pessoal e profissional. Estaremos sempre juntos.

Ao meu filho, **Francisco**, por ser meu principal combustível. Sua chegada me fortaleceu e me fez enxergar o mundo mais serenamente. Obrigada por dar sentido à tudo isso. Te amo intensamente e eternamente.

A minha mãe, **Maria Lucia**, por acreditar nos meus sonhos e acolher meus caminhos. Você é minha inspiração e meu orgulho. Obrigada por todos os esforços para que eu pudesse trilhar minha história. Sem você, nada teria sentido. Juntas até depois do fim!

A minha sogra, **Sirlene**, por todo amor e cuidado. Mesmo longe fisicamente, pude sempre me amparar em cada gesto de carinho e zelo.

Aos meus avós **Joaquim, Venina e Benedicta**, pelo exemplo de força e determinação. Me orgulho de ter vocês como avós. Obrigada vó **Benedicta**, por acreditar em mim, por cada oração e por todo cuidado, desde o mestrado. Você é especial.

Aos tios, **Solange e Evandro**, pelo acolhimento, apoio e por todos os conselhos cheios de amor e cuidado. A presença de vocês me trouxe tranquilidade.

Aos amigos, **Gabriel, Vanessa, Juliana, Ronaldo, Eduardo e Cristina**, que compreenderam minha ausência e me acolheram durante a jornada. A vida é maravilhosa ao lado de vocês. Que Deus possa sempre abençoar nossas vidas, para que desfrutemos momentos de alegria e tranquilidade juntos. Amo vocês.

A minha orientadora, **Lucilene Delazari**, pela oportunidade de crescimento e pelos conhecimentos compartilhados durante a execução das propostas deste estudo, que foram tão desafiadoras.

A Dra. **Luciana Abbade**, por toda ajuda, prontidão e ensinamentos ao longo de toda minha jornada acadêmica. Foi muito gratificante poder trilhar parte desse caminho ao seu lado, e absorver uma pequena parte de todo esse conhecimento que você tem a oferecer. Minha admiração pessoal e profissional por você são eternas.

Ao Dr. **Hélio Miot**, por todo suporte e incentivo. Realmente não tenho palavras para agradecer por toda ajuda e conhecimento oferecidos. Obrigada pela prontidão e

amizade. Obrigada por me impulsionar nos momentos de incerteza. Cada gesto e palavra me energizaram e ajudaram a construir a pessoa que sou hoje. Minha eterna admiração e gratidão.

Ao Dr. **Benedito Barraviera**, por todas as vezes que acreditou em mim e no meu potencial, e por cada palavra de incentivo.

Ao coordenador do PPGDT, **Carlos Magno**, pela dedicação e ajuda. Seus ensinamentos me ajudaram a olhar a ciência de uma forma mais real e aplicável. Agradeço pela oportunidade de aprender e dividir conhecimentos com você. Nunca esquecerei das suas aulas e palestras.

Aos meus colegas de laboratório, que foram muitos durante esse longo trajeto acadêmico, pela ajuda e por tornarem os dias cansativos mais leves e alegres. Sentirei saudades das nossas conversas e dos momentos felizes que partilhamos. Levarei cada um vívido na memória.

Aos colaboradores e funcionários do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos, pelo respeito, prontidão e amizade durante todos esses anos. Foi maravilhoso partilhar esse caminho rodeada de pessoas tão boas. Minha admiração e gratidão à vocês.

Às equipes das unidades de pesquisa clínica e pesquisa experimental, UPECLIN e UNIPLEX respectivamente, pelo suporte no armazenamento das amostras, e disponibilização de toda infraestrutura e equipamentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*"A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar
novas paisagens mas em ter novos olhares"
(Marcel Proust)*

Lista de Ilustrações

- Artigo 1 - Figura 1:** Diagrama (Volcano plot) das proteínas com expressão diferencial identificadas entre as UVCs obtido pela análise estatística multivariada. Complement C3 (P4) e ceruloplasmin (P17) apresentaram expressão diferencial para UVCs que tiveram redução da área (CoefT90 negativo) e Apo-A1 (P8) e HP1 (P24) para UVCs que não tiveram este desfecho (CoefT90 positivo).....38
- Artigo 1 - Figura 2:** (2A) Detecção representativa de CP (ceruloplasmin) e DEFA1 (α -defensina-1) por Western blot usando exsudatos de úlceras que não cicatrizaram (NH) e úlceras que cicatrizaram (H), conforme indicado. As setas indicam massas moleculares aparentes (kDa) para CP (144 Da), DEFA1 (7 e 5 Da) e GAPDH (34 Da), usada como controle interno. (2B) Análise densitométrica dos resultados de Western blot. A análise densitométrica do DEFA1 foi realizada usando a banda inferior. Os resultados são expressos como média \pm de experimentos realizados com amostras de 3-4 exsudatos / grupo.....39
- Artigo 1 - Figura 3:** Rede de interações entre as proteínas diferencialmente expressas do exsudato inflamatório das úlceras venosas crônicas que reduziram e que não reduziram as áreas observadas num período de 90 dias. Cada vértice/nó representa uma proteína e cada aresta representa uma interação entre as vértices. Os nós 718 e 335 representam as proteínas complement C3 (P4) e apolipoproteína-A1 (P8).....40
- Artigo 2 - Figura 1:** Diagrama de dispersão das proteínas que se expressaram diferentemente antes e após o tratamento com selante de fibrina.....74
- Artigo 2 - Figura 2:** Heatmap das correlações proteína-proteína (forte correlação estimada para valores $<-0,6$ e $>0,6$).....75
- Artigo 2 - Figura 3:** Diagrama Volcano Plot das proteínas que se expressaram diferentemente em úlceras venosas que apresentaram cicatrização (Rho negativo) e não apresentaram cicatrização (Rho positivo). Considerou-se correlação valores de rho $<-0,5$ ou $>0,5$76

Lista de Tabelas

Artigo 1 - Tabela 1: Área das 37 úlceras venosas crônicas de pacientes atendidos no Ambulatório de Úlceras Venosas da Faculdade de Medicina da UNESP, Botucatu, SP, Brasil, em 2015, as quais foram observadas num período de 90 dias.....	36
Artigo 1 - Tabela 2: Dados de 34 proteínas identificadas no exsudato das 37 úlceras venosas crônicas estudadas.....	37
Artigo 1 - Tabela 3: Proteínas diferencialmente expressas identificadas no exsudato inflamatório das 37 úlceras venosas crônicas tratadas no Ambulatório de Úlceras Crônicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, São Paulo – Brasil, em 2015.....	39
Artigo 2 - Tabela 1: Distribuição das variáveis clínicas e epidemiológicas dos 8 pacientes incluídos no estudo, antes do tratamento com selante de fibrina.....	69
Artigo 2 - Tabela 2: Distribuição das variáveis clínicas e epidemiológicas das 10 úlceras dos 8 pacientes no momento de admissão ao estudo.....	70
Artigo 2 - Tabela 3: Tempo máximo de seguimento em semanas e desfecho da cicatrização de cada UV estudada.....	71
Artigo 2 - Tabela 4: Identificação das 31 proteínas do exsudato inflamatório, das 10 úlceras venosas submetidas ao tratamento com selante de fibrina do CEVAP.....	72

Sumário

ARTIGO 1.....	01
RESUMO.....	03
ABSTRACT.....	04
INTRODUÇÃO.....	05
MATERIAL E MÉTODOS.....	06
População do estudo.....	06
Desenho do estudo.....	06
Análise da área da úlcera.....	07
Colheita e preparo do material.....	08
Quantificação de proteínas.....	08
Digestão de proteínas em solução.....	09
Análise de espectrometria de massas.....	09
Análise dos dados.....	10
<i>SDS-Page e Western blotting</i>	11
Obtenção da rede de interação e análise de enriquecimento.....	12
Análise estatística.....	12
RESULTADOS.....	14
DISCUSSÃO.....	16
CONCLUSÃO.....	23
DISPONIBILIDADE DE DADOS E MATERIAIS.....	23
CONFLITO DE INTERESSE.....	23
FINANCIAMENTO.....	24
AGRADECIMENTOS.....	24
REFERÊNCIAS.....	25
APÊNDICES.....	36
ARTIGO 2.....	43
RESUMO.....	44
ABSTRACT.....	45
INTRODUÇÃO.....	46
QUESTÃO DE PESQUISA.....	47
TIPO DE ESTUDO E MATERIAL E MÉTODOS.....	47
Tipo de estudo.....	47
População de estudo.....	48
Área da úlcera.....	49
Colheita de exsudato inflamatório.....	49
Antes do tratamento.....	49
Após o tratamento.....	50
Preparo, quantificação e digestão da amostra.....	50
Identificação por espectrometria de massas.....	50
Análise dos dados.....	51
Análise estatística.....	51
RESULTADOS.....	52
DISCUSSÃO.....	54

CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS.....	61
APÊNDICES.....	69

Artigo 1

Artigo original

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O AUMENTO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS
E O PROGNÓSTICO CICATRICIAL EM ÚLCERAS VENOSAS
CRÔNICAS**

**ASSOCIATION BETWEEN INCREASED EXPRESSION OF PROTEINS
AND THE HEALING PROGNOSIS IN CHRONIC VENOUS ULCERS**

Nayara Rodrigues Vieira Cavassan¹; Noemia Aparecida Partelli Mariani²,
Caio Cavassan Camargo¹; Ivan Wolf³; Benedito Barraviera^{1,4}; Rui Seabra
Ferreira Jr^{1,4}; Guilherme Targino Valente³; Erick José Ramos Silva³; Hélio
Amante Miot⁵; Luciana Patrícia Fernandes Abbade⁵; Lucilene Delazari dos
Santos^{1,2*}

1. Graduate Program in Tropical Diseases, Botucatu Medical School (FMB), Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil.
2. Department of Pharmacology, Instituto de Biociências de Botucatu (IBB), Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu, Sao Paulo, Brazil.
3. Bioprocess and Biotechnology Department, Faculty of Agricultural Sciences (FCA), Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu, Sao Paulo, Brazil.
4. Center for the Study of Venom and Venomous Animals (CEVAP), Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil.
5. Department of Dermatology and Radiology, Botucatu Medical School, Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil.

*** Autor Correspondente:**

Lucilene Delazari dos Santos

Avenida Universitária, 3780

18610-307 - Botucatu/São Paulo - Brazil

Phone/FAX: 55 (14) 3880-7108

E-mail: lucilenebio@gmail.com

Agência financiadora: FAPESP no. 2014/13299-7

Conflito de interesse: Não consta.

RESUMO

A pesquisa e a identificação de proteínas diferencialmente expressas no exsudato inflamatório das úlceras venosas crônicas (UVCs) podem auxiliar o profissional da saúde no prognóstico da cicatrização. Essa expressão pode estar relacionada à cura ou à falha terapêutica da lesão. Este estudo teve por objetivo identificar as proteínas expressas no exsudato inflamatório das UVCs e correlacioná-las com a remissão das feridas. Foram acompanhados 28 pacientes, com 37 UVCs, durante 90 dias com tratamento padrão. Os exsudatos inflamatórios foram colhidos antes do início do tratamento (T=0) e analisados pela estratégia *Shotgun label free*. Após 90 dias de tratamento houve redução da área em 25 (67,6%) úlceras. As análises de espectrometria de massas dos exsudatos inflamatórios identificaram o aumento nas expressões das proteínas *complement C3*, *apolipoprotein-A1*, *ceruloplasmin* e *neutrophil-defensin-1* relacionado à evolução da área da úlcera ao final do estudo. *Complement C3* e *ceruloplasmin* foram identificadas em todas as lesões analisadas e se relacionaram aos maiores índices de cicatrização. *Apolipoprotein-A1* e *neutrophil-defensin-1* se correlacionaram ao aumento da área da úlcera após 90 dias de estudo, estando presentes em 100% e 91% (34) das lesões estudadas, respectivamente. Há portanto, diferença de expressão de proteínas entre os exsudatos de úlceras venosas com melhor e pior prognóstico cicatricial. O aumento de expressão das proteínas *complement C3*, *ceruloplasmin*, *apolipoprotein-A1* e *neutrophil-defensin-1* frente à presença e ausência de cicatrização sugere que as mesmas são potenciais candidatas à marcadores prognósticos de cicatrização das úlceras venosas crônicas. Ensaio clínicos multicêntricos serão necessários para validar estes achados.

Palavras-chave: Úlcera venosa crônica, expressão de proteínas, exsudato inflamatório; espectrometria de massas; biomarcadores prognósticos.

ABSTRACT

The research and identification of proteins differentially expressed in the inflammatory exudate of chronic venous ulcers (UVCs) can assist the health professional in the prognosis of healing. This expression may be related to the cure or therapeutic failure of the lesion. This study aimed to identify the proteins expressed in the inflammatory exudate of UVCs and correlate them with wound remission. 28 patients were followed up with 37 UVCs for 90 days with standard treatment. Inflammatory exudates were collected before treatment started (T = 0) and analyzed using the Shotgun label free strategy. After 90 days of treatment, there was a reduction in the area in 25 (67.6%) ulcers. Mass spectrometry analyzes of inflammatory exudates identified an increase in the expressions of complement C3, apolipoprotein-A1, ceruloplasmin and neutrophil-defensin-1 related to the reduction of the ulcer area at the end of the study. Complement C3 and ceruloplasmin were identified in all lesions analyzed and were related to the highest healing rates. Apolipoprotein-A1 and neutrophil-defensin-1 correlated with an increase in the ulcer area after 90 days of study, being present in 100% and 91% (34) of the studied lesions, respectively. There is, therefore, a difference in protein expression between venous ulcer exudates with better and worse scar prognosis. The increased expression of complement C3 proteins, ceruloplasmin, apolipoprotein-A1 and neutrophil-defensin-1 in the presence and absence of healing suggests that they are potential candidates for prognostic markers of chronic venous ulcer healing. Multicenter clinical trials will be needed to validate these findings.

Keywords: Chronic venous ulcer, protein expression, inflammatory exudate; mass spectrometry; prognostic biomarkers.

INTRODUÇÃO

As UVCs são um dos principais problemas de saúde pública do mundo ocidental [1]. Estudos epidemiológicos realizados na última década evidenciaram a prevalência entre 34,5 e 150,8 milhões de pessoas acometidas [2,3-6]. As úlceras crônicas de perna são lesões duradouras, em geral acima de 6 semanas podendo durar mais de 20 anos, de recorrência frequente e relacionadas com complicações da insuficiência venosa nos membros inferiores [7,8].

O tratamento é prolongado, oneroso para os sistemas de saúde e tem impacto social importante pois contribuem para o afastamento do trabalho. [9-12]. Os pacientes evoluem para restrição da mobilidade, isolamento social e redução na qualidade de vida [13,14]. Esses aspectos acometem a saúde mental aumentando os distúrbios do sono [15], evoluindo para ansiedade e posterior depressão [16]. Os fatores prognósticos da cicatrização ainda não são claros, haja vista que algumas feridas apresentam cicatrização espontânea.

Neste contexto a abordagem investigativa dos fluídos corpóreos humanos pela da análise proteômica tem sido vista como uma importante ferramenta analítica para a descoberta de marcadores moleculares que podem auxiliar no diagnóstico e prognóstico em diversas doenças [17,18]. Assim, o exsudato inflamatório das UVCs é uma amostra biológica abundante, de fácil colheita e na maioria das vezes desprezada pelos profissionais da saúde. Este é uma mistura complexa de proteínas presente

na lesão, contendo fatores de crescimento, proteínas de matriz, proteinases e citocinas. As variações destes componentes no exsudato podem ser utilizadas como uma ferramenta para o entendimento dos eventos que modulam a cronicidade destas feridas [17,19-22].

O presente estudo teve por objetivos identificar potenciais proteínas diferencialmente expressas no exsudato inflamatório das UVCs, correlacionando-as com a evolução do processo cicatricial, a fim de diferenciar úlceras de fácil e de difícil cicatrização.

MATERIAL E MÉTODOS

População do Estudo

Por se tratar de um estudo de continuidade, utilizou-se os dados da população amostral de 37 úlceras de 28 pacientes já descrita em estudo prévio, realizado por Cavassan *et al.* [23]

Desenho do estudo

Este estudo foi observacional do tipo coorte analítico.

Os pacientes foram incluídos no estudo consecutivamente à sua ordem de chegada no serviço de atendimento, no período de março de 2014 à março de 2015. Todos os pacientes foram submetidos à questionário clinico-epidemiológico com questões relevantes à pesquisa e requeridos quanto ao conhecimento e aprovação do uso do material

biológico pela da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aprovado pelo Conselho de Ética em Pesquisa da Instituição (parecer nº 501.218/2013). Nenhum curativo ou terapia foi padronizado para este estudo, sendo o tratamento prescrito individualmente, de acordo com a indicação do dermatologista responsável. Entretanto os tratamentos orientados foram os padrões para UVCs, ou seja, curativos de acordo com a necessidade da ferida e terapia compressiva. Os participantes foram acompanhados por 90 dias.

Análise da Área da Úlcera

As análises das áreas de cada úlcera foram realizadas nos momentos $T=0$ e $T=90$. O desenho dos contornos de cada úlcera foi realizado em filme plástico transparente utilizando caneta hidrográfica, sendo em seguida, transferido para uma folha de papel em branco. Próximo ao desenho foi determinada uma escala de dois centímetros para criação de um referencial fotográfico. Posteriormente, foram capturadas imagens dos desenhos e referenciais de todas as úlceras, que, após serem transferidas para computador puderam ser analisadas individualmente no software ImageJ (Version 1.52) [24]. A partir do referencial conhecido, foi realizada a calibragem do software, para estimar a área de cada lesão, a partir da relação (pixels/cm). A área da úlcera em $T = 0$ (A_0), foi utilizada como referência para determinar a progressão da lesão em $T = 90$ (A_{90}) pela equação $\Delta A = A_{90} - A_0$. A diferença entre as áreas iniciais e finais de

cada úlcera foi denominada de redução da úlcera.

Colheita e Preparo do Material

A colheita dos exsudatos e a análise das áreas foram realizadas no momento do primeiro atendimento (T=0) e baseada no protocolo elaborado por Fernandez *et al.* [19]. Primeiramente a úlcera foi lavada com solução salina a 0,9% (m/v) de cloreto de sódio para limpeza, e seca com gaze estéril. Cada lesão foi então envolvida com curativo semi-oclusivo de poliuretano transparente (Tegaderm®; 3M Health Care, St. Paul, MN, USA) e o paciente foi mantido em repouso de 30 a 60 minutos a fim de aguardar a exsudação natural do tecido. O exsudato acumulado entre o leito da úlcera e o curativo foi colhido com micropipeta com ponteira estéril e transferido para tubos plásticos de 1,5 ml com tampa (LoBind -Eppendorf®), identificados e armazenados em caixa com gelo até a chegada no laboratório, onde foram centrifugados a 14.000g a 4°C durante 10 minutos para sedimentação de todos ou quaisquer debris celulares. O sobrenadante foi estocado a -80°C até o uso.

