



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

**Nayara Rodrigues Vieira Cavassan**

**Caracterização de úlceras venosas através da expressão  
de proteínas presentes no exsudato inflamatório**

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

Orientadora: Profa. Dra. Lucilene Delazari dos Santos  
Coorientadora: Profa. Dra. Luciana Patricia Fernandes Abbade

**Botucatu  
2016**

Nayara Rodrigues Vieira Cavassan

Caracterização de úlceras venosas através da  
expressão de proteínas presentes no exsudato  
inflamatório

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

Orientadora: Profa. Dra. Lucilene Delazari dos Santos  
Coorientadora: Profa. Dra. Luciana Patricia Fernandes Abbade

Botucatu  
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. 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.

Caracterização de úlceras venosas através da expressão de proteínas presentes no exsudato inflamatório / Nayara Rodrigues Vieira Cavassan. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Lucilene Delazari dos Santos

Coorientador: Luciana Patricia Fernandes Abbade

Capes: 20801017

1. Cicatrização de ferimentos. 2. Proteômica. 3. Úlcera Varicosa.

Palavras-chave: Cicatrização; Exsudato; Proteômica.

*“A mente que abre uma nova janela, jamais volta ao seu tamanho original.”*

*Albert Einstein*

## Agradecimentos

Sinceros agradecimentos à minha orientadora Dra. Lucilene Delazari dos Santos, pela oportunidade e confiança oferecidos a mim na execução do referido trabalho, pela viabilização na realização do mesmo e pela dedicação e paciência ao compartilhar seus conhecimentos, além da indiscutível amizade e compreensão nos momentos difíceis.

Agradeço à minha coorientadora Dra. Luciana Patricia Fernandes Abbade, por toda dedicação, prontidão, amizade e ajuda dedicados ao projeto e a mim, muito obrigada!

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais, pelas oportunidades de aperfeiçoamento de conhecimento, eficiente assistência acadêmica e pelo empenho em viabilizar um bom curso de pós-graduação aos alunos.

Agradeço à Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) e aos seus funcionários, pela eficiência, prontidão e agilidade no auxílio sempre que solicitado.

Agradeço ao Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), pelo suporte concedido, pelo auxílio financeiro durante a realização deste trabalho, assim como, por todas as oportunidades de crescimento e amadurecimento profissional.

Agradeço ao Ambulatório de Úlceras Crônicas da FMB e aos seus funcionários, pelo acolhimento e por toda ajuda durante o período de coleta de dados.

Agradeço à Unidade de Pesquisa Clínica (UPECLIN), pelo suporte no armazenamento das amostras.

Agradeço à Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX), pela disponibilização de toda sua infraestrutura e equipamentos. Em especial a Dra. Sueli Calvi por ter acolhido este trabalho no laboratório de doenças tropicais.

Agradeço ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), pelo suporte nas análises de espectrometria de massas, em especial, Bianca Alves Pauletti e Romênia Domingues pelo profissionalismo e disposição.

Agradeço profundamente ao Prof. Dr. Hélio Miot, por toda colaboração, desde as análises estatísticas até revisão do texto. Suas observações e incentivos contribuíram para o meu amadurecimento profissional, muito obrigada!

Agradeço à Francilene Capel por toda ajuda durante o preparo das amostras, pelas intermináveis horas de bancada, mas acima de tudo agradeço pela motivação que encontramos na amizade para vencer os obstáculos. Amo você!

Agradeço aos amigos de Bauru, Bia, Bruno, Juliana, Ronaldo, Vanessa e Gabriel, obrigada por tantas vezes abrirem mão da minha presença, por me incentivarem, e por acreditarem nos meus sonhos tanto quanto eu. Amo vocês!

Agradeço à minha família por toda dedicação, incentivo e amor. Obrigada por acreditem em mim!

Agradeço profunda e eternamente à minha mãe, Lucia, sem a qual nada disso ocorreria. Obrigada por acreditar em mim, cultivar meus sonhos e ser a melhor universidade e o melhor curso de pós-graduação que eu poderia cursar.

E por fim, agradeço em especial ao meu marido, Caio Cavassan, por todo amor, pela imensurável dedicação e por todo incentivo. Não existem palavras suficientes para agradecer todos os seus esforços. Obrigada pela caminhada, sem você nada disso aconteceria!