Quantificação de proteínas

As proteínas presentes no exsudato foram quantificadas em triplicata pelo método de Bradford [25], (BioRad®; Protein Assay, cod. 500-0001), tendo albumina bovina (BSA), como proteína padrão. Foi utilizado o valor da média de cada amostra para o cálculo de quantificação. Após esse

procedimento as amostras foram transferidas para tubos plásticos de 1,5 ml com tampa (LoBind -Eppendorf®) e diluídas com solução a 0,9% de NaCl (m/v) para serem padronizadas quanto a sua concentração, estabelecendo-se a relação 50 µg / 40 µL para cada amostra.

Digestão de proteínas em solução

As amostras foram digeridas em solução segundo a metodologia descrita por Cavassan *et al.* [23], iniciando-se pelas etapas de redução e alquilação das proteínas. A enzima tripsina (Promega, Sequencing Grade Modified Trypsin, Porcine lyophilized, V511A, Promega Corporation, Madison, USA) foi utilizada na proporção de 1:50 (enzima:substrato), solubilizada em tampão bicarbonato de amônio 50 mM, pH 7.8. A hidrólise ocorreu durante 18 horas, sendo interrompida com a adição de ácido fórmico a 1% (v/v) em relação ao volume da amostra. As amostras foram dessalinizadas utilizando-se colunas Sep-Pak Vac C18 (Waters) e em seguida reduzidas em SpeedVac™ (Thermo Scientific) e mantidas sob refrigeração à 4°C até a espectrometria de massas.

Análises de Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas foi realizada segundo a metodologia descrita previamente por Cavassan *et al.* [23]. As amostras foram solubilizadas em 60 µL de ácido fórmico 0,1 % (v/v) e em seguida, uma alíquota de 15 µL dos digestos trípticos de cada amostra foram injetados

individualmente em uma coluna analítica C18, 1,7 μ m BEH 130 (100 μ m x 100 mm) em um sistema de cromatografia líquida de fase reversa (RP-UPLC - NanoAcquity UPLC, Waters - Milford, EUA) acoplado à um equipamento de espectrometria de massas Q-Tof PREMIER (MicroMass/Waters-Milford, EUA) para análises em triplicata. O gradiente linear utilizado foi de 2 a 90% (v/v) de acetonitrila em ácido fórmico 0,1% (v/v) durante 60 minutos e fluxo de 600 nL/min. O instrumento foi operado em modo de ionização positiva e a aquisição contínua dos dados foram obtidas no intervalo de massas moleculares entre 100 a 2.000 m/z.

Análise dos dados

A identificação das proteínas a partir dos dados de espectrometria de massas (LC MS-MS), foi realizada no Mascot Distiller v.2.3.2.0 (Matrix Science, Boston - USA), utilizando bancos de dados públicos (NCBI, taxonomia Homo sapiens, 33.695.097 sequências, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=homo%20sapiens>). Foi utilizada tripsina como enzima proteolítica, carbamidometilação como modificação fixa (massa monoisotópica 57,0215Da), oxidação da metionina como modificação variável (massa monoisotópica 15,9949) e 0,1 Da de erro de tolerância para os dados de MS e MS/MS.

Os dados de MS/MS foram considerados válidos segundo o algoritmo estatístico da ferramenta MASCOT, com valores de identificação *Mascot Scores* superiores à 42 e pelo menos uma das sequências

peptídicas identificadas com valores de *Ion Score* maiores que 30. A contagem de espectros para todas as proteínas identificadas foi realizada pela ferramenta Scaffold Q+, sendo que, a taxa de FDR (*False Discovery Rate*) foi de 1% para proteínas e de 0,1% para peptídeos, com confiabilidade de 95%. A quantificação de proteínas *label free* foi realizada exigindo-se que, pelo menos, dois peptídeos estejam em comum nas amostras.

SDS-PAGE e Western blotting

Os experimentos foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Silva *et al.* [26]. As proteínas (50 µg) foram separadas por massa molecular em géis NuPAGE Bis-Tris 4-12% (m / v), a 200 V por 25 minutos. As proteínas foram transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) a 15 V por 1 h. A transferência foi confirmada por coloração com amido preto. As membranas foram incubadas em solução de bloqueio contendo 5% de leite (m / v) em tampão TBS-T (100 mM de Tris-HCl pH 8,0, 150 mM de NaCl e 0,05% de Tween 20, v / v) por 1,5 hora, e incubadas com anticorpo primário contra *ceruloplasmin* (Abcam, Ab110449; 0,3 µg / ml), *neutrophil-defensin-1* (Abcam, Ab122884; 2,0 µg / ml) ou *anti-GADPH* (Abcam, Ab9485; 2,0 µg / ml). Após três de lavagens de cinco minutos em tampão TBS-T, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários apropriados conjugados com peroxidase de rábano silvestre (Jackson Immuno Research, 711-035-152 e 805-035-180; 0,01 µg

/ ml). As bandas de proteínas foram detectadas usando o substrato de sensibilidade máxima SuperSignal™ West Femto (Thermo Fisher, 34095). Os controles negativos foram realizados na ausência de anticorpo primário. A densitometria foi realizada nas imagens resultantes usando o software ImageJ (Versão 1.52)

Obtenção da rede de interação e Análise de enriquecimento

Para o enriquecimento ontologias gênicas (GOs) [27] relacionadas com proteínas selecionadas foi aplicado o método SAFE [28]. Para isso, a rede de interações completa do banco de dados BioGRID [29] foi obtida pela interface do programa Cytoscape [30] limitando as interações para aquelas presentes na espécie *Homo sapiens*. Nesta rede cada vértice/nó representou uma proteína e cada aresta uma interação entre as vértices. Finalmente, a matriz de GOs foi construída com base em todas as informações de termos disponíveis para as proteínas humanas no banco de dados UNIPROT [31]. Ademais, para identificar possíveis relações entre as proteínas identificadas, as proteínas selecionadas e seus primeiros vizinhos foram extraídos da rede e unidos em um sub-rede no software Igraph [32] implementado no ambiente de análise estatístico R [33].

Análise Estatística

As contagens espectrais de cada amostra foram representadas a partir de média ponderada das triplicatas: $(3 * \text{mediana} + \text{mínimo} + \text{máximo}) / 5$,

com posterior exclusão de seus respectivos clusters. Proteínas identificadas em menos de 70% dos casos foram excluídas e para as demais, as quantificações que resultaram em valor zero sofreram imputação múltipla [34]. Valores outliers ($>1,5x$ o desvio interquartil) somado ao terceiro quartil ou subtraído do primeiro quartil) foram winsorizados [35]. Normalidade das amostras foi estimada pelo teste de Shapiro-Wilk [36].

As variáveis independentes foram representadas pelas proteínas identificadas e a variável dependente pela redução relativa da área das úlceras no T90 ($\Delta A = A_{90} - A_0$). Foi considerado como cicatrização qualquer valor negativo de redução do ΔA em T90.

A identificação das proteínas relacionadas com a redução de área foi realizada pela técnica de regressão de Projeção de Estruturas Latentes (PLS), com variáveis escalonadas. Os coeficientes de regressão dos dados escalonados foram comparados ao indicador Variáveis Importantes na projeção (VIP) pelo diagrama *Volcano plot*. Foram selecionadas proteínas que apresentavam $VIP > 1$ e coeficiente de regressão > 0.1 ou < -0.1 . Valores negativos do coeficiente de correlação foram associados com a cicatrização relativa das úlceras, e valores positivos do coeficiente de correlação foram associados com o aumento relativo da área durante 90 dias de estudo.

Os dados foram analisados nos softwares JMP 10 e SPSS 22. A fim de estabelecer um alto valor preditivo à questão analisada, foram consideradas como moléculas potencialmente prognósticas, aquelas

presentes em pelo menos 90% dos casos estudados.

RESULTADOS

Após o cálculo de diferença entre as áreas iniciais e finais das feridas (Tabela 1), foi possível observar que 25 (67,6%) lesões apresentaram redução no T = 90, ou seja, cicatrizaram. A média de redução foi de 8,3 cm² (\pm 6,3), calculada pela soma dos valores de redução das lesões que cicatrizaram, divididas pelo total de lesões de cicatrizaram.

Assim como no nosso estudo anterior [23], 76 proteínas foram identificadas no exsudato das úlceras venosas, porém após exclusão dos *clusters* e das moléculas cujos valores de contagem espectral apresentaram valores zerados maiores que 30% das identificações totais, foram admitidas aos testes estatísticos 34 proteínas. Os dados de identificação encontram-se dispostos na Tabela 2.

A partir destes dados, a correlação dos coeficientes da PLS das 37 úlceras escalonadas e dos valores de VIP indicou quatro proteínas relacionadas à redução das áreas das UVCs (Figura 1). A análise multivariada evidenciou que as proteínas P4, P8, P17 e P24, identificadas como *complement C3*, *apolipoprotein-A1*, *ceruloplasmin* e *neutrophil-defensin-1* respectivamente, apresentaram um aumento de expressão quando comparadas as demais encontradas nos exsudatos das UVCs com alguma ou nenhuma progressão da cicatrização (Tabela 3).

As proteínas *complement C3* e *ceruloplasmin* foram identificadas em

todas as lesões analisadas e aumentaram suas expressões em lesões que apresentaram diminuição de sua área inicial ao final do estudo. As proteínas *apolipoprotein-A1* e *neutrophil-defensin-1* apresentaram maior expressão em úlceras que não cicatrizaram ou aumentaram sua área inicial ao longo dos 90 dias, estando presentes em 100% e 91% (34/37) das úlceras estudadas, respectivamente. Os dados de identificação dessas proteínas encontram-se dispostos na Tabela 2.

A análise de *Western blotting* corroborou um aumento na expressão de *ceruloplasmin* em úlceras com progressão cicatricial e de *neutrophil-defensin-1* em exsudatos de úlceras que não apresentaram redução da área inicial. Experimentos de *Western blotting* confirmaram a presença de *ceruloplasmin* como uma marcação com massa molecular aparente de 144 kDa nos exsudatos de úlceras que cicatrizaram e não cicatrizaram (Figura 2A). Da mesma forma, a expressão de *neutrophil-defensin-1* também foi detectada em todos os exsudatos, mas como uma marcação dupla com massas moleculares aparentes de 7 e 5 kDa, que provavelmente representam suas isoformas secretadas (Figura 2A). Não foram detectadas marcações em experimentos realizados na ausência de anticorpos primários (dados não apresentados).

A abundância das marcações correspondentes a *ceruloplasmin* e *neutrophil-defensin-1* foi afetada diferencialmente quando comparados exsudatos de úlceras com e sem progressão da cicatrização pela análise densitométrica. Observamos um aumento de ~ 2,2 vezes e uma diminuição

de ~ 0,4 vezes na abundância de *ceruloplasmin* e *neutrophil-defensin-1* nos exsudatos das úlceras que cicatrizaram em comparação às úlceras que não cicatrizaram, respectivamente (Figura 2B).

A rede de interações proteína-proteína das proteínas diferencialmente expressas no exsudato inflamatório das úlceras venosas foi proposta a fim de melhor compreender a correlação existente entre estes candidatos a marcadores prognósticos (Figura 3) no que se refere a cicatrização e a área inicial ao longo dos 90 dias que foram avaliadas.

DISCUSSÃO

As feridas crônicas têm elevado impacto financeiro sobre os sistemas de saúde do mundo ocidental e, principalmente, no comprometimento da qualidade de vida e afastamento do trabalho dos pacientes acometidos [1]. Embora as UVCs representem um desafio clínico significativo, países australianos e nações desenvolvidas priorizaram investimentos em pesquisa e desenvolvimento, ao invés de aumentar o número de leitos hospitalares para o tratamento dos pacientes [37].

A análise proteômica do exsudato de úlceras de perna tem sido indicada como uma das principais abordagens exploratórias, sugerindo proteínas como potenciais biomarcadores da cicatrização das lesões [1,38,39]. Em 2017, Broszczak *et al.*, [1] indicaram que análises espaço-temporal das feridas, juntamente com a integração de conjuntos de dados múltiplos ômicos, podiam fornecer informações sobre as principais

moléculas candidatas que conduzem à cronicidade da ferida.

De forma pioneira, nosso grupo deu o primeiro passo ao identificar setenta e seis proteínas do exsudato inflamatório de pacientes com UVCs classificando-as de acordo com seu papel primário no processo de cicatrização. Assim, pudemos correlacionar dados clínicos e epidemiológicos com expressão das proteínas [23]. A partir dessas observações, o presente estudo nos permitiu indicar que o aumento da expressão das proteínas *complement C3* e *ceruloplasmin*, pode estar correlacionado ao bom prognóstico cicatricial, enquanto que o aumento da expressão de *apolipoprotein-A1* e *neutrophil-defensin-1*, demonstram ser importantes marcadores de cicatrização prejudicada a serem estudados.

É sabido que a proteína *complement C3* é uma das moléculas que compõe o sistema complemento, sendo a principal moduladora da resposta inflamatória quando ocorre dano tecidual. Atua ativando o sistema imune inato e está envolvida no processo de reconhecimento e depuração de patógenos [40-43]. A ativação do sistema complemento se dá pela hidrólise da proteína *complement C3*, liberando os fragmentos C3a e C3b. Por sua vez, estes fragmentos são depositados nas membranas das células danificadas, desencadeando uma cascata de eventos tais como a opsonização e a formação do complexo de ataque, responsáveis por induzir a inflamação e, posteriormente, a eliminação das células lesadas. Disfunções na cicatrização podem ocorrer quando há o aumento desordenado dos fragmentos de C3 no sítio da lesão, induzindo

mecanismos autoimunes, cronicidade e dano tecidual [40,41]. A resposta no microambiente das UVCs, induz uma série de reações enzimáticas, podendo culminar em uma resposta inflamatória normal ou em inflamação tissular insatisfatória e incontrolada [44].

Uma resposta inflamatória favorável resulta na progressão tecidual para as fases de granulação e remodelamento das feridas. Alguns estudos sugerem que há um aumento da proteína *complemente C3* e seus produtos, elevam a atividade proteolítica no microambiente das UVCs gerando a degradação de compostos do sistema complemento e impedindo a cicatrização da lesão pela estagnação na fase inflamatória [45-47].

Entretanto, muitos estudos evidenciam que as UVCs estão suscetíveis à ação de uma ampla variedade de agentes bacterianos, uma vez que compreendem o rompimento da primeira linha de defesa do sistema imune inato, com a quebra da barreira física da pele [48-51]. A presença de microrganismos ativa o sistema complemento pela interação com vias alternativas e da proteína lectina. A identificação e a opsonização dos agentes infecciosos são dependentes da ligação da proteína lectina com a manose (MBL) [52-54]. Uma deficiência dos níveis séricos de MBL em pacientes com UVCs culminam na incapacidade da ativação do sistema complemento, facilitando a instalação de infecções [55,56]. Sendo assim, o aumento da expressão da proteína *complement C3* no microambiente da lesão, deriva da ativação do sistema de defesa contra agentes infecciosos, bem como, sugere a instalação do processo inflamatório na região. A super

expressão desta proteína pode estar relacionada com a rapidez e eficácia na formação do complexo de ataque aos antígenos, quanto ao equilíbrio dos níveis séricos de MBL, com consequente diminuição da carga bacteriana local, restauração tecidual e progressão favorável do processo cicatricial.

Já a proteína *ceruloplasmin* é a principal proteína carreadora do cobre plasmático. Esta se liga às células do sistema imune, apresenta atividade enzimática e anti-inflamatória e tem sua expressão aumentada em resposta à hipóxia, desencadeando o aumento de trombina e citocinas pro-inflamatórias no sangue [57-62]. A super expressão no microambiente da lesão pode beneficiar a cicatrização pela sua capacidade de ligação com a proteína *lactoferrin*, favorecendo o sequestro de Fe³⁺ do fluido inflamatório, essencial para o crescimento bacteriano. Desta forma, a diminuição ou a ausência do íon ferro na ferida oferece proteção frente a ação de bactérias patogênicas, além de inibir a produção da enzima mieloperoxidase com consequente redução do estresse oxidativo [63-65].

Kostevich e *et al.*, [66] sugerem que o aumento da ação proteolítica e oxidativa durante um quadro inflamatório possam resultar em transformações estruturais da *ceruloplasmin*, aumentando sua interação com moléculas, entre elas o fator de inibição de macrófagos (MIF), favorecendo uma atividade pró-inflamatória nos tecidos. O mesmo foi observado por Popescu *et al.* [67] ao descreverem uma associação positiva entre estresse oxidativo, resistência à insulina e inflamação e os níveis

aumentados de *ceruloplasmin* em crianças obesas. Embora a *ceruloplasmin* pareça desempenhar papel pró e anti-inflamatório, novas investigações devem ser realizadas para elucidar sua função em quadros inflamatórios [68]. Assim, a presença da atividade proteolítica e oxidativa no sítio da lesão, parece estar associada com integridade estrutural da proteína *ceruloplasmin*, denotando o efeito benéfico da expressão diferencial desta molécula na cicatrização de UVCs.

As úlceras de perna são colonizadas por bactérias e fungos. Estes microrganismos comprometem a cicatrização pela produção de toxinas e de biofilme, criando uma barreira físico-química contra o sistema imune do hospedeiro [69,70]. Neste contexto, algumas proteínas encontradas neste estudo parecem desempenhar atividade antimicrobiana contra uma variedade de microrganismos. A proteína *neutrophil-defensin-1* é uma molécula da família das defensinas estocada nos grânulos dos neutrófilos, a qual tem como função aumentar a permeabilidade das células bacterianas. Todavia, esse fator de permeabilidade não é específico aos patógenos. A ocorrência de uma estimulação contínua e desregulada de neutrófilos no sítio da ferida, leva ao aumento de *neutrophil-defensin-1*, e posterior degradação dos fatores de crescimento tissular, com consequentemente dificuldade de regeneração da ferida [71].

Lundqvist *et al.*, [72] corroboram nossos achados, indicando que o aumento na expressão de *neutrophil-defensin-1* no exsudato e no tecido das UVCs ocorre em resposta aos agentes infecciosos. Esta proteína pode

exercer efeitos pró-inflamatórios e citotóxicos contribuindo para a elevação da inflamação - uma característica das UVCs que não cicatrizam. Além disso, Cardot-Martin *et al.*, [73] demonstraram que as defensinas produzidas pelos neutrófilos, neutralizam citotoxinas bacterianas produzidas por *Staphylococcus aureus*, comuns em UVCs.

Já as proteínas apolipoproteínas dos tipos A1 e A2 (APOA1 e APOAII) formam o composto HDL (*high density lipoprotein*), ao se ligarem aos lipídios. Acredita-se que quando livres da ligação com HDL, se unam às partículas livres de compostos VLDL (*very low density lipoprotein*), tidos como “colesteróis ruins”, realizando assim, seu transporte reverso e, desempenhando uma função protetora contra aterosclerose [74]. Li *et al.*, [75] demonstraram que há um aumento de casos de aterosclerose a medida que ocorre o envelhecimento da população, sugerindo que, o aumento de aterosclerose na população idosa pode estar relacionado à diminuição nos níveis de apolipoproteínas em carrear os compostos VLDL plasmáticos induzindo assim, uma maior deposição dos mesmos nas paredes das veias e artérias dos membros inferiores, com diminuição ou oclusão da luz, resultando em processos que levem à ulceração tecidual [76].