**SUMÁRIO:**

<b>ENUNCIADO DO PROBLEMA.....</b>	<b>01</b>
<b>Referências.....</b>	<b>07</b>
<b>ARTIGO 1.....</b>	<b>11</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>13</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>15</b>
<b>Materiais e Métodos.....</b>	<b>16</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>21</b>
<b>Discussão.....</b>	<b>22</b>
<b>Agradecimentos.....</b>	<b>30</b>
<b>Referências.....</b>	<b>31</b>
<b>Tabela 1.....</b>	<b>37</b>
<b>Tabela 2.....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 1.....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 2.....</b>	<b>42</b>
<b>ARTIGO 2.....</b>	<b>43</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>45</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>46</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>47</b>
<b>Discussão.....</b>	<b>48</b>
<b>Material e Métodos.....</b>	<b>52</b>
<b>Agradecimentos.....</b>	<b>57</b>
<b>Referências.....</b>	<b>58</b>

<b>Tabela 1.....</b>	<b>60</b>
<b>Tabela 2.....</b>	<b>61</b>
<b>Tabela 3.....</b>	<b>64</b>
<b>Figura 1.....</b>	<b>67</b>
<b>Tabela 4.....</b>	<b>68</b>
<b>Figura 2.....</b>	<b>68</b>

## ***Úlcera venosa crônica: enunciado do problema***

Úlcera pode ser definida como qualquer lesão no tecido epitelial, mucosas ou em determinados órgãos, podendo acarretar prejuízo de suas funções básicas. As úlceras podem atingir desde os tecidos epidérmico e dérmico ao tecido conjuntivo adjacente, e mais raramente, o tecido muscular (SAMPAIO et al, 2000).

Define-se esse tipo de lesão em duas categorias: agudas e crônicas. As úlceras agudas são aquelas provenientes de traumas ou processos cirúrgicos, cuja reparação ocorre no período de até seis semanas, não havendo complicações e resultando em uma perfeita restauração anatômica e funcional do tecido (MANDELBAUM ET AL., 2003). Já as úlceras crônicas são lesões que não são reparadas no tempo adequado por apresentarem complicações nas fases de inflamação, proliferação, reepitelização ou remodelação tecidual (MANDELBAUM ET AL., 2003; KRASNER & SIBBLAD, 2001).

As etiologias das úlceras cutâneas são diversas, porém as mais frequentes, as quais atingem cerca de 1,8% da população adulta, são úlceras venosas (UVs), provenientes de complicações tardias da insuficiência venosa crônica dos membros inferiores (CALLAM et al., 1985; GRAHAM et al., 2003; RUCKLEY et al., 2002; MAFFEI et al., 1986). Este tipo de lesão, de ocorrência comum e quando complicadas por infecção ou pela cronicidade representam um grave problema de saúde pública.

No Brasil, particularmente no município de Botucatu, Estado de São Paulo, a prevalência das UVs é de 1,5%, chegando a 4% em indivíduos com idade acima de 65 anos (MAFFEI et al., 1986). Esse dado tem preocupado as autoridades de saúde, haja vista que, atualmente, a população idosa brasileira, ou seja, com idade superior a 60 anos, representa cerca de 19 milhões de indivíduos. De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 10% da população do nosso país se encontra neste grupo de risco. Além disso, estimativas deste Instituto indicam que esse contingente atingirá 32 milhões de pessoas em 2025, tornando o Brasil o sexto colocado no mundo em número de idosos (IBGE, 2010).

As principais complicações que ocorrem nos pacientes com UVs crônicas são: infecções de partes moles, colonização crítica, dermatite de contato, osteomielites e, mais raramente, transformação neoplásica (PHILLIPS et al, 1991). Além disso, a maior consequência dessa enfermidade é o comprometimento da qualidade de vida e da autoestima desses pacientes, que além de dores que

dificultam a locomoção, podem apresentar exsudação da lesão com forte odor (BONGIOVANNI et al., 2006), o que conseqüentemente, pode restringir suas atividades da vida diária e o lazer, levando-os à quadros de frustração e depressão (SALOMÉ et al., 2011).

Os principais métodos destinados à cicatrização da úlcera são o tratamento local e a terapia compressiva. Algumas medidas devem ser tomadas para diminuir a hipertensão venosa crônica e sua repercussão na macro e microcirculação. A terapia compressiva age na macrocirculação, aumentando o retorno venoso profundo, diminuindo o refluxo patológico durante a deambulação e, aumentando o volume de ejeção durante a ativação dos músculos da panturrilha (ZIMMET et al, 1999). A compressão do membro aumenta a pressão tissular favorecendo a reabsorção do edema e melhorando a drenagem linfática (PARTSCH, 1991). Além disso, age na microcirculação diminuindo a saída de líquidos e macromoléculas dos capilares e vênulas para o interstício, podendo estimular também a atividade fibrinolítica (SMITH et al, 1990).

A pressão externa que a compressão deve realizar no tornozelo dos pacientes com UVs é em torno de 35 a 40mmHg e gradualmente menor na região abaixo do joelho. Para atingir os benefícios da compressão o paciente deve ser estimulado a deambular. No tratamento local da ferida é importante o preparo do seu leito. Este é um conceito clínico que se refere ao manejo para acelerar a cicatrização endógena e auxiliar na eficácia das medidas terapêuticas. É um conceito relativamente recente, que proporciona uma abordagem estruturada no tratamento das feridas crônicas. Foi desenvolvido devido ao aumento da compreensão das diferenças entre exsudato de feridas agudas e crônicas e pelo potencial de prejuízo que o fluído de tal ferida causa no leito da lesão (DEALEY, 2008).

No entanto, até o momento, não existe nenhuma uma intervenção terapêutica comprovadamente eficaz (FONDER et al., 2008) para a cura de UVs crônicas. Atualmente, o Ambulatório de Dermatologia da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu atende pacientes semanalmente, com severos casos de UVs, porém, os mecanismos de cicatrização das mesmas não são bem compreendidos, principalmente no que diz respeito a alta recorrência e cronicidade. Paralelamente, os tratamentos terapêuticos disponíveis para UVs crônicas não são efetivos, haja vista que, os esforços iniciais para se aplicar uma terapia eficaz são comprometidos pela falta de informações a respeito do estágio cicatricial das lesões, na chegada

dos pacientes ao serviço de saúde.

Relatos de pacientes e os aspectos clínicos das lesões são as únicas ferramentas para avaliar o grau de cicatrização das UVs. Uma vez que, não existe um método bioquímico prognóstico/diagnóstico precoce para diferenciar úlceras de fácil e difícil cicatrização, se fez a necessidade de buscar marcadores moleculares que possam inferir o estágio de cicatrização das mesmas e, assim, auxiliar a triagem ambulatorial e as terapias existentes.

## **PROTEÔMICA CLÍNICA COMO ESTRATÉGIA DE INVESTIGAÇÃO NA MEDICINA TRANSLACIONAL NA BUSCA DE MARCADORES MOLECULARES**

Diante da problemática de se obter um diagnóstico/prognóstico complementar à rotina ambulatorial vigente, para se distinguir úlceras de fácil e de difícil cicatrização, viu-se a necessidade de se identificar marcadores moleculares de diagnóstico/prognóstico precoces para o desenvolvimento para ambas as demandas. Neste contexto, a caracterização de proteínas presentes nas amostras biológicas tem sido aplicada com sucesso para identificar moléculas como potenciais marcadores prognósticos e diagnósticos, a fim de monitorar o início, o prognóstico e/ou o progresso de uma determinada doença (FERNANDEZ et al., 2008).

Cabe ressaltar que, a abordagem proteômica é o estudo em larga escala das proteínas, usualmente realizado por um conjunto de tecnologias analíticas que isolam e identificam estas proteínas presentes em amostras biológicas complexas simultaneamente (ANDERSON et al., 1996; CELIS et al., 1996; WILKINS et al., 1996; WILKINS et al., 1997). Por sua vez, essas proteínas são responsáveis por controlar a maioria dos processos celulares, podendo agir como enzimas, anticorpos, hormônios, componentes estruturais e receptores celulares (ISFOR, 2002; AEBERSOLD et al., 2003).

Muitos foram os estudos de pesquisa básica publicados até o momento utilizando-se da proteômica para se comparar diferentes estados biológicos em geral, como por exemplo, identificar marcadores moleculares entre sistemas sadios e doentes, resistentes e susceptíveis, com características positivas e normais (SIZOVA et al., 2007). No entanto, a proteômica vem se tornando uma ferramenta importante em estudos de aplicação clínica, a qual tem sido vista como uma das chaves para a descoberta de novas drogas e no desenvolvimento de testes

diagnósticos mais específicos, quando se identifica marcadores moleculares para um determinado quadro clínico (FERNANDEZ et al., 2008; SONG et al., 2014).

A Proteômica Clínica, como é chamada na medicina translacional, tem sido uma das abordagens mais utilizadas com o objetivo de transferir o conhecimento da pesquisa básica para o aperfeiçoamento e a criação de novos métodos para prevenir, diagnosticar e tratar as doenças, bem como a transferência de problemas clínicos, que criam hipóteses, e que podem ser testadas e validadas em laboratórios de pesquisa básica. A necessidade de aplicação clínica tem estimulado a pesquisa de bancada, sendo que novas tecnologias, permitem novas descobertas e vem se transformando em prognósticos efetivos, medicamentos inéditos ou mais eficazes e/ou testes diagnósticos mais específicos (SIZOVA et al., 2007).