Conhecido por neutralizar os produtos liberados pelas bactérias Gram-positivas (ácido lipotecóico) e Gram-negativas (lipopolissacarídeo), o HDL participa da neutralização de processos inflamatórios mediados por macrófagos e da prevenção da penetração celular por bactérias [77]. Assim, o aumento da expressão de *APO-A1* nas UVCs poderia ser uma tentativa

do organismo em conter altos níveis de colonização e infecção, muito presentes neste tipo de lesão e que diminuem o potencial de cicatrização das mesmas. Baixos níveis de apolipoproteínas séricas foram descritos como indicativos de mau prognóstico na sepse, por formarem poucos complexos do HDL com lipopolissacarídeos neutralizantes da parede celular bacteriana, atuando de forma reduzida no combate e neutralização de agentes infecciosos, pela diminuição da produção do fator de necrose tumoral e interleucinas, possibilitando uma evolução desfavorável da infecção [77].

Em contrapartida, níveis mais elevados de apolipoprotein-A1 têm sido descritos como benéficos na cicatrização pela capacidade moduladora dos níveis de pentraxin-3, uma proteína de fase aguda, que promove o reparo eficiente de tecidos, atua na regulação de mecanismos inflamatórios e reconhece padrões moleculares associados a patógenos em vírus, bactérias e fungos [78]

Os diferentes tratamentos utilizados durante o período de estudo pareceram não exercer influência direta sobre a expressão de proteínas, uma vez que, há aumento de expressão de ceruloplasmin e complement C3 em lesões que cicatrizaram e de apolipoprotein-A1 e neutrophil-defensin-1 em lesões que não cicatrizaram, independe do tratamento adotado. Sendo assim, os autores acreditam que essas proteínas são potenciais biomarcadoras de progressão cicatricial em UVCs.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados observados e pela compreensão dos papéis biológicos e moleculares, sugere-se que há o aumento de expressão de diferentes proteínas entre UVCs com evolução cicatricial satisfatória e inexistente. As proteínas *complement C3* e *ceruloplasmin* podem indicar um melhor prognóstico das lesões, enquanto que, as moléculas *apolipoprotein-A1* e *neutrophil-defensin-1* podem apresentar maiores concentrações em lesões de alta cronicidade e cicatrização prejudicada.

Ensaio clínico multicêntrico será necessário para validar estes achados.

DISPONIBILIDADE DE DADOS E MATERIAIS

Os dados espectrais de LC-MS / MS foram carregados no Repositório Atlas de Peptídeos do Institute for System Biology (<http://www.peptideatlas.org/>) com o identificador PASS01190.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não ter conflito de interesse.

FINANCIAMENTO

Este estudo foi financiado pela agência FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) Proc. 2014 / 13299-7 e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico) Proc. 458919 / 2014-4.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos especiais também são estendidos ao Centro de Estudo de Venenos e Animais Venenosos (CEVAP) da Universidade do Estado de São Paulo (UNESP), à Unidade de Pesquisa Experimental (Unidade de Pesquisa Experimental - UNIPEx) e ao ambulatório de Úlceras Crônicas da o Serviço de Dermatologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) por disponibilizar todos os recursos e equipamentos que contribuíram para este trabalho. Agradecemos ao Laboratório de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Biociências, CNPEM, Campinas, SP, Brasil, pelo apoio à análise espectrométrica de massas.

REFERÊNCIAS

- [1] Broszczak DA, Sydes ER, Wallace D, Parker TJ Molecular Aspects of Wound Healing and the Rise of Venous Leg Ulceration: Omics Approaches to Enhance Knowledge and Aid Diagnostic Discovery. *Clin Biochem Rev.* 2017;38(1):35-55
- [2] Sen CK, Gordillo GM, Roy S, Kirsner R, Lambert L, Hunt TK, et al. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair Regen* 2009;17:763-71.
- [3] Graves N, Zheng H. The prevalence and incidence of chronic wounds: a literature review. *Wound Pract Res* 2014;22:4-12,14-19.
- [4] Rahman GA, Adigun IA, Fadeyi A. Epidemiology, etiology, and treatment of chronic leg ulcer: experience with sixty patients. *Ann Afr Med* 2010;9:1-4.
- [5] Gupta N, Gupta SK, Shukla VK, Singh SP. An Indian community-based epidemiological study of wounds. *J Wound Care* 2004;13:323-5.
- [6] Posnett J, Gottrup F, Lundgren H, Saal G. The resource impact of wounds on health-care providers in Europe. *J Wound Care* 2009;18:154-61.
- [7] Fonder MA, Lazarus GS, Cowan DA, Aronson-Cook B, Kohli AR, Mamelak AJ. Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. *J Am Acad Dermatol.* 2008 Feb;58(2):185-206.
- [8] Frade MAC, Cursi IB, Andrade FF, Soares SC, Ribeiro WS, Santos SV, Foss NT. Úlcera de perna: um estudo de casos em Juiz de Fora-MG (Brasil) e região. *An Bras Dermatol.* 2005; 80(1):41-6.

- [9] Jurd, A. Expenditure on Healthcare in the UK, 1997- 2010. Office for National Statistics. United Kingdom Crown copyright 2012.
- [10] Markova A, Mostow EN. US skin disease assessment: ulcer and wound care. (ix.) *Dermatol Clin* 2012;30:107- 11,ix
- [11] Posnett J, Franks PJ. The burden of chronic wounds in the UK. *Nurs Times* 2008;104:44-5
- [12] Ebbeskog B, Ekman SL. Elderly persons experiences of living with venous leg ulcer: living in a dialectal relationship between freedom and imprisonment. *Scand J Caring Sci* 2001;15:235-43.
- [13] Persoon A, Heinen MM, van der Vleuten CJ, de Rooij MJ, van de Kerkhof PC, van Achterberg T. Leg ulcers: a review of their impact on daily life. *J Clin Nurs* 2004;13:341-54.
- [14] Jones J, Barr W, Robinson J, Carlisle C. Depression in patients with chronic venous ulceration. *Br J Nurs* 2006;15:S17-23.
- [15] Hareendran A, Bradbury A, Budd J, Geroulakos G, Hobbs R, Kenkre J, et al. Measuring the impact of venous leg ulcers on quality of life. *J Wound Care* 2005;14:53-7.
- [16] Phillips T, Stanton B, Provan A, Lew R. A study of the impact of leg ulcers on quality of life: financial, social, and psychologic implications. *J Am Acad Dermatol* 1994;31:49-53.
- [17] Escalante T, Rucavado A, Pinto AFM, Terra RMS, Gutiérrez JM, Fox JW. Wound Exudate as a Proteomic Window to Reveal Different Mechanisms of Tissue Damage by Snake Venom Toxins. *Journal of*

Proteome Research 2009, 8, 5120–5131.

[18] Hu S, Loo JA, Wong DT. Human body fluid proteome analysis. *Proteomics*. 2006 Dec; 6(23):6326-53

[19] Fernandez ML, Broadbent JA, Shooter GK, Malda J, Upton Z. Development of an enhanced proteomic method to detect prognostic and diagnostic markers of healing in chronic wound fluid. *Br. J. Dermatol.* 2008;158(2):281– 290.

[20] Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008 May 15; 453(7193):314-21

[21] Zillmer R, Trøstrup H, Karlsmark T, Ifversen P, Agren MS. Duration of wound fluid secretion from chronic venous leg ulcers is critical for interleukin-1 α , interleukin-1 β , interleukin-8 levels and fibroblast activation. *Arch Dermatol Res*. 2011 Oct; 303(8):601-6.

[22] Wyffels JT, Fries KM, Randall JS, Ha DS, Lodwig CA, Brogan MS, Shero M, Edsberg LE. Analysis of pressure ulcer wound fluid using two-dimensional electrophoresis. *Int Wound J*. 2010 Aug; 7(4):236-48.

[23] Cavassan NRV, Camargo CC, Pontes LG, Barraviera B, Ferreira Jr RS, Miot HÁ, Abbade LPF, Santos LD. Correlation between chronic venous ulcer exudate proteins and clinical profile: A cross-sectional study. *Journal of Proteomics* 2019;192:280-90. doi: 10.1016/j.jprot.2018.09.009

[24] Miot HA, Mendacolli TJ, Costa SV, et al. Chronic ulcers of the lower limbs: area evaluation by digital photography. *Rev Assoc Med Bras*. 2009; 55:145-8.

[25] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-54

[26] Silva EJR, Queiróz DB, Honda L, Avellar MC. Glucocorticoid receptor in the rat epididymis: expression, cellular distribution and regulation by steroid hormones. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 325, n. 1–2, p. 64–77, 2010.

[27] Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler, H.; Cherry, J. M.; Davis, A P.; Dolinski, K.; Dwight, S. S.; Eppig, J. T.; Harris, M. A; Hill, D. P.; Issel-Tarver, L.; Kasarskis, A; Lewis, S.; Matese, J. C.; Richardson, J. E.; Ringwald, M.; Rubin, G. M.; Sherlock, G. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature genetics*, v. 25, n. 1, p. 25–29, 2000.

[28] Baryshnikova A. Systematic Functional Annotation and Visualization of Biological Networks. *Cell Systems*, v. 2, n. 6, p. 412–421, jun. 2016.

[29] Chatr-Aryamontri, A.; Breitkreutz, B.-J.; Oughtred, R.; Boucher, L.; Heinicke, S.; Chen, D.; Stark, C.; Breitkreutz, A.; Kolas, N.; O'donnell, L.; Reguly, T.; Nixon, J.; Ramage, L.; Winter, A.; Sellam, A.; Chang, C.; Hirschman, J.; Theesfeld, C.; Rust, J.; Livstone, M. S.; Dolinski, K.; Tyers, M. The BioGRID interaction database: 2015 update. *Nucleic acids research*, v. 43, n. Database issue, p. D470-8, jan. 2015.

[30] Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N. S.; Wang, J. T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. Cytoscape: a software environment

for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*, v. 13, n. 11, p. 2498–504, 1 nov. 2003.

[31] Wasmuth, E. V; Lima, C. D. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, v. 45, n. November 2016, p. 1–12, 2016.

[32] Csardi G, Nepusz T. The igraph software package for complex network research. *InterJournal*, v. Complex Sy, p. 1695, 2006.

[33] R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2015. . Disponível em: <<http://www.r-project.org>>.

[34] Royston P. Multiple imputation of missing values. *Stata journal* 4.3. 2004; 227-41.

[35] Ghosh D, Vogt A. Outliers: An evaluation of methodologies. In: *Joint Statistical Meetings*. San Diego, CA: American Statistical Association, 2012. p. 3455-3460.

[36] Shapiro SS, Martin BW, Hwei JC. A comparative study of various tests for normality. *Journal of the American Statistical Association* 63.324 .1968; 63 (324) 1343-1372.

[37] Cowman S, Gethin G, Clarke E, Moore Z, Craig G, Jordan-OBrien J, et al. An international eDelphi study identifying the research and education priorities in wound management and tissue repair. *J Clin Nurs* 2012;21:344-53.

[38] Broadbent J, Walsh T, Upton Z. Proteomics in chronic wound research:

potentials in healing and health.. *Proteomics Clin Appl.* 2010;4(2):204-14.
doi: 10.1002/prca.200900152.

[39] Mannello F, Ligi D, Canale M, Raffetto JD. Omics profiles in chronic venous ulcer wound fluid: innovative applications for translational medicine. *Expert Rev Mol Diagn.* 2014;14(6):737-62. doi: 10.1586/14737159.2014.927312

[40] Lambris JD, Ricklin D, Geisbrecht BV. Complement evasion by human pathogens. *Nat Rev Microbiol* 2008;6:132–42.

[41] Cazander G, Jukema GN, Nibbering PH. Complement activation and inhibition in wound healing. *Clin Dev Immunol.* 2012; 2012.

[42] Mastellos DC, Ricklin D, Hajishengallis E, et al. Complement therapeutics in inflammatory diseases: promising drug candidates for C3-targeted intervention. *Mol Oral Microbiol.* 2016; 31:3-17.

[43] Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med.* 2001;344(14):1058–66.

[44] Amara U, Rittirsch D, Flierl M, et al. Interaction between the coagulation and complement system. *Adv Exp Med Biol.* 2008; 632:71-9.

[45] Schmidtchen A. Degradation of antiproteinases, complement and fibronectin in chronic leg ulcers. *Acta Derm Venereol.* 2000 May;80(3):179-84.

[46] Farkas P, Csuka D, Mikes B, Sinkovits G, Réti M, Németh E, Rácz K, Madách K, Gergely M, Demeter J, Prohászka Z. Complement activation, inflammation and relative ADAMTS13 deficiency in

secondary thromboticmicroangiopathies. *Immunobiology*. 2016 Oct 18. pii: S0171-2985(16)30422-3.

[47] Moor AN, Vachon DJ, Gould LJ. Proteolytic activity in wound fluids and tissues derived from chronic venous leg ulcers. *Wound Repair Regen*. 2009 Nov-Dec;17(6):832-9.

[48] Howell-Jones RS, Wilson MJ, Hill KE, Howard AJ, Price PE, Thomas DW. A review of the microbiology, antibiotic usage and resistance in chronic skin wounds. *J Antimicrob Chemother* 2005;55:143–9.

[49] Pugliese DJ. Infection in Venous Leg Ulcers: Considerations for Optimal Management in the Elderly. *Drugs Aging*. 2016 Feb;33(2):87-96.

[50] Rahim K, Saleha S, Zhu X, Huo L, Basit A, Franco OL. Bacterial Contribution in Chronicity of Wounds. *Microb Ecol*. 2016 Oct 14.

[51] Renner R, Sticherling M, Ruger R, Simon J. Persistence of bacteria like *Pseudomonas aeruginosa* in non-healing venous ulcers. *Eur J Dermatol*. 2012 Nov-Dec;22(6):751-7.

[52] Thiel S, Vorup-Jensen T, Stover CM, Schwaeble W, Laursen SB, Poulsen K, et al. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature* 1997;386:506–10.

[53] Jacobsen JN, Andersen AS, Sonnested MK, Laursen I, Jorgensen B, Krogfelt KA. Investigating the humoral immune response in chronic venous leg ulcer patients colonised with *Pseudomonas aeruginosa*. *Int Wound J*. 2011 Feb;8(1):33-43.

[54] Lewkowicz N, Lewkowicz P, Kurnatowska A, Banasik M, Glowacka

E, Cedzyński M, Swierzko A, Lauk-Puchala B, Tchórzewski H. Innate immune system is implicated in recurrent aphthous ulcer pathogenesis. *J Oral Pathol Med.* 2003 Sep;32(8):475-81.

[55] Bitsch M, Laursen I, Engel AM, Christiansen M, Larsen SO, Iversen L, et al. Epidemiology of chronic wound patients and relation to serum levels of mannan-binding lectin. *Acta Derm Venereol* 2009;89:607–11.

[56] Dommett RM, Klein N, Turner MW. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. *Tissue Antigens* 2006;68:193–209.

[57] Marques L, Auriac A, Willemetz A et al (2012) Immune cells and hepatocytes express glycosylphosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin at their cell surface. *Blood Cells Mol Dis* 48(2):110–120

[58] Mukhopadhyay CK, Mazumder B, Fox PL (2000) Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency. *J Biol Chem* 275:21048–21054

[59] Yang S, Hua Y, Nakamura T et al (2006) Up-regulation of brain ceruloplasmin in thrombin preconditioning. *Acta Neurochir Suppl* 96:203–206

[60] Mazumder B, Mukhopadhyay CK, Prok A et al (1997) Induction of ceruloplasmin synthesis by IFN-gamma in human monocytic cells. *J Immunol* 159:1938–1944

[61] Sokolov AV, Zakharova ET, Kostevich VA, Samygina VR, Vasilyev VB Lactoferrin, myeloperoxidase, and ceruloplasmin: complementary gearwheels cranking physiological and pathological processes.

Biometals. 2014 Oct;27(5):815-28. doi: 10.1007/s10534-014-9755-2. Epub 2014 Jun 26.

[62] Gitlin JD (1988) Transcriptional regulation of ceruloplasmin gene expression during inflammation. *J Biol Chem* 263:6281–6287

[63] Sokolov AV, Pulina MO, Zakharova ET et al (2005a) Effect of lactoferrin on the ferroxidase activity of ceruloplasmin. *Biochem (Mosc)* 70:1015–1019

[64] Tenovuo J. Clinical applications of antimicrobial host proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in xerostomia: efficacy and safety. *Oral Dis.* 2002 8:23–29

[65] Chapman AL, Mocatta TJ, Shiva S, Seidel A, Chen B, Khalilova I, Paumann-Page ME, Jameson GN, Winterbourn CC, Kettle AJ. Ceruloplasmin is an endogenous inhibitor of myeloperoxidase. *J Biol Chem.* 2013 Mar 1;288(9):6465-77.

[66] Kostevich VA, Sokolov AV, Grudinina NA, Zakharova ET, Samygina VR, Vasilyev VB. Interaction of macrophage migration inhibitory factor with ceruloplasmin: role of labile copper ions. *Biometals.* 2015 Oct;28(5):817-26.

[67] Popescu LA, Virgolici B, Timnea O, Virgolici H, Oraseanu D, Zagrean L. The Relations Between Immunity, Oxidative Stress and Inflammation Markers, in Childhood Obesity. *Free Radic Biol Med.* 2014 Oct;75 Suppl 1:S44-5.

[68] Pinheiro Volp AC, Santos Silva FC, Bressan J. Hepatic inflammatory biomarkers and its link with obesity and chronic diseases. *Nutr Hosp.* 2015

May 1;31(5):1947-56.

[69] Wolcott R. Disrupting the biofilm matrix improves wound healing outcomes. *J Wound Care*. 2015; 24:366-71.

[70] Percival SL, Suleman L. Slough and biofilm: removal of barriers to wound healing by desloughing. *J Wound Care*. 2015; 24:498-510.

[71] Wilgus TA, Roy S, McDaniel JC. Neutrophils and wound repair: positive actions and negative reactions. *Adv Wound Care*. 2013; 2:379-88.

[72] Lundqvist K, Sørensen OE, Schmidtchen A. Increased levels of human neutrophil alpha-defensins in chronic venous leg ulcers. *J Dermatol Sci*. 2008 Aug;51(2):131-4.

[73] Cardot-Martin E, Casalegno JS, Badiou C, Dauwalder O, Keller D, Prévost G, Rieg S, Kern WV, Cuerq C, Etienne J, Vandenesch F, Lina G, Dumitrescu O. α -Defensins partially protect human neutrophils against Panton-Valentine leukocidin produced by *Staphylococcus aureus*. *Lett Appl Microbiol*. 2015 Aug;61(2):158-64.

[74] Rohatgi A, Khera A, Berry JD, et al. HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2014; 371: 2383-93.