Neste contexto, avanços tecnológicos vêm sendo obtidos pela abordagem proteômica em áreas extremamente ativas da biomedicina nos últimos anos. Estes avanços deram ênfase nos estudos que promoveram o aumento de escala de análises e a agilidade na obtenção de métodos mais eficientes para a descoberta de proteínas candidatas à biomarcadores (SANTOS et al., 2012). Desta forma, estes estudos proteômicos têm auxiliado na obtenção de diagnósticos clínicos mais específicos, como por exemplo, casos de osteoartrite (FERNANDEZ et al., 2008), câncer de mama (LI et al., 2002), câncer de próstata (SEMMES et al., 2005), câncer de ovário (ZHANG et al., 2004), mal de Parkinson (ZHANG et al., 2012), mal de Alzheimer e quadros de comprometimento cognitivo (SONG et al., 2014), síndrome de Down em plasma sanguíneo materno (KOLLA et al., 2010), os quais evidenciaram proteínas singulares, que podem ser utilizadas como biomarcadoras moleculares durante uma rotina ambulatorial para o prognóstico e/ou diagnóstico dessas doenças. Estudos proteômicos tem permitido o emprego de metodologias modernas com elevada sensibilidade e resolução para analisar e identificar misturas complexas de proteínas. Conseqüentemente, ela tem sido utilizada para a análise comparativa de uma variedade de fluidos orgânicos, incluindo o líquido das feridas (BROADBENT et al., 2010; ESCALANTE et al., 2009; FERNANDEZ et al., 2008; EDSBERG, 2009) e blister de sucção (KOOL et al., 2007). Sabe-se que, o exsudato das úlceras venosas crônicas é constituído de diversos fatores solúveis liberados no microambiente da úlcera, que por sua vez, podem influenciar nas funções celulares locais. Desta forma, o exsudato é uma biópsia líquida, a qual reflete a condição

metabólica da ferida, sendo, portanto, informações úteis na identificação dos fatores envolvidos no reparo de tecidos (BUCHSTEIN et al., 2009; MOOR et al., 2009; RAYMENT et al., 2008; LAUER et al., 2000).

Os exsudatos inflamatórios de pacientes com úlceras venosas agudas e crônicas já foram alvos de alguns estudos proteômicos, ora contemplando o desenvolvimento de métodos analíticos como remoção de proteínas majoritárias e quantificação de proteínas diferentemente expressas (FERNANDEZ et al, 2008; EMING et al, 2010; EDSBERG et al, 2012), ora detectando e diferenciando moléculas presentes no exsudato colhido na periferia e no interior dessas feridas (EDSBERG et al, 2012; EMING et al, 2010).

Entretanto, os estudos com exsudato inflamatório, até o momento, não indicam quais são os marcadores moleculares específicos nos diferentes tipos de UVs crônicas, ou seja, estes marcadores moleculares identificados até o momento não diferem as úlceras venosas crônicas pelos seus graus de dificuldade de cicatrização, sendo esta informação necessária nos serviços de saúde atualmente, visando o desenvolvimento de intervenções terapêuticas mais robustas e específicas.

## REFERÊNCIAS

- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, v.402, p.198-207, 2003.
- ANDERSON, N.L. Twenty years of Two-dimensional electrophoresis: past, present and future. *Electrophoresis*, v.17, p. 443-453, 1996.
- BONGIOVANNI, C.M.; HUGHES, M.D.; BOMENGEN, R.W. Accelerated wound healing: multidisciplinary advances in the care of venous leg ulcers. *Angiology*, v.57, n.2, p.139-44, 2006.
- BROADBENT, J.; WALSH, T.; UPTON, Z. Proteomics in chronic wound research: Potentials in healing and health *Proteomics: Clin. Appl.*, v.4, p.1–11, 2010.
- BUCHSTEIN, N.; HOFFMANN, N.; SMOLA, H.; LANG, S.; PAULSSON, M.; NIEMANN, C.; KRIEG, T.; EMING, S.A. Alternative proteolytic processing of hepatocyte growth factor during wound repair. *Am. J. Pathol.*, v.174, n.6, p.2116–2128, 2009.
- CALLAM, M.J.; RUCKLEY, C.V.; HARPER, D.R.; DALE, J.J. Chronic ulceration of the leg: extent of the problem and provision of care. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed)*, v.290, p.1855-6, 1985.
- CELIS, J.E.; GROMOV, P.; OSTERGAARD, M.; MADSEN, P.; HONORÉ, B.; DEJGAARD, K.; OLSEN, E.; VORUM, H.; KRISTENSEN, D.B.; GROMOVA, I.; HAUNSO, A.; VAN DAMME, J.; PUYPE, M.; VANDEKERCKHOVE, J.; HOLM RASMUSSEN, H. Human 2-D PAGE databases for proteome analysis in health and disease: <http://biobase.dk/cgi-bin/celis>. *FEBS Letters*, v.398, p.129-134. 1996.
- DEALEY, C. *Cuidando de feridas: um guia para as enfermeiras*. 3a, editor. São Paulo: Atheneu; 2008.
- EDSBERG, L.E. Proteomics approaches for studying the phases of wound healing. In *Bioengineering Research of Chronic Wounds*, SMTEB 1; Gefen, A., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, p.343– 362, 2009.
- EDSBERG, L.E.; WYFFELS, J.T.; BROGAN, M.S.; FRIES, K.M. Analysis of the profile of chronic pressure ulcers. *Wound Rep Reg*, v.20, p.378-401, 2012.
- EMING, S.A; KOCK, M.; KRIGER, A; BRACHVOGEL, B.; KREFT, S.; BRUCKNER-TUDERMAN, L.; KRIEG, T.; SHANNON, J.D.; FOX, J.W. Differential proteomic analysis distinguishes tissue repair biomarker signatures in wound exsudates obtained from normal healing and chronic wounds. *Journal of Proteomic Research*, v.9, 4758-4766, 2010.
- ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A.; PINTO, A.F.; TERRA, R.M.; GUTIÉRREZ, J.M.; FOX, J.W. Wound exudate as a proteomic window to reveal different mechanisms of tissue damage by snake venom toxins. *J. Proteome Res.*, v.8, n.11, p.5120– 5131, 2009.

FERNANDEZ, M.L.; BROADBENT, J.A.; SHOOTER, G.K.; 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.*, v.158, n. 2, p.281– 290, 2008.

FONDER, M.A.; LAZARUS, G.S.; COWAN, D.A.; ARONSON-COOK, B.; KOHLI, A.R.; MAMELAK, A.J. Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v.58, p.185– 206, 2008.

GRAHAM, I.D.; HARRISON, M.B.; NELSON, E.A.; LORIMER, K.; FISHER, A. Prevalence of lower-limb ulceration: a systematic review of prevalence studies. *Adv. Skin Wound Care*, v.16, n.6, p.305-16, 2003.

IBGE. Censo Demográfico, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2010.

ISFOR, R.J. Proteomics analysis of striated muscle. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sci.*, v.771, p.155-165. 2002.

KOLLA, V.; JENO, P.; MOES, S.; TERCANLI, S.; LAPAIRE, O.; CHOOLOANI, M.; HAHN, S. Quantitative proteomics analysis of maternal plasma in Down syndrome pregnancies using isobaric tagging reagent (iTRAQ). *J Biomed Biotechnol*, v. 2010, p.952047, 2010.

KOOL, J.; REUBSAET, L.; WESSELDIJK, F.; MARAVILHA, R.T.; PINKSE, M.W.; D'SANTOS, C.S.; VAN HILTEN, J.J.; ZIJLSTRA, F.J.; HECK, A.J. Suction blister fluid as potential body fluid for biomarker proteins. *Proteomics*, v.7, n.20, p.3638– 3650, 2007.

LAUER, G.; SOLLBERG, S.; COLE, M.; FLAMME, I.; MANN, K.; KRIEG, T.; EMING, S.A. Expression and Proteolysis of VEGF is increased in chronic wounds. *J. Invest. Dermatol.*, v.115, p.12– 18, 2000.

LI, J.; ZHANG, Z.; ROSENZWEIG, J.M. et al. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clin Chem*, v.48, p.1296–304, 2002.

MAFFEI, F.H.A.; MAGALDI, C.; PINHO, S.Z. Varicose veins and chronic venous insufficiency in Brazil: prevalence among 1755 inhabitants of a country town. *Int J Epidemiol.*, v.15, p.210-7, 1986.

MANDELBAUM, S.R.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares. Parte I. *An. Bras. Dermatol*, v.78, n. 4, p.393-408, 2003.

MOOR, A.N.; VACHON, D.J.; GOULD, L.J. Proteolytic activity in wound fluids and tissues derived from chronic venous leg ulcers. *Wound Repair Regen*, v.17, n. 6, p.832– 839, 2009.

PARTSCH, H. Compression therapy of the legs. A review. *J Dermatol Surg Oncol.*, v.17, n. 10, p.799-805, 1991.

PHILLIPS, T.J.; DOVER, J.S. Leg ulcers. *J Am Acad Dermatol.*, v.25, p.965-87, 1991.

RAYMENT, E.A.; UPTON, Z.; SHOOTER, G.K. Increased matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity observed in chronic wound fluid is related to the clinical severity of the ulcer *Br. J. Dermatol*, v.158, n.5, p.951– 961, 2008.

RUCKLEY, C.V.; EVANS, C.J.; ALLAN, P.; ET, A.L. Chronic venous insufficiency: clinical and duplex correlations. The Edinburgh Vein Study of venous disorders in the general population. *J. Vasc. Surg.*, v.36, p.520–5, 2002.

SALOMÉ, G.M.; PELLEGRINO, D.M.S.; BLANES, L.; FERREIRA, L.M. Self-esteem in patients with diabetes mellitus and foot ulcers. *J Tissue Viability*, v.20, n.3, p.100-6, 2011.

SAMPAIO, S.A.P; RIVITTI, E.A. Glossários Dermatológicos. In: Sampaio SAP, Rivitti EA, editors. *Dermatologia*. 2a ed. São Paulo: Ed Artes Médicas; p. 71-8, 2000.