[75] Li J, Jiang L, Liu Q. Protective effect of apolipoprotein AI, AII, CI and CII on endothelial cells injury induced by low density lipoprotein. *Chin. Med. J. (Engl.)*. 1998 Jan; 111 (1):78-81.

[76] Rothschild C. Anticorpos antifosfolípidos e aterosclerose em pacientes com trombose venosa e/ou arterial. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2007; 29:201-2.

- [77] Morin EE, Guo L, Schwendeman A, et al. HDL in sepsis – risk factor and therapeutic approach. *Front Pharmacol*. 2015 Oct 23.
- [78] Bottazzi B, Doni A, Garlanda C, Mantovani A. An integrated view of humoral innate immunity: Pentraxins as a paradigm. *Annu. Rev. Immunol*. 2010;28:157–183.
- [79] Norata GD., Marchesi P, Pirillo A, Uboldi P, Chiesa G, Maina V, Garlanda C, Mantovani A, Catapano AL. Long pentraxin 3, a key component of innate immunity, is modulated by high-density lipoproteins in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2008;28:925–931.
- [80] Hamilton KK, Zhao J, Sims PJ. Interaction between apolipoproteins A-I and A-II and the membrane attack complex of complement. Affinity of the apoproteins for polymeric C9. *J. Biol. Chem*. 1993;268:3632–3638.
- [81] Georgila K, Vyrla D, Drakos E. Apolipoprotein A-I (ApoA-I), Immunity, Inflammation and Cancer. *Cancers (Basel)*. 2019 Aug 1;11(8).

ANEXOS E APÊNDICES

APÊNDICES – GRÁFICOS, TABELAS E FIGURAS

Tabela 1: Área das 37 úlceras venosas crônicas de pacientes atendidos no Ambulatório de Úlceras Venosas da Faculdade de Medicina da UNESP, Botucatu, SP, Brasil, em 2015, as quais foram observadas num período de 90 dias.

Úlceras	Pacientes	Área T0 (cm ²) ^a	Área T= 90 (cm ²) ^b	Redução da úlcera ^(b-a) cm ²
1	ACB	20,768	5,898	-14,87*
2	JRP	37,709	37,266	-0,443*
3	TFCO	26,255	15,385	-10,87*
4	SAA	43,768	19,285	-24,483*
5	AT	19,439	15,938	-3,501*
6	AT	16,021	7,757	-8,264*
7	AT	8,467	10,166	1,699†
8	CCO	23,692	9,311	-14,381*
9	AZM	15,753	12,971	-2,782*
10	AZM	3,659	2,647	-1,012*
11	TFFG	15,109	7,995	-7,114*
12	MLTM	50,742	29,11	-21,632*
13	MLBG	10,575	25	14,729†
14	AS	2,339	13	10,663†
15	AS	11,26	29	17,992†
16	JZG	14,607	4	-11,103*
17	JZG	12,416	7	-5,612*
18	SLS	15,561	32,855	17,294†
19	JMA	18,3	10	-8,025*
20	EAR	16,854	27,275	10,421†
21	MMP	16,954	11,402	-5,552*
22	MJVC	47,305	43,87	-3,435*
23	MJVC	38,281	33,475	-4,806*
24	JN	10,623	19,819	9,196†
25	ALM	13,044	2,473	-10,571*
26	MJAM	2,629	1,209	-1,42*
27	JCR	16,224	4,41	-11,814*
28	ELP	30,398	55,315	24,917†
29	ELP	2,938	6,365	3,427†

30	NGC	62,733	88,473	25,74 [†]
31	NGC	9,401	9,485	0,084 [†]
32	GJC	18,963	2,469	-16,494*
33	MARP	99,519	93,259	-6,26*
34	ADE	44,146	35,849	-8,297*
35	MVM	101,422	96,803	-4,619*
36	JMC	17,728	16,479	-1,249*
37	JMC	10,643	13,578	2,935 [†]

a – área da úlcera em cm² no início do estudo (T0).

b – área da úlcera em cm² após 90 dias de seguimento (T90).

* - úlceras que apresentaram redução da área em T=90

† - úlceras que não apresentaram redução da área em T=90

Tabela 2: Dados de 34 proteínas identificadas no exsudato das 37 úlceras venosas crônicas estudadas.

ID	Proteína	CA	MM	MCE	DP
P1	Albumin	P02768.2	69 kDa	326,1	89,8
P2	Transferrin	P02787.3	77 kDa	40,8	9,1
P3	Haptoglobin	P00739.2	39 kDa	22,7	11,3
P4	C3	P01024.2	187 kDa	19,3	5,9
P5	Alpha2M	P01023.3	163 kDa	19,5	6,6
P6	Ig γ-1 chain C region	P01857.1	36 kDa	31,5	10,3
P7	Ig γ-1 chain C region	P01876.2	38 kDa	16,9	7,2
P8	Apo-AI	P02647.1	31 kDa	16,1	5,0
P9	Hemoglobin β	P68871.2	16 kDa	13,6	9,6
P10	Alpha1antitrypsin	P01009.3	47 kDa	12,9	4,0
P11	Ig lambda-2 chain C regions	P0CG05.1	11 kDa	25,7	7,1
P12	Ig kappa chain C region	P01834.1	12 kDa	23,7	6,0
P13	Apo-AII	P02652.1	11 kDa	8,0	2,8
P14	Hemopexin	P02790.2	52 kDa	8,2	2,8
P15	DBP	P02774.1	53 kDa	7,9	2,8
P16	Alpha-globin	P69905.2	15 kDa	7,6	5,7
P17	Ceruloplasmin	P00450.1	122 kDa	5,1	2,3
P18	Ig gamma-4 chain C region	P01861.1	36 kDa	21,7	6,9
P19	AGP 1	P02763.1	24 kDa	5,4	2,7
P20	Ig gamma-2 chain C region	P01859.2	36 kDa	14,6	4,8
P21	Actin	P60709.1	42 kDa	4,3	2,9
P22	Ig gamma-3 chain C region	P01860.2	41 kDa	19,1	6,4
P23	Alpha-2-HS-glycoprotein	P02765.1	39 kDa	2,8	1,7
P24	HP1	P59665.1	10 kDa	3,4	2,1
P25	Complement C4-B	P0C0L5.2	193 kDa	3,2	2,9

P26	Ig mu chain C region	P01871.3	49 kDa	3,3	2,9
P27	Alpha-1B-glycoprotein	P04217.4	54 kDa	2,4	1,4
P29	Fibrinogen alpha chain	P02671.2	95 kDa	1,9	1,6
P30	AGP 2	P19652.2	24 kDa	2,8	1,8
P32	Complement factor B	P00751.2	86 kDa	1,4	0,7
P33	VN	P04004.1	54 kDa	1,3	1,0
P37	Ig kappa chain V-III region SIE	P01620.1	12 kDa	0,9	0,7
P38	Ig heavy chain V-III region TUR	P01779.1	12 kDa	0,8	0,6
P57	Ig heavy chain V-III region BRO	P01766.1 [2]	13 kDa	1,0	0,9

ID- Identificação da proteína no estudo;

CA- Código de acesso;

MM – Massa molecular;

MCE – Média das contagens espectrais em todas as úlceras estudadas;

DP – Desvio padrão.

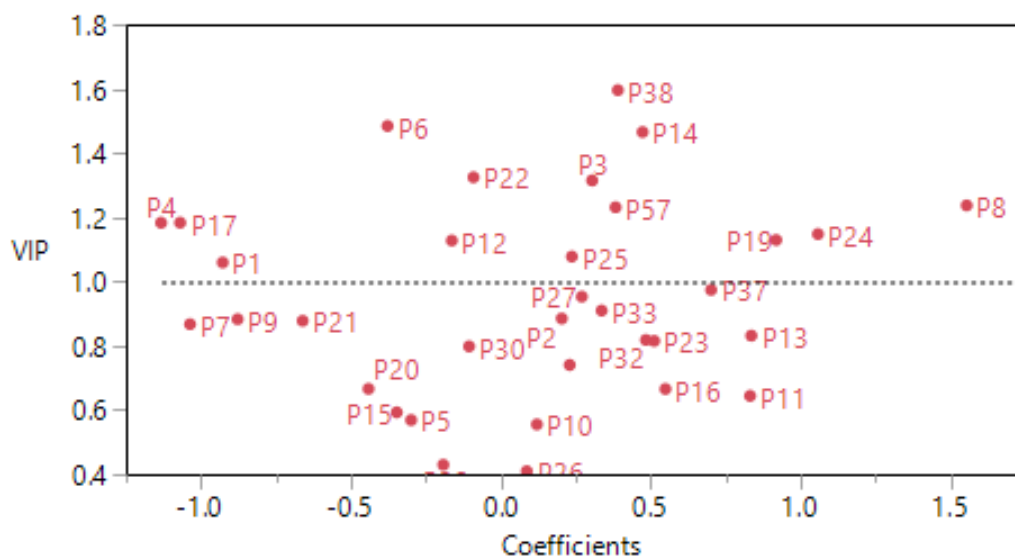


Figura 1: Diagrama (Volcano plot) das proteínas com expressão diferencial identificadas entre as UVCs obtido pela análise estatística multivariada. Complement C3 (P4) e ceruloplasmin (P17) apresentaram expressão diferencial para UVCs que tiveram redução da área (CoefT90 negativo) e Apo-A1 (P8) e HP1 (P24) para UVCs que não tiveram este desfecho (CoefT90 positivo).

Tabela 3: Proteínas diferencialmente expressas identificadas no exsudato inflamatório das 37 úlceras venosas crônicas tratadas no Ambulatório de Úlceras Crônicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, São Paulo – Brasil, em 2015.

ID	Proteína	Código de acesso	Função	Expressão*
P4	Complement C3	P01024.2	Imunomodulação	H
P8	Apolipoprotein-A1	P02647.1	Transporte	NH
P17	Ceruloplasmin	P00450.1	Transporte	H
P24	Neutrophil-defensin-1	P59665.1	Atividade antimicrobiana	NH

* H: expressão diferencial em UVCs que tiveram redução da área; NH: expressão diferencial em UVCs que não reduziram.

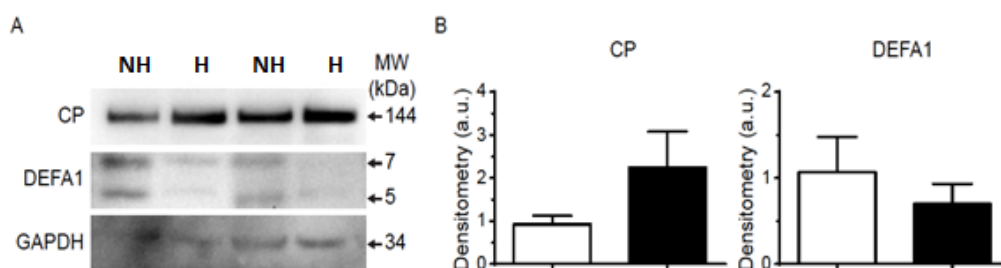


Figura 2. (2A) Detecção representativa de CP (ceruloplasmin) e DEFA1 (α -defensina-1) por Western blot usando exsudatos de úlceras que não cicatrizaram (NH) e úlceras que cicatrizaram (H), conforme indicado. As setas indicam massas moleculares aparentes (kDa) para CP (144 Da), DEFA1 (7 e 5 Da) e GAPDH (34 Da), usada como controle interno. (2B) Análise densitométrica dos resultados de Western blot. A análise densitométrica do DEFA1 foi realizada usando a banda inferior. Os resultados são expressos como média \pm de experimentos realizados com amostras de 3-4 exsudatos / grupo.

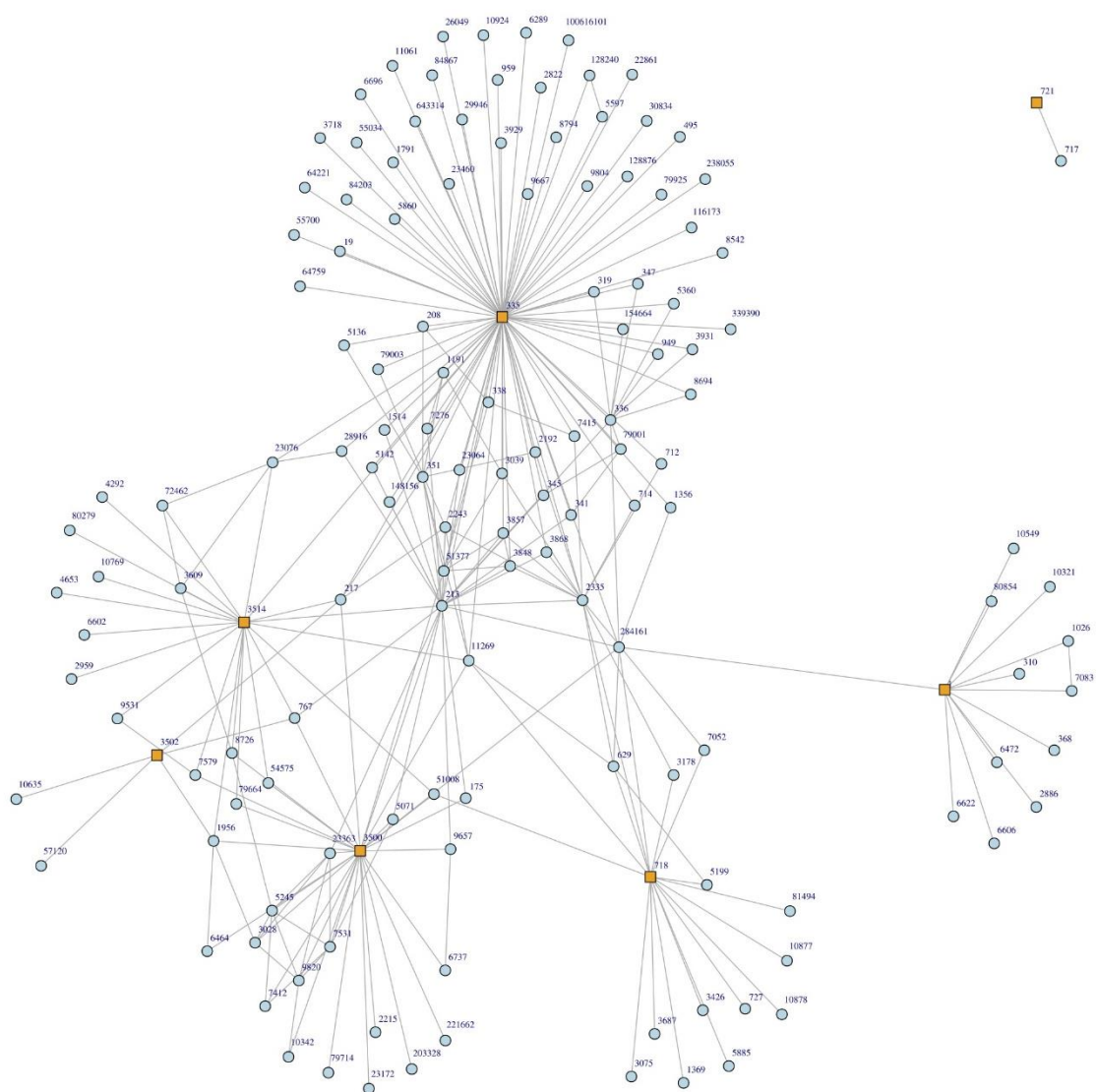


Figura 3: Rede de interações entre as proteínas diferencialmente expressas do exsudato inflamatório das úlceras venosas crônicas que reduziram e que não reduziram as áreas observadas num período de 90 dias. Cada vértice/nó representa uma proteína e cada aresta representa uma interação entre as vértices. Os nós 718 e 335 representam as proteínas complement C3 (P4) e apolipoproteínas-A1 (P8).

Apêndice – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

As úlceras são feridas na pele ou em tecidos mais profundos chamados de epiderme, podendo também atingir os músculos, sendo normalmente encontradas nas pernas ou pés. A causa normalmente está relacionada à obstrução total ou parcial artérias ou veias. As úlceras venosas geralmente ocorrem devido ao aumento da pressão sanguínea dentro das veias nos membros inferiores, e correspondem a maioria (80 a 90%) das úlceras encontradas nesta localização. O conhecimento do processo de cicatrização ou não da ferida pode ajudar na busca por marcadores biológicos, ou seja, substâncias que demonstram se a ferida irá cicatrizar facilmente ou não. Estes marcadores são muito importantes, pois num futuro próximo ajudarão a mudar ou criar novos tratamentos para as feridas. Este projeto pretende estudar e entender melhor o funcionamento das proteínas que estão envolvidas no processo de cicatrização das úlceras.

Eu, _____
 recebi pessoalmente o convite para participar da pesquisa: “**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE BIOMARCADORES PRESENTES NO EXSUDATO DE ÚLCERAS VENOSAS CRÔNICAS COM VISTAS AO DESENVOLVIMENTO DE TRATAMENTOS ADJUVANTES**”, a ser realizada no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, sob responsabilidade da Pesquisadora, Bióloga, Dra. Lucilene Delazari dos Santos e da aluna Nayara Rodrigues Vieira, e todas informações a respeito do mesmo. Fui devidamente informado sobre os objetivos e procedimentos envolvidos que consistem em: lavagem do tecido que contém a ferida com água estéril; envolvimento da ferida com filme plástico e aguardo de 30 minutos à 1 hora; coleta do exsudato (líquido) expulso pela ferida. Os exsudatos serão coletados na primeira consulta do paciente, sessenta e noventa dias após a primeira consulta; Fui informado que os procedimentos realizados não acarretarão nenhum risco para minha saúde e que dados presentes em meu prontuário também poderão ser utilizados na pesquisa. Ficou esclarecido que a minha participação é voluntária e que tenho a liberdade para me retirar da pesquisa em qualquer momento. Fui assegurado que os dados serão mantidos em sigilo e que minha privacidade será resguardada. Declaro que este documento está sendo passado em duas vias, sendo que uma cópia ficará comigo e outra será mantida em arquivo pelo pesquisador. Com a assinatura abaixo, dou consentimento para a incorporação dos meus dados neste estudo. Qualquer dúvida adicional, poderei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, através do telefone: (14) 3880-1608/ 1609/ 1610.
 Botucatu, de de .

 Assinatura do paciente

Lucilene Delazari dos Santos

 Assinatura do pesquisador

Nayara Rodrigues Vieira (Aluna)

Artigo 2

Artigo original

**HÁ MUDANÇA NA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DO EXSUDATO DE
ULCERAS VENOSAS CRÔNICAS APÓS O TRATAMENTO COM
SELANTE HETERÓLOGO DE FIBRINA? UM ESTUDO DE COORTE
PROSPECTIVA**

Nayara Rodrigues Vieira Cavassan¹; Caio Cavassan Camargo¹; Benedito Barraviera^{1,3}; Rui Seabra Ferreira Jr.^{1,3}; Hélio Amante Miot⁴; Luciana Patrícia Fernandes Abbade⁴; Lucilene Delazari dos Santos^{1,3*}

1. Programa de Pós Graduação em Doenças, Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil
2. Professor Coordenador de Enfermagem, Centro Universitário Unisagrado, Bauru, São Paulo, Brasil
3. Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil
4. Departamento de Dermatologia e Radiologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil

RESUMO

Úlceras venosas diminuem a qualidade de vida de seus portadores e impactam fortemente os serviços de saúde. O selante de fibrina é uma substância que além das funções hemostática e adesiva, pode atuar na manutenção do leito de feridas, facilitando a cicatrização. **Objetivos:** Investigar se há diferença na expressão de proteínas do exsudato de úlceras venosas crônicas antes e após o tratamento com selante de fibrina heterólogo, utilizando a análise proteômica. **Métodos:** Dez úlceras venosas crônicas, de oito pacientes, foram avaliadas durante nove semanas de tratamento com selante heterólogo. Foram avaliadas: as áreas das úlceras por planimetria (cm²) e a expressão de proteínas no exsudato antes e após o tratamento por análises de espectrometria de massas *label free* do tipo *shotgun*. **Resultados:** Todos os indivíduos do estudo foram do sexo feminino, com idade média de 72,3 (55 – 89) anos e tempo médio de evolução das lesões de 21 (6 – 48) meses. Trinta e uma proteínas foram identificadas, e após o tratamento com o selante, houve diminuição na expressão de *ceruloplasmin* e *vitronectin*. As reduções de *ceruloplasmin* e *vitronectin* se correlacionaram a diminuição de *alpha-2-HS* e *vitamin-D-binding-protein* (DBP), respectivamente. Por sua vez, a menor expressão da *vitronectin* associou-se à maiores expressões de *Ig lambda-2*, *complement C3* e *alpha-globina*. Cinco proteínas se expressaram diferentemente frente à redução da úlcera ao final do tratamento, estando *Ig lambda-2*, *Ig gamma-3* e *complement C3* mais expressas em úlceras com evolução clínica satisfatória, enquanto o fibrinogênio e vitronectina apresentaram aumento de expressão em lesões que não apresentaram significativa redução da área inicial. **Conclusão:** Houve diferença de expressão de proteínas entre lesões que cicatrizaram e não cicatrizaram, e diminuição dos fatores inflamatórios no exsudato das úlceras após o tratamento. O selante heterólogo pode ter contribuído com a cicatrização pela modulação e regulação de proteínas no microambiente da ferida. Entretanto novos estudos clínicos, com amostragem maior e grupo controle devem ser realizados, a fim de descartar fatores confundidores.

Palavras-chave: Espectrometria de massas, refluxo venoso, cicatrização, selante heterólogo, insuficiência venosa.

ABSTRACT

Venous ulcers impacts on the quality of life of patients who carrier this lesion and causes financial overload on health services. Fibrin sealant is a substance, which in addition to the hemostatic and adhesive functions can act in maintaining of wound bed supporting healing process. Aims: To investigate whether there is a difference in protein expression derived of exudate from chronic venous ulcers before and after treatment with heterologous fibrin sealant using proteomic analysis. Methods: Ten chronic venous ulcers, from eight patients, were evaluated during nine weeks of treatment with heterologous sealant. The areas of ulcers were measured by planimetry (cm²) and the expression of proteins in the exudate before and after treatment were identified by label free mass spectrometry analyzes of the shotgun type. Results: All individuals were female, with a mean age of 72.3 (55 - 89) years and an average of lesion evolution time of 21 (6 - 48) months. Thirty-one proteins were identified and after sealant treatment there was a decrease in expression of ceruloplasmin and vitronectin. These reductions were correlated respectively with alpha-2-HS and vitamin-D-binding-protein (DBP) decreases. In turn, lower expressions of vitronectin was associated with higher expressions of Ig lambda-2, complement C3 and alpha-globin. Five proteins were differently expressed due to ulcer reduction at the end of treatment, being that Ig lambda-2, Ig gamma-3 and complement C3 were more expressed in ulcers with satisfactory clinical evolution, while fibrinogen and vitronectin showed increased expression in lesions that did not showed a significant reduction in the initial area. Conclusion: There was a difference in protein expression between lesions that healed and did not heal and a decrease in inflammatory factors in the ulcer exudate after treatment. The heterologous sealant may have contributed to healing process by modulating and regulating proteins in the wound microenvironment. However, new clinical studies with a larger sample and a control group should be carried out in order to rule out confounding factors.

Keywords: Mass spectrometry, venous reflux, healing, heterologous sealant, venous insufficiency.

1. INTRODUÇÃO

As úlceras venosas (UVs) de membros inferiores são lesões onde há perda de tecido epidérmico, dérmico ou tecidos adjacentes, decorrentes da complicação e cronicidade da doença venosa crônica ⁽¹⁻⁴⁾. Normalmente associadas com populações ocidentais, sua prevalência pode chegar a 4% na faixa etária acima de 65 anos de idade ^(4,5), levando à diminuição da qualidade de vida dos portadores e impactando custos dos serviços de saúde ^(1,6-8).

A compressão é considerada a terapia ouro no tratamento das UVs, favorecendo o retorno venoso e diminuindo a hipertensão venosa periférica do membro acometido, tendo ação direta na macro e microcirculação ⁽⁹⁻¹¹⁾. Ainda assim, este tipo de lesão apresenta um alto índice de recorrência ⁽¹²⁾, sendo importante o preparo e a limpeza do leito, bem como a escolha de um curativo primário assertivo, visando o favorecimento da vascularização e revitalização do tecido ulcerado ^(13,14).

O selante de fibrina tem sido uma substância utilizada no tratamento de úlceras cônicas de diferentes etiologias, pois além das funções hemostática e adesiva, sua composição pode potencialmente favorecer o microambiente da lesão, atuando na manutenção do leito e bordas e conseqüentemente facilitando a cicatrização das mesmas ⁽¹⁵⁻¹⁸⁾. Composto por fibrinogênio (obtido do crioprecipitado) e trombina, na presença de cálcio e do fator XIII, mimetiza as fases finais da cascata de coagulação, pela transformação do fibrinogênio em monômeros de fibrina insolúveis. ⁽¹⁹⁾.

Atualmente, são fabricados três tipos de selante de fibrina: autólogos, homólogos e heterólogos. Os selantes autólogos e homólogos tem como matéria prima componentes humanos, derivados do próprio indivíduo, ou de um pool de doadores respectivamente. Esse tipo de composição se torna menos vantajosa, pois apresenta um alto custo de produção devido à escassez de matéria prima, impossibilitando a utilização pelos serviços de saúde, além de facilitar a disseminação de novos e antigos vírus por falhas de rastreio. Já o selante heterólogo são compostos por fibrinogênio e trombina obtidos de animais não humanos.

A fim de desenvolver um biomaterial cujo manejo é especialmente voltado para uma larga escala de produção (reduzindo o valor de comercialização), e que minimizasse o risco de contaminação por agentes infecciosos transmitidos pelo sangue humano, desenvolve-se um novo selante heterólogo de fibrina, a partir do fibrinogênio

extraído do sangue de búfalos (*Bubalus bubali*) e uma serinoprotease, do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* ⁽²⁰⁾.

Após a administração em 25 pacientes com UVs, Gatti *et al.* ⁽²¹⁾, afirmaram que o selante heterólogo de fibrina auxiliou na diminuição da dor e no preparo do leito das lesões, além de se demonstrar mais econômico quando comparado aos selantes comerciais, sugerindo também que seu uso rotineiro, poderia auxiliar no padrão cicatricial e elevar os índices de cura em UVs.

Frente as evidências de que o selante de fibrina possa desempenhar função ativa na manutenção do leito de UVs, atuando como curativo funcional, o presente estudo tem como objetivo investigar se o mesmo possui capacidade de aumentar ou inibir a expressão de proteínas na úlcera pela análise do exsudato inflamatório, correlacionando os achados à evolução cicatricial ao longo do período de estudo.

2. QUESTÃO DE PESQUISA

Há proteínas expressas diferentemente no exsudato de UVs crônicas após o tratamento com selante heterólogo de fibrina?

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Tipo de estudo

Este foi um estudo observacional, do tipo coorte prospectiva, sem grupo comparativo e se desenvolveu conjuntamente ao estudo clínico piloto, denominado estudo Selante I ⁽²²⁾, para avaliar segurança clínica (local e sistêmica) e menor dose segura de administração do selante heterólogo em úlceras venosas crônicas.

Conduzido na Unidade de Pesquisa Clínica da Faculdade de medicina de Botucatu, o estudo Selante I, foi realizado com 10 pacientes, com uma ou múltiplas úlceras venosas, recrutados do Ambulatório de Úlceras Cônicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, avaliados durante 12 semanas, que receberam aplicação semanal do selante heterólogo de fibrina, ácido graxo essencial e bota de Unna em todas as UVs.

Entretanto, para o presente estudo, o período de seguimento foi: mínimo de cinco e máximo de 10 semanas.

Visando comparar a expressão proteica do exsudato frente ao tratamento, definiu-se dois momentos de colheita: antes na administração do selante de fibrina (V0) e na última visita do paciente (VF). Sendo assim, cada úlcera foi definida como controle dela mesma. Foi considerada como última visita, aquela anterior a perda de seguimento, ao fechamento da lesão ou após 9 semanas de tratamento.

Na presença de múltiplas úlceras em um paciente, o material de todas as UVs exsudativas foi colhido.

3.2. População de Estudo

Foram incluídos os 10 pacientes do estudo Selante I ⁽²²⁾, cujos critérios de elegibilidade eram: idade superior a 18 anos, a presença de pelo menos uma UV ativa, tempo de evolução mínimo de 6 semanas e máximo de 5 anos, apresentar pelo menos uma úlcera com área mínima de 5 cm², apresentar área somatória máxima de 60 cm² para múltiplas úlceras e etiologia venosa confirmada por exame clínico.

Foram excluídas lesões mistas ou de outra etiologia, com sinais de infecção e/ou colonização crítica, necrose e/ou desvitalização de leito, e sem presença de exsudato inflamatório (nas cinco primeiras semanas do seguimento). Pacientes com histórico de alergia à bota de Unna e/ou ácido graxo essencial, incompatibilidade ao uso de terapia compressiva, suspeita e/ou confirmação de gravidez, valores de coagulograma fora dos limites desejáveis, retirada do consentimento, bem como mulheres em idade fértil sem uso de contraceptivos não foram incluídos no estudo.

A presente população de estudo foi selecionada a partir de 28 pacientes, com 37 úlceras, das nossas pesquisas anteriores de caracterização e expressão proteômica em UVs crônicas ⁽²³⁾.

Todos os indivíduos foram informados a respeito da obtenção e utilização dos dados e materiais biológicos, concedendo aprovação ao uso dos mesmos pela assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aprovado pelo Conselho de Ética em Pesquisa da Instituição (parecer nº 1.189.403/2015).

3.3. Área da úlcera

A área de cada lesão foi mensurada na admissão do paciente ao estudo e semanalmente até o fechamento da úlcera, pela técnica de planimetria ⁽²⁴⁾.

A borda de cada lesão foi desenhada em filme plástico com caneta hidrográfica, sendo o desenho então transferido à uma folha de papel sulfite branca. Foi adicionado ao desenho de forma adjacente, uma medida referencial retilínea de dimensões pré-determinadas.

Posteriormente, o desenho foi fotografado (Canon EOS) e transferido para o Software Image J 1.37v, onde foi tracejado manualmente. Utilizando a relação pixels/mm do referencial externo, a área de cada úlcera foi obtida e convertida em cm².

A área final foi obtida após três repetições da técnica, de modo consecutivo, pelo mesmo operador.

3.4. Colheita dos Exsudatos Inflamatórios

O exsudato foi colhido em dois momentos:

3.4.1. Antes do Tratamento (V0)

As área da úlcera e regiões adjacentes foram higienizadas com solução salina estéril a 0,9% (m/v), e avaliadas quanto aos sinais clínicos de infecção, colonização, necrose, qualidade do leito, ou seja, presença ou ausência de tecido de granulação ou fibrina, que denotassem a necessidade de debridamento mecânico e anotados os volumes e características do exsudato.

Seguindo protocolo estabelecido por Cavassan *et al.*⁽²³⁾, as úlceras foram então ocluída com filme Tegaderm® (3M Health Care, St. Paul, MN, USA), por aproximadamente 30 minutos, exsudato foi colhido com micropipeta, transferido para tubos plásticos de baixa adesão de 1,5 ml com tampa (*Protein LoBind - Eppendorf*®) e acondicionado a -80° C para uso posterior.

Realizou-se a administração do selante heterólogo sobre todo o leito ulcerado, segundo protocolo do estudo Selante I ⁽²²⁾. O leito foi recoberto por gazes embebidas em ácido graxo essencial e o membro inferior (abaixo do joelho), enfaixado com bota

de Unna até a porção dorsal do pé. Recebendo por fim uma bandagem de atadura de crepe ao longo de toda extensão. O retorno para limpeza e nova administração do selante de fibrina ocorreu em sete dias.

As amostras colhidas imediatamente antes da administração do selante heterólogo foram definidas como amostras controles e a visita de atendimento foi denominada V0.

3.4.2. Após o Tratamento

As demais amostras de exsudato foram colhidas semanalmente, sendo identificadas com o número individual da lesão (ordem de entrada no estudo), iniciais no paciente e semana de tratamento.

Após sete dias, repetiu-se o tratamento e avaliação quanto ao leito e características da exsudação, bem como colheita do exsudato e nova administração do selante, como anteriormente descritos.

O exsudato colhido na última visita de seguimento, na visita anterior à cicatrização total da lesão ou anterior à descontinuação do paciente foi definido como amostra tratada e a visita foi chamada de VF.

3.5. Preparo, Quantificação e Digestão de Proteínas da Amostra

Assim como descrito por Cavassan *et al.*⁽²³⁾, os exsudatos foram descongelados, centrifugados e quantificados em triplicata por método de Bradford⁽²⁵⁾, seguidos pela redução (ditiotretol 10mM), alquilação (iodoacetamida 45mM) e digestão trípica em solução (1:50 ug).

3.6. Identificação por Espectrometria de Massas

Após a dessalinização com colunas C18 Sep-Pak Vac (Waters), e redução em SpeedVac™ (Thermo Scientific), as amostras foram identificadas no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), localizado no Centro Nacional de Pesquisa em

Energia e Materiais (CNPEM) em Campinas-SP, seguindo protocolo descrito por Cavassan *et al.* ⁽²³⁾.

3.7. Análise de Dados

A identificação de proteínas nas amostras foi realizada utilizando-se bancos de dados públicos (NCBI, taxonomia *Homo sapiens*, 33.695.097 sequências, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=homo%20sapiens>), do software Mascot Distiller v2.3.2.0 (Matrix Science, Boston - USA).

Como parâmetros, utilizou-se a tripsina como enzima proteolítica, carbamidometilação como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável. O erro de tolerância para MS e MS/MS foi de 0,1 Da. A validação dos dados foi feita segundo algoritmo do próprio programa, com valores de identificação *Mascot Scores* acima de 42 e Valores de *Ion Score* maiores que 30 em uma das sequências identificadas.

A contagem espectral foi realizada por Scaffold 4, com taxa de FDR (False Discovery Rate) de 1% para proteínas e 0,1% para peptídeos, com confiabilidade de 95%. Pelo menos duas sequências peptídicas em comum nas amostras foram exigidas na quantificação *label free*.

3.8. Análise Estatística

Cada proteína foi representada nas análises pelo seu valor de média ponderada $(3 * \text{mediana} + \text{mínima} + \text{máxima}) / 5$, obtido a partir das triplicatas de suas contagens espectrais.

Foram excluídas das análises proteínas identificadas em menos de 30% das lesões. Os valores que resultaram em zero para as demais proteínas, foram corrigidos por imputação múltipla⁽²⁶⁾. Os clusters foram retirados das análises.

Para obter o descritivo dos dados, foram calculadas as diferenças relativas para cada proteína (valores de média ponderada em VF / valores de média ponderada em V0) (identificadas como CasosDifR na tabela). Sofreram ainda winsorização, aqueles

valores cujo desvio interquartil ultrapassou 1,5x adicionado ao terceiro quartil ou subtraído do primeiro quartil ⁽²⁷⁾.

Foi então calculado o valor de expressão relativa (*Fold Change*) de cada proteína pelas média das diferenças relativas. O Intervalo de confiança de 95% foi estimado por *bootstrap* para 1000 reamostragens.

Os valores foram comparados por teste *Wilcoxon* (bicaudal), por diagrama de dispersão. Foram selecionadas proteínas com *fold change* valor <0.5 ou >1.5 .

O coeficiente de correlação (*rho*) de *Spearman*⁽²⁸⁾ foi utilizado para análise de correlação bivariada entre as proteínas. As correlações foram exploradas em *heatmap* (forte correlação $<-0,6$ e $>0,6$) ⁽²⁹⁾. Foram consideradas proteínas com correlações positivas aquelas com expressões aumentadas ou diminuídas de forma conjunta, e negativas aquelas cujas expressões foram inversamente proporcionais.

A mesma análise foi realizada para correlacionar a expressão proteômica e a redução (área final – área inicial) de cada UV do estudo. Considerou-se correlação valores de *rho* $<-0,5$ ou $>0,5$, com valores menores que $-0,5$ associados com a redução da úlcera e valores acima que $0,5$ como aumento da lesão. Os dados foram dispostos no diagrama *Volcano Plot*.

Foram consideradas como proteínas diferencialmente expressas, aquelas cujas frequências fossem $> 70\%$ dos casos observados em T0.

Os dados foram analisados nos softwares JMP 10 e SPSS 22. A significância foi determinada como $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Foram colhidos os exsudatos de 14 lesões de 10 pacientes, porém, foram incluídos ao estudo o material de 10 UVs, de oito pacientes. Dois pacientes e quatro úlceras foram descontinuados, pois as UVs não apresentaram volume de exsudato suficiente para realização das análises.

A amostra foi composta exclusivamente por indivíduos do sexo feminino, relatando histórico de hipertensão arterial sistêmica (HAS), com idade média de 72,3 anos (55 – 89) e lesões com áreas variando entre 5 cm^2 e $59,6\text{ cm}^2$ (Tabela 1).

O tempo médio de evolução das UVs foi de 21 (6 – 48) meses e o exsudato foi colhido durante um período mínimo de 5 e máximo 9 semanas de tratamento (Tabela 2).

Os desfechos observados ao final do período de acompanhamento foram: 1) Cicatrização total da UV (5), 2) Diminuição da área inicial (3) e 3) Aumento da área inicial (2) (Tabela 3).

A análise proteômica tipo *shotgun label free* do exsudato identificou 78 proteínas distintas (proteínas e clusters). Após correção estatística dos dados, foram consideradas 31 proteínas totais para as análises em V0 e VF (Tabela 4).

Pela comparação pelo teste *Wilcoxon* dos valores estimados em *bootstrap* para todas as sequências identificadas, foram identificadas duas proteínas diferencialmente expressas antes e após o tratamento com selante de fibrina (Tabela 4).