SANTOS, H.M.; LODEIRO, C.; CAPELO, J.L. Analytical proteomics: an emerging field? *J Proteomics.*, v.73, n.8, p.1411-4, 2010.

SIBBALD et al., Venous leg ulcers. In : KRASNER, D. L., SIBBLAD, R. G. *Chronic wound care: a clinical source book for healthcare profesionias*. 3. ed. Suite: HMP Communications, p. 483-93, 2001.

SIZOVA, D.; CHARBAUT, E.; DELALANDE, F.; POIRIER, F.; HIGH, A.A.; PARKER, F; DORSSELAER, A.V.; DUCHESNE, M.; DIU-HERCEND, A. Proteomics analysis of brain tissue from an Alzheimer's disease mouse model by two-dimensional difference gel electrophoresis. *Neurobiology of Aging*, v.28, p.357-370, 2007.

SMITH, P.C.; SARIN, S.; HASTY, J.; SCURR, J.H. Sequential gradient pneumatic compression enhances venous ulcer healing: a randomized trial. *Surgery*, v.108, n.5, p.871-5, 1990.

SONG, F.; POLJAK, A.; KOCHAN, N.A.; RAFTERY, M.; BRODATY, H.; SMYTHE, G.A.; SACHDEV, P.S. Plasma protein profiling of Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's disease using iTRAQ quantitative proteomics. *Proteome Science*, v.12, p.5, 2014.

WILKINS, M. R.; PASQUALI, C.; APPEL, R. D.; OU, K.; GOLAZ, O.; SANCHEZ, J. C.; JAN, J. X.; GOOLEY, A. A.; HUGHES, E.; HUMPHERY-SMITH, I.; WILLIAMS, K. L.; HOCHSTRASSER, D. F. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Nature Biotechnology*, v.14, p.61-65, 1996.

WILKINS, M.R.; WILLIAMS, K.L.; APPEL, R.D.; HOCHSTRASSER, DF. *Proteome research: new frontiers in functional genomics*. Germany: Springer-Verlag, v.243, 1997.

ZHANG, X.; YIN, X.; YU, H.; LIU, X.; YANG, F.; YAO, J.; JIN, H.; YANG, P. Quantitative proteomic analysis of serum proteins in patients with Parkinson's disease using an isobaric tag for relative and absolute quantification labeling, two-dimensional liquid chromatography, and tandem mass spectrometry. *Analyst*, v.137, p.490, 2012.

ZHANG, Z.; BAST, R.C.; YU, Y. et al. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res.*, v.64, p.5882–90, 2004.

ZIMMET, S.E. Venous leg ulcers: modern evaluation and management. *Dermatol Surg.*, v. 25, n.3, p.236-41, 1999.

**Artigo 1 preparado para o periódico**

***British Journal of Dermatology***

**Artigo Original**

**CARACTERIZAÇÃO PROTEÔMICA DO EXSUDATO DE ÚLCERAS VENOSAS CRÔNICAS E SUA RELAÇÃO COM ASPECTOS CLÍNICOS**

N.R.V. Cavassan<sup>1</sup>; C.C. Camargo<sup>1</sup>; L. G. Pontes<sup>1</sup>; H.A. Miot<sup>2</sup>; B. Barraviera<sup>1,3</sup>; R.S. Ferreira Jr.<sup>1,3</sup> L.P.F. Abbade<sup>2</sup>; L.D. Santos<sup>1,3</sup>

1. Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais, Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu, SP, Brasil.
2. Departamento de Dermatologia e Radiologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu, SP, Brasil.
3. Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo – Brasil.

**Endereço de Correspondência:**

Lucilene Delazari dos Santos

Avenida José Barbosa de Barros, 1780

18610-307 - Botucatu/São Paulo - Brasil

Fone/FAX: 55 (14) 3880-7108

Email: lucilene@unesp.cevap.br

**Fonte de financiamento:** FAPESP n. processo 2014/13299-7

**Conflito de interesse:** Não se aplica

## RESUMO

**Introdução:** Úlceras venosas crônicas atingem até 4% da população mundial >65 anos, causando impacto socioeconômico, principalmente relacionado à diminuição da mobilidade e autoestima. O exsudato destas lesões, pode ser útil na identificação dos fatores envolvidos na reparação tecidual. **Objetivos:** Identificar proteínas expressas no exsudato de úlceras venosas, agrupando-as de acordo com suas principais funções, e correlacionando-as com variáveis clínicas e epidemiológicas.