Houve a diminuição da expressão das proteínas *ceruloplasmin* (P16) e *vitronectin* (P34) ao final do tratamento, evidenciada pelo diagrama de dispersão (Figura 1). A *ceruloplasmin* foi encontrada no exsudato de 90% das úlceras em V0 e VF, já a *vitronectin* estava presente em 70% dos casos em V0 e apenas 40% dos casos em VF.

Pela análise de correlação proteína-proteína, a *ceruloplasmin* apresentou um índice de correlação positivo com *alpha-2-HS-glycoprotein* (P32). Já a expressão da *vitronectin* correlacionou-se positivamente à *DBP* (P15) e negativamente à *Ig lambda-2 chain* (P3), *complement C3* (P10) e *alpha-globin* (P13) (Figura 2).

Após análise de correlação entre a expressão proteica e redução das UVs, cinco proteínas apresentaram expressão diferencial das demais no exsudato das UVs. As proteínas *Ig lambda-2 chain* (P3), *complement C3* (P10) e *Ig gamma-3* (P24) foram mais expressas em úlceras com progressão cicatricial, enquanto que *fibrinogen-alpha* (P28) e a *vitronectin* (P34) apresentaram maior expressão em lesões que não cicatrizaram (Figura 3). Com exceção à *vitronectin* (70%), as demais moléculas foram identificadas em todos os exsudatos em T0. Houve mudança nas frequências observadas em TF para as proteínas *fibrinogen-alpha* (50%) e *vitronectin* (40%).

5. DISCUSSÃO

Os dados epidemiológicos das úlceras crônicas de membros inferiores na população, incluindo as de etiologia venosa são bem conhecidos. O presente estudo corrobora a predominância destas lesões em indivíduos do sexo feminino, com idade superior à 60 anos e histórico conhecido de hipertensão arterial sistêmica e varizes primárias, pelo aumento de condições crônicas e degenerativas da circulação sanguínea relacionado ao aumento da idade e a fatores hormonais e de autocuidado ligados ao gênero⁽³⁰⁻³⁹⁾.

A hipertensão arterial é a principal comorbidade sistêmica associada ao aparecimento e cronicidade em úlceras venosas, pela interferência na perfusão e integridade tissular, desfavorecendo os mecanismos cicatriciais normais⁽⁴⁰⁾.

A análise proteômica de fluidos humanos tem sido amplamente empregada como estratégia investigativa para o entendimento de diversas doenças e tratamentos, principalmente pela identificação de moléculas diferencialmente expressas, que possam atuar como diagnósticas e prognósticas de evolução⁽⁴¹⁻⁴⁴⁾, porém o número de estudos de investigação de proteínas no exsudato de úlceras de etiologia exclusivamente venosa ainda é limitado.

Quando diferencialmente expressas, as proteínas desempenham função moduladora no microambiente da lesão, atuando como potenciais biomarcadoras de cicatrização, tornando possível inferir o prognóstico da lesão⁽⁴⁵⁻⁴⁸⁾. Um dos trabalhos pioneiros utilizando abordagem proteômica de exsudatos de úlceras crônicas foi realizado por Fernandez e colaboradores⁽⁴⁹⁾, caracterizando 16 proteínas por *LC-ESI-MS/MS*, atuantes na cicatrização nas fases de coagulação, aguda e fibrinolítica, além do transporte de substâncias. Entretanto, somente proteínas minoritárias foram identificadas em exsudatos de úlceras de diferentes etiologias neste estudo.

Os autores acreditam que os resultados dos estudos de caracterização e expressão conduzidos exclusivamente com úlceras venosas possam divergir dos realizados com úlceras de diferentes etiologias, que usualmente se associam a processos locais ou sistêmicos de acordo com a comorbidade de base. Cavassan *et al.*⁽²³⁾, realizaram um estudo pioneiro do perfil proteômico das UVs, identificando 76

proteínas totais, classificando-as de acordo com suas funções na cicatrização e correlacionando-as às características clínicas e epidemiológicas das lesões.

Edsberg et al.⁽⁴⁵⁾, ao realizarem um estudo de correlação de proteínas expressas na borda e na área interna do leito de úlceras de pressão crônicas, identificaram 21 moléculas diferencialmente expressas entre lesões que cicatrizaram e não cicatrizaram durante seis semanas de observação. Esses achados corroboram nossos estudos anteriores de diferenciação de expressão proteica de acordo com a progressão cicatricial em úlceras venosas crônicas.

Oito lesões apresentaram cicatrização total ou parcial de suas áreas iniciais após um período mínimo de 5 semanas de tratamento. A progressão da cicatrização de forma efetiva pode ser vinculada à associação entre a manutenção correta do leito da lesão e a utilização tópica do selante. O emprego do selante de fibrina como adesivo cirúrgico ou *scaffold* para diversas substâncias é bem difundido em diversas áreas da medicina^(20,50-52). Atualmente, seu efeito na melhora da progressão cicatricial e cura de úlceras em diferentes tecidos, bem como sua capacidade de mediar reações inflamatórias, de proliferação celular e angiogênese têm sido analisados⁽⁵³⁻⁵⁵⁾. Becker et al.⁽⁵⁵⁾, inferiram a ação modulatória positiva do selante de fibrina no tratamento de úlceras gástricas, com aumento do número de células proliferativas na margem da lesão, da angiogênese e expressão do fator de crescimento fibroblástico 2, quando comparado ao controle tratado em solução salina. O aumento da neovascularização, além da maior deposição de colágeno no leito ulcerado também foram observados por Prodromidou et al.⁽⁵⁶⁾. A atuação do selante nos mecanismos inflamatórios, pela mudança de expressão imunohistoquímica de proteínas marcadoras da resposta à hipóxia tecidual de feridas cirúrgicas pode também ser descrita por García-Vásquez et al.⁽⁵⁷⁾

Entretanto, poucos estudos de expressão de proteínas utilizando a abordagem proteômica, associados ao uso de selantes de fibrina foram conduzidos até o momento.

O presente estudo possui caráter inédito, pois até o momento não foram encontrados registros de análises por espectrometria de massas quantitativa da expressão diferencial de proteínas frente ao tratamento com selante de fibrina em UVs.

Após o tratamento, houve a diminuição da expressão de duas moléculas: ceruloplasmin e vitronectin. Ambas estavam presentes em 90% e 70% (VO) e 70% e 40% (VF), dos casos respectivamente. Embora não haja um consenso estabelecido sobre a frequência mínima de ocorrência de uma molécula biomarcadora, os autores acreditam que 90 % dos casos estudados devem apresentá-la, a fim de ser representativa da população.

A função da *ceruloplasmin* já é bem descrita. Principal proteína carreadora do cobre plasmático, além da sua atuação à respostas imunes de fase aguda, apresenta atividade anti-inflamatória e enzimática, atuando diretamente na cicatrização de feridas ^(58,59). O cobre por sua vez, compõe a *lisil oxidase*, envolvida na reticulação e maturação do colágeno, estimulação da angiogênese e promoção do fator de crescimento endotelial ⁽⁶⁰⁻⁶²⁾. Além disso, pode se ligar à *lactoferrin*, em um complexo molecular contendo Fe³⁺, atuante na fase proliferativa (síntese de colágeno) e inflamatória (recrutamento de células T e macrófagos) ⁽⁶³⁻⁶⁶⁾.

Assim como ocorre nas úlceras venosas, nas lesões térmicas, há o aumento da permeabilidade celular, com conseqüente extravasamento de plasma e eletrólitos para o ambiente intersticial, levando a hipovolemia e diminuição da perfusão e oxigenação tecidual. Komosinska-Vassev⁽⁶⁷⁾ *et al.*, evidenciaram a *ceruloplasmin* como molécula marcadora do avanço cicatricial quando diferencialmente expressa no sangue de pacientes com queimaduras térmicas, entretanto, o aumento de sua expressão ocorreu no décimo dia do processo de cura da ferida, correspondente às fases tardia da inflamação e inicial da proliferação e remodelação tecidual. Nosso estudo, entretanto, evidenciou uma diminuição da expressão ao final do tratamento. A ação conhecida do selante de fibrina no aumento da angiogênese pode ter contribuído para a redução dos níveis de cobre no microambiente da lesão, assim como de outros fatores de crescimento endotelial, levando a uma diminuição da *ceruloplasmin* local.

Vitronectin é uma proteína da matriz extracelular, que participa dos processos de migração celular, coagulação sanguínea e fibrinólise, atuando diretamente no processo cicatricial de diversos tecidos ^(68 - 70). Muitos estudos tem demonstrado que *vitronectin* associa-se com fatores de crescimento epidérmicos, atuando benéficamente na cicatrização de feridas difíceis, pelo aumento da proliferação de

queratinócitos e subsequente reepitelização tecidual^(71 - 73). Upton *et al.*⁽⁷⁴⁾ e Harding *et al.*⁽⁷⁵⁾, ao aplicarem um complexo tópico de *vitronectin* com fatores de crescimento no leito de UVs crônicas, não observaram mudanças na proliferação e migração celular, porém houve associação com uma consistente redução da área da lesão após o tratamento, demonstrando que a vitronectina em sinergia a outras moléculas, desempenha importante papel na reparação tecidual.

A expressão diminuída dessas moléculas em VF nas úlceras que cicatrizaram pode estar associada à diminuição dos processos inflamatórios e de angiogênese locais, pois nas fases finais da cicatrização, esses eventos estão menos ativos.

Alguns estudos com úlceras crônicas têm demonstrado que diferentes proteínas aumentam ou diminuem suas expressões de forma conjunta, atuando em sinergismo ou antagonismo de acordo com suas funções e vias de atuação^(23, 76). No presente estudo o sinergismo foi explorado por *heatmap*, sendo observadas associações positivas entre *ceruloplasmin* e *alpha-2-HS-glycoprotein* e entre *vitronectin* e *DBP* e negativas entre *vitronectin* e *Ig lambda-2*, *complement C3* e *alpha-globin*.

Alpha-2-HS-glycoprotein é uma molécula abundante no tecido epitelial fetal e de recém nascidos, apresenta subexpressão na pele de indivíduos adultos. Responsável por promover maior formação dos lamelipódios em queratinócitos, atua na reepitelização tecidual, pelo aumento da proliferação e diferenciação morfológica dos mesmos, efetivando a migração celular e diminuindo o tempo de cicatrização de feridas^(77,78). Entretanto, estudos aprofundados devem ser realizados, pois as vias envolvidas na migração dos queratinócitos pela *alpha-2-HS-glycoprotein* ainda são desconhecidas.

O cobre carregado pela *ceruloplasmin*, reticula o colágeno e altera a atividade de metaloproteínases de matriz, envolvidas na separação de queratinócitos das membranas basais e migração dos mesmos pelas redes de colágeno⁽⁶⁷⁾. Sendo assim, uma diminuição da expressão de *ceruloplasmin* impactaria a formação e função das metaloproteínases, com perda da expressão de queratinócitos no exsudato de UVs, e conseqüente redução dos níveis locais da *alpha-2-HS-glycoprotein* para formação de lamelipódios e diferenciação morfológica dos mesmos.

A redução da expressão da *vitronectin* em T90 se correlacionou à diminuição na concentração de *DBP* e ao aumento da expressão de *Ig lambda-2*, *complement C3* e *alpha-globin*.

A *DBP* é uma proteína plasmática de ligação à actina. Vários estudos demonstram que o dano tecidual característico em lesões extensas ou crônicas, libera actina em fluidos extracelulares, causando oclusão da microcirculação e alterando os sistemas fibrinolíticos e de coagulação locais. A *DBP* plasmática atua como parte do sistema de eliminação dessas moléculas, sendo consumida em lesões importantes. Sua concentração reduzida demonstrou ser um efetivo marcador prognóstico de evolução ruim do dano tecidual ⁽⁷⁹⁻⁸³⁾. Sendo assim, os autores acreditam que sua expressão diminuída no fluido de UVs pode significar que o tratamento reduziu os níveis de danos celulares, com extravasamento da actina, e conseqüentemente, foi capaz de diminuir o processo inflamatório, agindo de maneira benéfica a cicatrização.

Imunoglobulinas, proteínas do sistema complemento e *alpha-globin* também mediam respostas imunes ligadas à inflamação. Acredita-se que estas proteínas estejam envolvidas em processos de marcação de antígenos, ativação ou inibição de apoptose e lise celular, indução da resposta inflamatória, aumento do estresse oxidativo, formação de espécies reativas de oxigênio e participando de vários processos do sistema imune inato e específico ^(48, 84-87). M'Koma *et al.*, ⁽⁸⁸⁾ ao estudarem úlceras intestinais, decorrentes da doença inflamatória intestinal, relataram a superexpressão de *alpha-globin* como marcadora inflamatória nesses tecidos.

Nossos estudos anteriores já identificaram classes de imunoglobulinas e a proteína *complement C3* com expressão relativa aumentada em lesões com padrão cicatricial efetivo, inferindo que essas moléculas possam ser boas candidatas a biomarcadoras do prognóstico cicatricial satisfatório em UVs⁽²⁴⁾. Corroborando esses achados, no presente estudo, a maior expressão de *complemente C3* foi identificada em úlceras com progressão cicatricial satisfatória. Entretanto, a incidência de cicatrização total das UVs foi maior na presente investigação, ocorrendo 50% das lesões estudadas, demonstrando que o selante de fibrina heterólogo pode agir como potencializador na modulação dessas moléculas, diminuindo o tempo de cicatrização natural.

O fibrinogênio é uma das proteínas importantes da matriz extracelular em tecidos lesionados, atuando na fase precoce do tecido de granulação e desempenhando um papel importante na coagulação e na cicatrização de feridas. As feridas crônicas parecem apresentar concentrações relativamente maiores de proteínas de matrizes quando comparadas às agudas, levando então, ao entendimento que este tipo de lesão pode estar estagnada nas fases precoces da reconstituição tissular em decorrência do processo inflamatório induzido e perpetuado por alterações subjacentes do microambiente ^(48,89). Além disso, Alguns estudos demonstram elevados níveis dessa proteína de fase aguda como marcadores inflamatórios sistêmicos, ligados ao aumento do risco ao desenvolvimento de doenças trombóticas, aterosclerose e insuficiência cardíaca^(90,91), corroborando os presentes achados epidemiológicos

Embora os resultados preliminares demonstrem uma eficácia clínica do uso do selante heterólogo de fibrina no tratamento de úlceras venosas, os autores acreditam que novos estudos clínicos, conduzidos com grupos controles, tratados somente com ácido graxo e terapia compressiva, devem ser realizados, a fim de mensurar a importância da manutenção do leito e da administração correta da terapia compressiva na cicatrização de UVs, minimizando possíveis variáveis confundidoras, além de validar os achados do presente estudo.

6. CONCLUSÃO

Podemos concluir portanto que há diferença de expressão de proteínas no exsudato de UVs, antes e após o tratamento com selante de fibrina. Com base na observação dos dados, os autores acreditam que *vitronectina*, seja uma molécula potencialmente biomarcadora da dificuldade cicatricial, uma vez que após o tratamento com selante heterólogo, além de apresentar diminuição da sua expressão, se correlacionou às UVs com menores índices de velocidade de redução. Além disso sua expressão foi antagônica ao aumento de complement C3 em UVs com cicatrização satisfatória, já evidenciadas em nossos estudos anteriores.

O selante parece atuar não somente como curativo biológico, mas também acelerar o processo cicatricial e inibir fatores que induzem à cronicidade. Entretanto

este, trata-se de um estudo preliminar. Estudos desenvolvidos com um grupo controle devem ser realizados a fim de se comprovar os achados.

7. REFERENCIAS

1. Lal BK. Venous ulcers of the lower extremity: Definition, epidemiology, and economic and social burdens. *Semin Vasc Surg.* 2015 Mar;28(1):3-5.
2. O'Donnell TF Jr, Passman MA, Marston WA, Ennis WJ, Dalsing M, Kistner RL, Lurie F, Henke PK, Gloviczki ML, Eklöf BG, Stoughton J, Raju S, Shortell CK, Raffetto JD, Partsch H, Pounds LC, Cummings ME, Gillespie DL, McLafferty RB, Murad MH, Wakefield TW, Gloviczki P; Society for Vascular Surgery; American Venous Forum. Management of venous leg ulcers: clinical practice guidelines of the Society for Vascular Surgery and the American Venous Forum. *J Vasc Surg.* 2014 Aug;60(2 Suppl):3S-59S
3. Abbade LPF, Pegas JR. Afecções ulcerosas. In: Belda Junior W, Chiachio Referências 140 Di N, Criado PR, eds. *Tratado de Dermatologia*, 3a. edição. São Paulo: Atheneu, 2018: 1007–39.
4. Maffei FHA, Magaldi C, Pinho SZ. Varicose veins and chronic venous insufficiency in Brazil: prevalence among 1755 inhabitants of a country town. *Int J Epidemiol.* 1986; 15:210-7.
5. Robertson L, Evans C, Fowkes FGR. Epidemiology of chronic venous disease. *Phlebology.* 2008; 23: 103–11.
6. Simka M, Majewski E. The social and economic burden of venous leg ulcers: focus on the role of micronized purified flavonoid fraction adjuvant therapy. *Am J Clin Dermatol.* 2003;4(8):573- 81.
7. Jones JE, Robinson J, Barr W, Carlisle C. Impact of exudates and odour from chronic venous leg ulceration. *Nurs Stand.* 2008;22:53–4.
8. Abbade LPF, Lastoria S, Rollo HD, Stolf HO. A sociodemographic, clinical study of patients with venous ulcer. *Int J Dermatol* 2005; 44: 989–92.
9. Oates A, Adderley U. Survey of registered nurses' selection of compression systems for the treatment of venous leg ulcers in the UK. *J Tissue Viability.* 2019 May;28(2):115-119.
10. Cardoso LV, Godoy JMP, Godoy MFG, Czorny RCN. Compression therapy: Unna boot applied to venous injuries: an integrative review of the literature. *Rev Esc Enferm USP.* 2018 Nov 29;52:e03394.
11. O'Meara S, Cullum N, Nelson EA, Dumville JC. Compression for venous leg ulcers. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 20: 618.
12. Mayer W, Jochmann W, Partsch H. [Varicose ulcer: healing in conservative therapy. A prospective study]. *Wien Med Wochenschr* 1994; 144: 250–2.
13. Atkin L. Chronic wounds: the challenges of appropriate management. *Br J Community Nurs.* 2019 Sep 1;24(Sup9):S26-S32.
14. Gupta S, Andersen C, Black J, de Leon J, Fife C, Lantis li JC, Niezgodna J, Snyder R, Sumpio B, Tettelbach W, Treadwell T, Weir D, Silverman RP. Management of

- Chronic Wounds: Diagnosis, Preparation, Treatment, and Follow-up. *Wounds*. 2017 Sep;29(9):S19-S36.
15. Clark R. Fibrin and wound healing. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 936: 355–67.
 16. Yoon HS, Na YC, Choi KH, Huh WH, Kim JM. Wound healing effect of regenerated oxidized cellulose versus fibrin sealant patch: An in vivo study. *Arch Craniofac Surg*. 2019 Oct;20(5):289-296
 17. Wang J, Wu Q, Yan Y, Li SJ, Yuan P, Cao CQ, Niu DF, Li ZY, Bu ZD, Ji JF. Effectiveness of fibrin sealant as hemostatic technique in accelerating ESD-induced ulcer healing: a retrospective study. *Surg Endosc*. 2019 Jun 24.
 18. Calabrò B, Ponsetto M, Greco R, Peradotto F, Personnettaz E, Obialero M. Treatment of leg ulcers with fibrin glue. *Minerva Chir*. 1995 Jun;50(6):569-74.
 19. Clark RAF. Fibrin sealant in wound repair : a systematic survey of the literature. *Expert Opin Investig Drugs* 2000; 3784: 2371–92.
 20. Ferreira RS, de Barros LC, Abbade LPF, et al. Heterologous fibrin sealant derived from snake venom: From bench to bedside - an overview. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis*. 2017; 23. DOI:10.1186/s40409-017- 0109-8.
 21. Gatti M, Vieira L, Barraviera B, Barraviera S. Treatment of venous ulcers with fibrin sealant derived from snake venom. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 2011; 17: 226–9.
 22. Abbade LPF, Barraviera SRCS, Silveiras MRC, Ferreira Jr RS, Carneiro MTR, Medolago NB BB. A new fibrin sealant derived from snake venom candidate to treat chronic venous ulcers. *J Am Acad Dermatol* 2015; 72: AB271.
 23. Cavassan NRV, Camargo CC, de Pontes LG, Barraviera B, Ferreira RS, Miot HA, Abbade LPF, Dos Santos LD. Correlation between chronic venous ulcer exudate proteins and clinical profile: A cross-sectional study. *J Proteomics*. 2019 Feb 10;192:280-290. doi: 10.1016/j.jprot.2018.09.009.
 24. Miot HA, Mendacolli TJ, Costa SV, Haddad GR AL. Úlceras crônicas dos membros inferiores: avaliação pela fotografia digital. *Rev Assoc Med Bras* 2009;55(2)145-8 2009; 55: 145–8.
 25. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72:248-54.
 26. Royston P. Multiple imputation of missing values. *Stata Journal* 2004; 227-41.
 27. Ghosh D, Vogt A. Outliers: An evaluation of methodologies. In: *Joint Statistical Meetings*. San Diego, CA: American Statistical Association, 2012. p. 3455-3460.
 28. Norman GR, Streiner, DL. *Biostatistics: the bare essentials*. Hamilton: BC Decker. 2000; 2.