**Métodos:** Estudo clínico do tipo transversal, descritivo e analítico envolvendo trinta e sete úlceras de 28 pacientes. Todos os pacientes foram submetidos à questionário clínico-epidemiológico auto descritivo, análise de área e a coleta de exsudato das úlceras. Fluidos das lesões foram submetidos à digestão trípica em solução e sequenciados por espectrometria de massas para identificação do perfil proteômico. A análise multivariada entre dados clínicos e expressão proteica do exsudato foi explorada por escalonamento multidimensional, a partir da distância euclidiana entre as variáveis. **Resultados:** A maioria dos pacientes era do sexo feminino (62%), com idade média de 70( $\pm$ 10.1) anos, relatando adesão à compressão e ao repouso, histórico de varizes primárias e hipertensão arterial sistêmica, apresentando tecido desvitalizado no leito da ferida e tempo de evolução >10 anos. Foram identificadas 74 proteínas no exsudato, agrupadas de acordo com sua principal função na cicatrização. O perfil proteômico evidenciou principalmente moléculas envolvidas em processos imunes. Entretanto, após correlação com dados clínicos se destacam quatro interações: Albumina vs. tempo de evolução; apolipoproteína A-II vs. idade do paciente; complemento C4-B vs. área; e apolipoproteína A-IV vs. colonização.

**Conclusão:** O perfil proteico do exsudato de úlceras venosas foi caracterizado proteomicamente, identificando-se maior prevalência de proteínas do sistema imune

e transportadoras. Houve associação entre expressão e características clínicas como: tempo de evolução; idade; área e colonização, evidenciando a interação de elementos clínicos e epidemiológicos no microambiente da ferida.

**Palavras-chaves:** Análise Proteômica, exsudato inflamatório, úlceras venosas crônicas.

## **INTRODUÇÃO**

Úlceras crônicas caracterizam-se por lesão da integridade da pele por mais de seis semanas, e são afecções comumente encontradas nos membros inferiores da população idosa. A maioria das úlceras de perna crônicas são de etiologia venosa, associadas a complicação tardia da insuficiência venosa crônica dos membros inferiores <sup>(1-3)</sup>. As úlceras venosas (UVs) crônicas estão associadas à diminuição da qualidade de vida, causando impacto social e econômico, principalmente relacionado à diminuição da mobilidade e autoestima. Dor, secreção, odor e recorrência das lesões contribuem para o afastamento do paciente das atividades profissionais e limitam o cumprimento das atividades cotidianas <sup>(4,5)</sup>.

Estudos de base populacional demonstraram prevalência de UVs ativas entre 0,12% e 1,1%, atingindo 1,8% entre úlceras ativas e cicatrizadas, e até 4% nas populações acima de 65 anos <sup>(6-8)</sup>.

A cicatrização tecidual envolve uma complexa rede de sinalização, que inclui: fatores de crescimento e seus receptores, proteínas de matriz extracelular, diferentes classes de proteases, bem como seus inibidores <sup>(9)</sup>. A interação desses mediadores, de forma organizada, dirige a restauração da pele por epitelização de estruturas dérmicas formando o tecido de granulação com deposição de matriz de reparo. O exsudato inflamatório das UVs é uma mistura complexa e dinâmica dessas proteínas que modulam o ambiente da ferida, podendo refletir o estado global de cicatrização, indicando o estado de cura da ferida, sendo portanto, útil na identificação dos fatores envolvidos na reparação ou não dos tecidos <sup>(10-14)</sup>.

A espectrometria de massas tem se tornado uma importante ferramenta analítica na caracterização de UVs por meio da identificação de proteínas no exsudato inflamatório. Essa caracterização visa ajudar na melhor compreensão da

cicatrização retardada em feridas crônicas pelo entendimento das diferentes funções que as proteínas desempenham no microambiente da ferida, assim como, definir como dados clínicos e epidemiológicos interagem com o perfil proteômico.

Desta forma, este estudo objetivou identificar as proteínas expressas no exsudato de UVs, agrupando-as de acordo com suas principais funções, e correlacionando-as com variáveis clínicas e epidemiológicas, a fim de auxiliar o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas para melhorar a eficácia dos tratamentos atuais, bem como novas intervenções terapêuticas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Tipo de Estudo**

Estudo clínico do tipo transversal, descritivo e analítico.

### **População do Estudo**

Trinta e sete UVs foram incluídas de vinte e oito pacientes maiores de 18 anos, atendidos no ambulatório de Úlceras Crônicas da FMB – UNESP, portadores de uma ou mais UVs ativas, confirmadas por de exame de ultrassonografia “Döppler” vascular (DV 610B), com diâmetro de dois a 15 cm lineares e com evolução maior do que seis semanas. Úlceras de outra etiologia, associadas à doença arterial periférica ou com tecido necrótico foram desconsideradas. Os pacientes foram incluídos consecutivamente à sua ordem de chegada ao serviço de atendimento.

Todos os pacientes foram submetidos à questionário clinico-epidemiológico com questões relevantes à pesquisa e requeridos quanto ao conhecimento e aprovação do uso do seu material biológico para pesquisa acadêmica 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 pragmática do dermatologista responsável.