29. Miot HA. Análise de correlação em estudos clínicos e experimentais. *J. vasc. Bras.* 2018; 17 (4): e20174118.
30. Callam MJ, Harper DR, Dale JJ, et al. Chronic ulcer of the leg: clinical history. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1987; 294:1389-91.
31. Wachholz PA, Masuda PY, Nascimento DC, et al. Quality of life profile and correlated factors in chronic leg ulcer patients in the mid-west of São Paulo State, Brazil. *An Bras Dermatol.* 2014;89:73-81. doi: 10.1590/abd1806-4841.20142156.
32. Stătescu L, Vâță D, Andrese E, et al. Chronic venous disease cases at the Iași dermatology clinic. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* 2014; 118:1000-7.
33. Vlajinac H, Marinkovic J, Maksimovic M, et al. Factors related to venous ulceration: a cross-sectional study. *Angiology.* 2014; 65:824-30. doi: 10.1177/0003319713508218. Epub 2013 Oct 28.
34. Madar G, Widmer LK, Zemp E, et al. Varicose veins and chronic venous insufficiency disorder or disease? A critical epidemiological review. *VASA.* 1986;15:126-34.
35. Abbade LPF, Latoria S. Abordagem de pacientes com úlcera da perna de etiologia venosa. *An Bras Dermatol.* 2006; 81:509-22.
36. Simões MV, Schmidt A. Hipertensão arterial como fator de risco para doenças cardiovasculares. *Medicina (Ribeirão Preto)*. 1996; 29:214-9.
37. Baker SR, Stacey MC. Epidemiology of chronic leg ulcers in Australia. *Aust N Z J Surg.* 1994;64:258-61.
38. Borges EL, Caliri MHL, Haas VJ. Revisão sistemática do tratamento tópico da úlcera venosa. *Rev Lat Am Enfermagem.* 2007;15:1163-70.
39. Finlayson K, Wu ML, Edwards HE. Identifying risk factors and protective factors for venous leg ulcer recurrence using a theoretical approach: A longitudinal study. *Int J Nurs Stud.* 2015; 52:1042-51.
40. Sampaio Santos FA, de Melo RP, Lopes MV. Characterization of health status with regard to tissue integrity and tissue perfusion in patients with venous ulcers according to the nursing outcomes classification. *J Vasc Nurs.* 2010 Mar;28(1):14-20.
41. Castagnola M, Scarano E, Passali GC, Messana I, Cabras T, Iavarone F, Di Cintio G, Fiorita A, De Corso E, Paludetti G. Salivary biomarkers and proteomics: future diagnostic and clinical utilities. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2017 Apr;37(2):94-101.
42. Whelan CD, Mattsson N, Nagle MW, Vijayaraghavan S, Hyde C, Janelidze S, Stomrud E, Lee J, Fitz L, Samad TA, Ramaswamy G, Margolin RA, Malarstig A, Hansson O. Multiplex proteomics identifies novel CSF and plasma biomarkers of early Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2019 Nov 6;7(1):169.

43. Kaddour H, Lyu Y, Welch JL, Paromov V, Mandape SN, Sakhare SS, Pandhare J, Stapleton JT, Pratap S, Dash C, Okeoma CM. Proteomics profiling of autologous blood and semen exosomes from HIV-infected and uninfected individuals reveals compositional and functional variabilities. *Mol Cell Proteomics*. 2019 Nov 1.
44. Milardi D, Grande G, Vincenzoni F, Pierconti F, Pontecorvi A. Proteomics for the Identification of Biomarkers in Testicular Cancer-Review. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 Jul 12;10:462.
45. Edsberg LE, Wyffels JT, Brogan MS, et al. Analysis of the proteomic profile of chronic pressure ulcers. *Wound Repair Regen*. 2012; 20:378-401.
46. Zillmer R, Trøstrup H, Karlsmark T, et al. Duration of wound fluid secretion from chronic venous leg ulcers is critical for interleukin-1 α , interleukin-1 β , interleukin-8 levels and fibroblast activation. *Arch Dermatol Res*. 2011; 303:601-6.
47. Löffler MW, Schuster H, Bühler S, et al. Wound fluid in diabetic foot ulceration: more than just an undefined soup?. *Int J Low Extrem Wounds*. 2013; 12:113-29.
48. Eming SA, Koch M, Krieger A, et al. Differential proteomic analysis distinguishes tissue repair biomarker signatures in wound exudates obtained from normal healing and chronic wounds. *J Proteome Res*. 2010;9:4758-66.
49. Fernandez ML, Broadbent JA, Shooter GK, et al. Development of an enhanced proteomic method to detect prognostic and diagnostic markers of healing in chronic wound fluid. *Br J Dermatol*. 2008; 158:281–90.
50. Currie LJ, Sharpe JR, Martin R. The use of fibrin glue in skin grafts and tissue-engineered skin replacements: A review. *Plast. Reconstr. Surg*. 2001; : 1713–26.
51. Abbade LPF, Barraveira SRCS, Silves MRC, Carneiro MTR, Medolago NBM, Caramori CA, Ferreira Jr RS, Barraviera B. Selante de fibrina para tratamento de ulceras venosas crônicas. Botucatu- SP, 2015.
52. Kirsner RS, Marston WA, Snyder RJ, Lee TD, Cargill DI, Slade HB. Sprayapplied cell therapy with human allogeneic fibroblasts and keratinocytes for the treatment of chronic venous leg ulcers: a phase 2, multicentre, doubleblind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2012; 380: 977–85.
53. Yoon HS, Na YC, Choi KH, Huh WH, Kim JM. Wound healing effect of regenerated oxidized cellulose versus fibrin sealant patch: An in vivo study. *Arch Craniofac Surg*. 2019 Oct;20(5):289-296.
54. Wang J, Wu Q, Yan Y, Li SJ, Yuan P, Cao CQ, Niu DF, Li ZY, Bu ZD, Ji JF. Effectiveness of fibrin sealant as hemostatic technique in accelerating ESD-induced ulcer healing: a retrospective study. *Surg Endosc*. 2019 Jun 24.

55. Becker JC, Beckbauer M, Domschke W, Herbst H, Pohle T. Fibrin glue, healing of gastric mucosal injury, and expression of growth factors: results from a human in vivo study. *Gastrointest Endosc.* 2005 Apr;61(4):560-7.
56. Prodromidou A, Pavlakis K, Pergialiotis V, Frountzas M, Machairas N, Kostakis ID, Korou LM, Stergios K, Dimitroulis D, Vaos G, Perrea DN. Healing after Resection of Colonic Endometriosis and Growth Factor-enriched Agents: An Experimental Rat Model. *J Minim Invasive Gynecol.* 2019 Mar - Apr;26(3):463-470.
57. García-Vásquez C, Fernández-Aceñero MJ, García Gómez-Heras S, Pastor C. Fibrin patch influences the expression of hypoxia-inducible factor-1 α and nuclear factor- κ Bp65 factors on ischemic intestinal anastomosis. *Exp Biol Med (Maywood).* 2018;243(10):803–808
58. Marques L, Auriac A, Willemetz A et al (2012) Immune cells and hepatocytes express glycosylphosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin at their cell surface. *Blood Cells Mol Dis* 48(2):110–120
59. Sen CK, Khanna S, Venojarvi M, Trikha P, Ellison EC, Hunt TK, Roy S. Copper-induced vascular endothelial growth factor expression and wound healing. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002 May;282(5):H1821-7.
60. Marques L, Auriac A, Willemetz A et al (2012) Immune cells and hepatocytes express glycosylphosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin at their cell surface. *Blood Cells Mol Dis* 48(2):110–120
61. Xiao J, Chen S, Yi J, Zhang H, Ameer GA. A Cooperative Copper Metal-Organic Framework-Hydrogel System Improves Wound Healing in Diabetes. *Adv Funct Mater.* 2017 Jan 5;27(1). pii: 1604872.
62. Pickart L, Vasquez-Soltero JM, Margolina A. GHK Peptide as a Natural Modulator of Multiple Cellular Pathways in Skin Regeneration. *Biomed Res Int.* 2015;2015:648108.
63. Wright JA, Richards T, Srail SK. The role of iron in the skin and cutaneous wound healing. *Front Pharmacol.* 2014 Jul 10;5:156.
64. Sokolov AV, Zakharova ET, Kostevich VA, Samygina VR, Vasilyev VB Lactoferrin, myeloperoxidase, and ceruloplasmin: complementary gearwheels cranking physiological and pathological processes. *Biometals.* 2014 Oct;27(5):815-28. doi: 10.1007/s10534-014-9755-2. Epub 2014 Jun 26.
65. Sokolov AV, Pulina MO, Zakharova. Effect of lactoferrin on the ferroxidase activity of ceruloplasmin. *Biochem (Mosc),*2005 70:1015–1019.
66. Hashimoto K, Ikeda N, Nakashima M, Ikeshima-Kataoka H, Miyamoto Y. Vitronectin Regulates the Fibrinolytic System during the Repair of Cerebral Cortex in Stab-Wounded Mice. *J Neurotrauma.* 2017 Nov 15;34(22):3183-3191.

67. Komosinska-Vassev K, Olczyk P, Kasperczyk J, et al. EPR Spectroscopic Examination of Different Types of Paramagnetic Centers in the Blood in the Course of Burn Healing. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:7506274.
68. Seiffert D, Loskutoff DJ. Type 1 plasminogen activator inhibitor induces multimerization of plasma vitronectin. A suggested mechanism for the generation of the tissue form of vitronectin in vivo. 1996; *J. Biol. Chem.* 271, 29644-29651.
69. Hodde JP, Johnson CE. Extracellular matrix as a strategy for treating chronic wounds. *Am J Clin Dermatol* 2007;8:61–6
70. Hollier B, Harkin DG, Leavesley D, Upton Z. Responses of keratinocytes to substrate-bound vitronectin: growth factor complexes. *Exp Cell Res* 2005;305:221–32.
71. Anderson A, Harkin D, Upton Z. Insulin-like growth factors (IGF) and IGF binding proteins bound to vitronectin enhance keratinocyte protein synthesis and migration. *J Invest Dermatol* 2004;122:1198–206.
72. Upton Z, Cuttle L, Noble A, Kempf M, Topping G, Malda J, Xie Y, Mill J, Harkin DG, Kravchuk O, Leavesley DI, Kimble RM. Vitronectin: growth factor complexes hold potential as a wound therapy approach. *J Invest Dermatol* 2008;128: 1535–44.
73. Xie Y, Rizzi SC, Dawson R, Lynam E, Richards S, Leavesley DI, Upton Z. Development of a threedimensional human skin equivalent wound model for investigating novel wound healing therapies. *Tissue Eng C* 2010;16:1111–23
74. Upton Z, Wallace HJ, Shooter GK, van Lonkhuyzen DR, Yeoh-Ellerton S, Rayment EA, Fleming JM, Broszczak D, Queen D, Sibbald RG, Leavesley DI, Stacey MC. Human pilot studies reveal the potential of a vitronectin: growth factor complex as a treatment for chronic wounds. *Int Wound J*. 2011 Oct;8(5):522-32.
75. Harding K, Aldons P, Edwards H, Stacey M, Finlayson K, Gibb M, Upton Z. Effectiveness of an acellular synthetic matrix in the treatment of hard-to-heal leg ulcers. *International Wound Journal*. 2013; 11(2), 129–137.
76. Chatr-Aryamontri, A.; Breitkreutz, B.-J.; Oughtred, R.; Boucher, L.; Heinicke, S.; Chen, D.; Stark, C.; Breitkreutz, A.; Kolas, N.; O'donnell, L.; Reguly, T.; Nixon, J.; Ramage, L.; Winter, A.; Sellam, A.; Chang, C.; Hirschman, J.; Theesfeld, C.; Rust, J.; Livstone, M. S.; Dolinski, K.; Tyers, M. The BioGRID interaction database: 2015 update. *Nucleic acids research*, v. 43, n. Database issue, p. D470-8, jan. 2015.
77. Wang XQ, Hayes MT, Kempf M, Fraser JF, Liu PY, Cuttle L, Friend LR, Rothnagel JA, Saunders NA, Kimble RM. Fetuin-A: a major fetal serum protein that promotes "wound closure" and scarless healing. *J Invest Dermatol*. 2008 Mar;128(3):753-7
78. Wang XQ, Hung BS, Kempf M, Liu PY, Dalley AJ, Saunders NA, Kimble RM. Fetuin-A promotes primary keratinocyte migration: independent of epidermal growth factor receptor signalling. *Exp Dermatol*. 2010 Aug;19(8):e289-92.

79. Van Baelen H, Bouillon R, De Moor P. Vitamin D-binding protein (Gc-globulin) binds actin. *J Biol Chem.* (1980) 255:2270–2.
80. Meier U, Gressner O, Lammert F, Gressner AM. Gc-globulin: roles in response to injury. *Clin Chem.* (2006) 52:1247–53. 10.1373/clinchem.2005.065680
81. Delanghe JR, Speeckaert R, Speeckaert MM. Behind the scenes of vitamin D binding protein: more than vitamin D binding. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metabol.* (2015) 29:773–86.
82. Goldschmidt-Clermont PJ, Lee WM, Galbraith RM. Proportion of circulating Gc (vitamin D-binding protein) in complexed form: relation to clinical outcome in fulminant hepatic necrosis. *Gastroenterology.* (1988) 94:1454–8.
83. Kew RR. The Vitamin D Binding Protein and Inflammatory Injury: A Mediator or Sentinel of Tissue Damage? *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019 Jul 10;10:470. doi: 10.3389/fendo.2019.00470. eCollection 2019.
84. Redegeld FA, van der Heijden MW, Kool M, Heijdra BM, Garssen J, Kraneveld AD, Van Loveren H, Roholl P, Saito T, Verbeec JS, Claassens J, Koster AS, Nijkamp FP. Immunoglobulin-free Light Chains Elicit Immediate Hypersensitivity-like Responses. *Nat. Med.* 2002 Jul; 8 (7): 694-701.
85. Rijnierse A, Kroese AB, Redegeld FA, Blokhuis BR, van der Heijden MW, Koster AS, Timmermans JP, Nijkamp FP, Kraneveld AD. Immunoglobulin-free light chains mediate antigen-specific responses of murine dorsal root ganglion neurons. *J Neuroimmunol.* 2009 Mar 31;208(1-2):80-6.
86. Braber S, Thio M, Blokhuis BR, Henricks PA, Koelink PJ, Groot Kormelink T, Bezemer GF, Kerstjens HA, Postma DS, Garssen J, Kraneveld AD, Redegeld FA, Folkerts G. An association between neutrophils and immunoglobulin free light chains in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012 Apr 15; 185(8):817-24.
87. Mannello F, Ligi D, Canale M, et al. Omics profiles in chronic venous ulcer wound fluid: innovative applications for translational medicine. *Expert Rev Mol Diagn.* 2014; 14:737-62. doi: 10.1586/14737159.2014.927312. Epub 2014 Jun
88. M'Koma AE, Seeley EH, Washington MK, et al. Proteomic profiling of mucosal and submucosal colonic tissues yields protein signatures that differentiate the inflammatory colitides. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17:875–83.
89. Zuliane-Alvarez L, Midwood KS. Fibrinogen-related proteins in tissue repair: How a unique domain with a common structure controls diverse aspects of wound healing. *Adv Wound Care.* 2015; 4:273-85.
90. Davalos D, Akassoglou K. Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. *Semin Immunopathol.* 2012 Jan;34(1):43-62.

91. Laurens N, Koolwijk P, de Maat MPM. Fibrin structure and wound healing. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 932–9.

8. APÊNDICES

8.1 Apêndice 1 - Gráficos, Tabelas e Figuras

Tabela 1: Distribuição das variáveis clínicas e epidemiológicas dos 8 pacientes incluídos no estudo, antes do tratamento com selante de fibrina.

ID	Sexo	Idade	HAS	DM	Tabagismo	TVP	IMC	Nº de lesões	Membro acometido	AI (CM ²)
1	F	75	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	44,9	1	MID	19,2
2	F	80	SIM	SIM	NÃO	SIM	32,9	1	MIE	24,3
3	F	79	SIM	SIM	NÃO	NÃO	-**	1	MIE	5
4	F	71	SIM	SIM	NÃO	NÃO	39,7	3	MIE	32*
5	F	89	SIM	NÃO	NÃO	SIM	38,4	1	MID	8,4
7	F	55	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	32,6	1	MID	6,3
9	F	55	SIM	NÃO	SIM	SIM	38,2	1	MIE	12,8
10	F	77	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	-**	1	MID	59,6

* Somatória da área de todas as lesões de um mesmo paciente

**Valores não descritos no questionário do estudo Selante I.

ID – Identificação no estudo

HAS – Hipertensão arterial sistêmica

DM – Diabetes mellitus

TVP – Trombose venosa profunda

AI – Área inicial na úlcera venosa em cm² (em T0)

Tabela 2: Distribuição das variáveis clínicas e epidemiológicas das 10 úlceras dos 8 pacientes no momento de admissão ao estudo.

Variáveis	Total n=10
Membro	
MIE	6
MID	4
Localização	
Lateral da perna	3
Medial da Perna	5
Dorso do pé	2
Visita final*	
Após cinco semanas	2
Após seis semanas	3
Após oito semanas	2
Após nove semanas	3
Exsudação**	
Serosa	8*
Sanguinolenta	4*
Intensidade média da dor	4,9 (2,9)
Tempo Médio de Evolução ¹ (Dp)	21 (14,4)
Área média em V0 (Dp)	16,79 (16,9)

¹ Tempo médio de evolução em meses

* A característica do exsudato foi observada de forma independente, sendo assim, uma mesma lesão pode apresentar mais de uma característica.

Tabela 3: Tempo máximo de seguimento em semanas e desfecho da cicatrização de cada UV estudada.

ID	Seguimento* (semanas)	Área final (cm²)	Evolução cicatricial**
1	7 semanas	0	Cicatrização
2	9 semanas	52	Aumento da área inicial
3	9 semanas	14,85	Aumento da área inicial
4	9 semanas	6,25	Diminuição da área inicial
4	6 semanas	0	Cicatrização
4	9 semanas	0	Cicatrização
5	9 semanas	0	Cicatrização
7	6 semanas	0	Cicatrização
9	6 semanas	11,25	Diminuição da área inicial
10	6 semanas	48,8	Diminuição da área inicial

* Período em semanas em que os dados de aspectos clínicos e o exsudato foram colhidos, antes da perda do seguimento.

** Baseada no valor da área em VF quando comparado ao valor da área em V0.

Tabela 4: Identificação das 31 proteínas do exsudato inflamatório, das 10 úlceras venosas submetidas ao tratamento com selante de fibrina do cevap.

ID ^a	Proteína	Código Acesso	M.M. ^b (kDa)	Média V0 ^c (Dp)*	Média VF ^d (Dp)**	Fold Change ^e (VF/V0)	IC95% ^f
P1	Albumin	P02768.2	69	418,8 (149,4)	504,4 (203,0)	1,4 (0,8)	(0,9-1,8)
P2	Transferrin	P02787.3	77	45,3 (10,3)	45,5 (11,2)	1,0 (0,3)	(0,8-1,2)
P3	Ig lambda-2 chain	P0CG05.1	11	40,3 (15,9)	41,9 (16,4)	1,2 (0,6)	(0,8-1,5)
P4	Ig kappa chain	P01834.1	12	29,3 (7,7)	29,2 (5,7)	1,1 (0,3)	(0,9-1,2)
P5	Haptoglobin	P00738.1	45	22,9 (9,8)	22,6 (10,9)	1,0 (0,3)	(0,8-1,1)
P6	Beta-globin	P68871.2	16	22,1 (16,4)	21,9 (30,0)	1,2 (1,1)	(0,6-1,9)
P7	Apo-AI	P02647.1	31	19,2 (7,3)	20,9 (9,3)	1,2 (0,8)	(0,7-1,7)
P8	Ig alpha-1 chain	P01876.2	38	18,2 (5,8)	19,6 (11,1)	1,1 (0,4)	(0,8-1,3)
P9	Ig gamma-1 chain	A0A087WV47		47,6 (18,3)	40,4 (25,2)	0,8 (0,4)	(0,6-1,1)
P10	Complement C3	P01024.2	187	19,5 (9,5)	13,6 (11,8)	0,7 (0,3)	(0,5-0,9)
P11	Apo-AII	P02652.1	11	14,5 (8,1)	15,4 (6,8)	1,2 (0,5)	(0,9-1,5)
P12	Alpha-2-M	P01023.3	163	14,0 (10,0)	8,4 (5,1)	0,8 (0,5)	(0,6-1,1)
P13	Alpha-globin	P69905.2	15	10,6 (6,3)	11,5 (16,1)	1,4 (1,4)	(0,6-2,2)
P14	Alpha-1-antitrypsin	P01009.3	47	10,5 (7,0)	9,9 (6,8)	1,3 (1,2)	(0,7-2,0)
P15	DBP	P02774.1	53	9,0 (4,9)	8,1 (4,7)	0,9 (0,3)	(0,7-1,1)
P16	Ceruloplasmin	P00450.1	122	6,9 (5,4)	4,5 (4,8)	0,5 (0,3)	(0,4-0,7)
P17	Hemopexin	P02790.2	52	5,7 (1,9)	4,6 (2,3)	0,8 (0,4)	(0,5-1,0)
P18	Ig gamma-4 chain	P01861.1	36	28,9 (10,2)	26,9 (15,4)	1,0 (0,5)	(0,7-1,3)
P19	AGP 1	P02763.1	24	6,0 (2,8)	3,9 (2,2)	0,7 (0,4)	(0,5-0,9)
P20	HP1	P59665.1	10	4,4 (2,6)	3,1 (1,2)	1,1 (1,0)	(0,6-1,7)
P21	Ig gamma-2 chain	P01859.2	36	16,0 (6,1)	14,7 (6,4)	1,0 (0,3)	(0,8-1,1)
P22	Ig mu chain	P01871.3	49	3,4 (2,4)	3,8 (4,0)	1,1 (0,8)	(0,7-1,6)
P23	Alpha-1B-glycoprotein	P04217.4	54	3,3 (3,2)	2,8 (2,9)	0,9 (0,5)	(0,6-1,2)
P24	Ig gamma-3	P01860.2	41	27,1 (10,0)	27,5 (13,8)	1,2 (0,6)	(0,8-1,5)
P25	Beta-actin	P60709.1	42	3,6 (1,7)	3,4 (1,9)	0,8 (0,4)	(0,6-1,0)
P27	Complement factor B	P00751.2	86	3,8 (1,8)	2,3 (2,4)	0,6 (0,4)	(0,4-0,7)
P28	Fibrinogen alpha	P02671.2	95	3,5 (3,4)	1,7 (1,6)	0,9 (0,9)	(0,4-1,4)
P30	Complement C4-A	P0C0L4.2	193	1,4 (0,7)	1,0 (0,5)	0,8 (0,5)	(0,5-1,1)

P32	Alpha-2-HS-glycoprotein	P02765.1	39	2,4 (2,0)	1,3 (1,0)	0,9 (1,0)	(0,4-1,6)
P34	Vitronectin	P04004.1	54	1,4 (0,5)	0,5 (0,2)	0,4 (0,1)	(0,3-0,5)
P36	Kininogen-1	P01042-2		1,0 (0,0)	0,9 (0,9)	0,9 (0,9)	(0,4-1,5)

a: Identificação da proteína nos análises e resultados estatísticos.

b: Massa molecular.

c: Média ponderada da contagem peptídica antes do tratamento; * - desvio padrão de c.

d: Média ponderada da contagem peptídica após o tratamento. ** - desvio padrão de d.

e: Média das diferenças relativas de cada proteína.

f: Intervalo de confiança estimado por bootstrap.

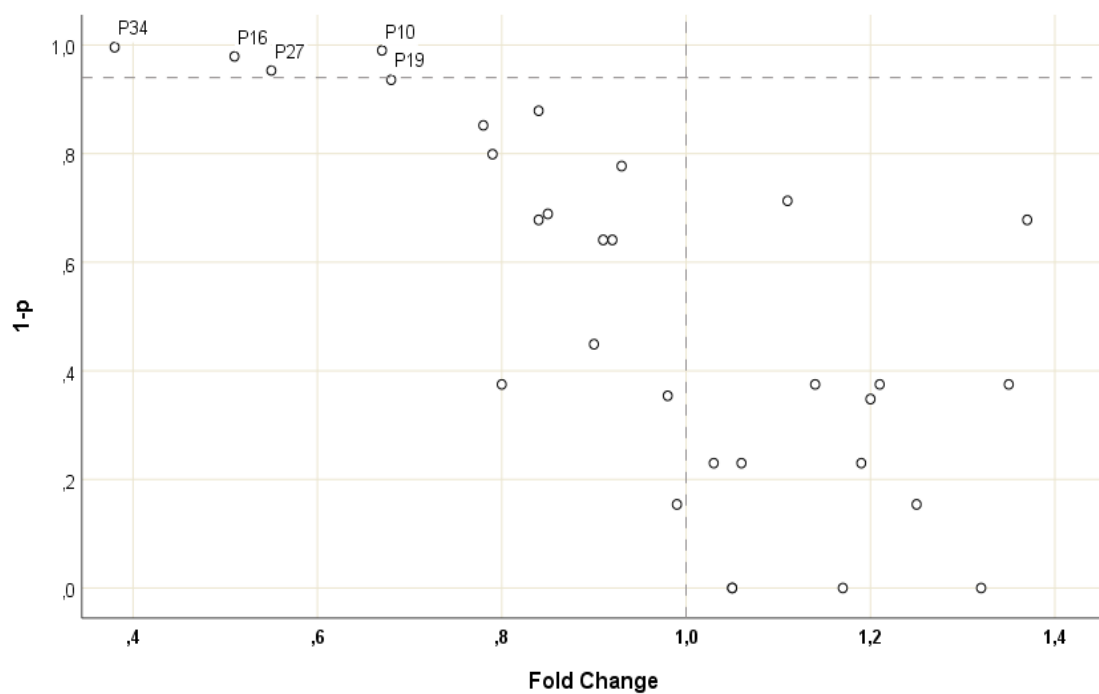


Figura 1: Diagrama de dispersão das proteínas que se expressaram diferentemente antes e após o tratamento com selante de fibrina.

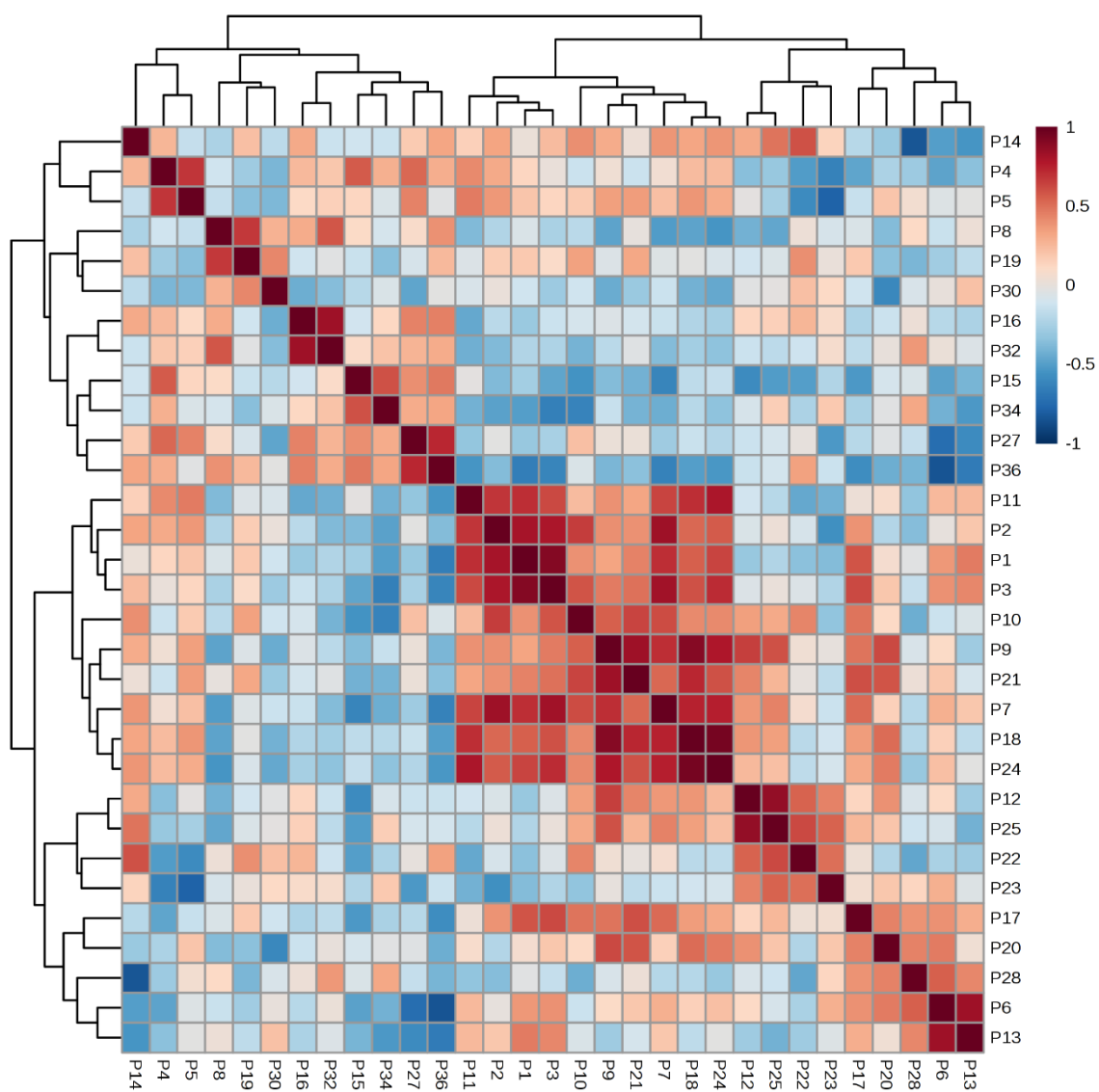


Figura 2: Heatmap das correlações proteína-proteína (forte correlação estimada para valores $<-0,6$ e $>0,6$).

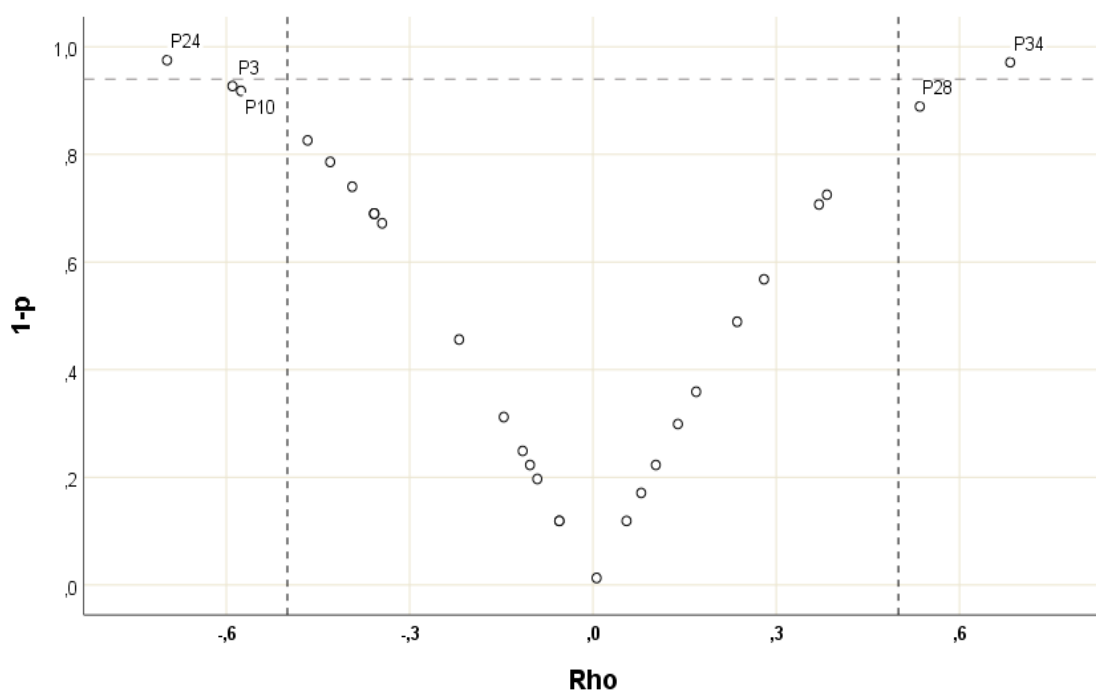


Figura 3: Diagrama Volcano Plot das proteínas que se expressaram diferentemente em úlceras venosas que apresentaram cicatrização (Rho negativo) e não apresentaram cicatrização (Rho positivo). Considerou-se correlação valores de rho <-0,5 ou >0,5.

8.2 Apêndice 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

As úlceras são feridas na pele ou em tecidos mais profundos chamados de epiderme, podendo também atingir os músculos, sendo normalmente encontradas nas pernas ou pés. A causa normalmente está relacionada à obstrução total ou parcial artérias ou veias. As úlceras venosas geralmente ocorrem devido ao aumento da pressão sanguínea dentro das veias nos membros inferiores, e correspondem a maioria (80 a 90%) das úlceras encontradas nesta localização. O conhecimento do processo de cicatrização ou não da ferida pode ajudar na busca por marcadores biológicos, ou seja, substâncias que demonstram se a ferida irá cicatrizar facilmente ou não. Estes marcadores são muito importantes, pois num futuro próximo ajudarão a mudar ou criar novos tratamentos para as feridas. Este projeto pretende estudar e entender melhor o funcionamento das proteínas que estão envolvidas no processo de cicatrização das úlceras antes e após o tratamento dessas lesões com Selante de Fibrina.

Eu, _____
 recebi pessoalmente o convite para participar da pesquisa: “: **Identificação de biomarcadores moleculares prognósticos e diagnósticos de cicatrização no exsudato inflamatório de úlceras venosas crônicas antes e após o tratamento com selante de fibrina.**”, a ser realizada na Unidade de Pesquisa Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, sob responsabilidade da Pesquisadora, Bióloga, Dra. Lucilene Delazari dos Santos e da aluna Nayara Rodrigues Vieira, e todas informações a respeito do mesmo. Fui devidamente informado sobre os objetivos e procedimentos envolvidos que consistem em: responder ao questionário clínico; permitir a captura da imagem da lesão via fotografia digital e permitir o preparo da lesão e coleta do exsudato (líquido expulso pela ferida). A coleta de exsudato será realizada na primeira consulta do paciente, trinta, sessenta e cento e vinte dias após a primeira consulta; Fui informado que os procedimentos realizados não acarretarão nenhum risco para minha saúde e que dados presentes em meu prontuário também poderão ser utilizados na pesquisa. Ficou esclarecido que a minha participação é voluntária e que tenho a liberdade para me retirar da pesquisa em qualquer momento. Fui assegurado que os dados serão mantidos em sigilo e que minha privacidade será resguardada. Declaro que este documento está sendo passado em duas vias, sendo que uma cópia ficará comigo e outra será mantida em arquivo pelo pesquisador. Com a assinatura abaixo, dou consentimento para a incorporação dos meus dados neste estudo.

Qualquer dúvida adicional, poderei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, através do telefone: (14) 3880-1608/ 1609.

Botucatu, de de . _____
 Assinatura do paciente

 Assinatura do pesquisador
 Prof. Dra. Lucilene Delazari dos Santos

 Assinatura do pesquisador
 Nayara Rodrigues Vieira