### **Análise da Área da Úlcera**

O desenho dos contornos de cada UVs 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 fotografias dos desenhos e referenciais de todas as UVs, que, após serem transferidas para computador puderam ser analisadas individualmente no software Image J 1,46v <sup>(15)</sup>. A área foi estimada a partir da relação (pixels/cm) de cada UV.

### **Coleta e Preparo do Material**

A coleta do exsudato foi realizada no local de atendimento, baseada em protocolo elaborado por Fernandez *et al.* <sup>(16)</sup>. Primeiramente a úlcera foi lavada com solução salina a 0,9% (m/v) de cloreto de sódio para limpeza, sendo posteriormente seca com gaze estéril. A 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 afim de aguardar a exsudação natural do tecido. O exsudato acumulado entre o leito da UV e o curativo foi coletado com auxílio de uma micropipeta com ponteira estéril e descartável, sendo então transferido para tubos plásticos LoBind (Eppendorf®), identificados e armazenados em caixa refrigerada até a chegada ao laboratório, onde foram centrifugados à

14.000 x g a 4°C durante 10 minutos para sedimentação dos debrís celulares. O sobrenadante coletado e estocado a -80°C até o uso.

### **Quantificação de proteínas**

As proteínas presentes no exsudato foram então quantificadas em triplicata pelo método de Bradford <sup>(17)</sup> (BioRad®; Protein Assay, cod. 500-0001), tendo albumina bovina (BSA), como proteína padrão. Após esse procedimento as amostras foram transferidas para novos tubos plásticos LoBind (Eppendorf®) e diluídas em NaCl à 0,9% (m/v) para serem padronizadas quanto a sua concentração, estabelecendo-se a relação 50µg/40µL para cada amostra.

### **Digestão proteica em solução**

As amostras foram digeridas em solução iniciando-se pelas etapas de redução e alquilação, utilizando ditioneitol (DTT) 10 mM e iodoacetamida (IAA) 45 mM, respectivamente, ambos solubilizados em solução de bicarbonato de amônio 50 mM. Em seguida, as amostras foram submetidas à digestão proteolítica na presença da enzima tripsina na concentração 1:50 (enzima:substrato), solubilizada em tampão bicarbonato de amônio 50 mM, pH 7.8. A hidrólise ocorreu por 18 horas, sendo interrompida com a adição de ácido fórmico 1% (v/v) em relação ao volume da amostra. Estas foram então dessalinizadas utilizando-se cartuchos Sep-Pak Vac C18 (Waters). As amostras digeridas e dessalinizadas foram reduzidas em SpeedVac™ (Thermo Scientific) e mantidas a 4°C até o momento da análise por espectrometria de massas.

## **Sequenciamento Peptídico por Espectrometria de Massas**

As análises de espectrometria de massas foram realizadas no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), localizado no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) em Campinas-SP. As amostras foram solubilizadas em 60  $\mu$ L de solução ácido de fórmico 0,1 % (v/v) e em seguida, uma alíquota de 15  $\mu$ L dos digestos trípticos de cada amostra foram injetados individualmente em uma coluna analítica C18, 1,7 $\mu$ m BEH 130 (100  $\mu$ 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 Da.

### **Análise dos dados para a identificação de proteínas**

A identificação das proteínas a partir dos dados de espectrometria de massas (LC MS-MS), foi realizada por meio da ferramenta de bioinformática 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.

Cabe ressaltar que 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 toda 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, e considerou-se a média da contagem de íons das três análises de cada proteína como variáveis de estudo. Após identificação as proteínas foram agrupadas de acordo com as funções mais importantes desempenhadas pelas mesmas e posteriormente as principais proteínas em cada grupo envolvidas no processo de cicatrização foram caracterizadas. As interações proteicas foram ainda exploradas quanto as suas funções moleculares, processos biológicos e componentes celulares, pela ferramenta STRING 10.

### **Análise Estatística**

A correlação multivariada entre os dados clínicos e a expressão das diferentes proteínas do exsudato das UVs foi explorada pelo método do escalonamento multidimensional (PROXCAL), a partir da distância euclidiana entre as variáveis, afim de se estabelecer proximidade no espaço multidimensional de cada proteína com as variáveis clinico-epidemiológicas, como estimativas de correlação. Todas as variáveis foram escalonadas (0 a 1) e os dados analisados no IBM SPSS 22<sup>(18)</sup>.

## RESULTADOS

Após triagem de 42 indivíduos com diagnóstico de UVs, um total de 37 UVs de 28 pacientes com idade média de 70 ( $\pm 10.1$ ) anos foram incluídas ao estudo. A mediana das áreas das lesões observadas foi de 16,85 cm<sup>2</sup> (Q1 10,64 e Q3 30,40), a maioria delas estavam presentes em indivíduos do sexo feminino (62%), com raça declarada branca, com tempo de evolução maior a 10 anos, apresentando tecido desvitalizado no leito da ferida. Além disso, grande parte dos pacientes relatou adesão à compressão e ao repouso, histórico de varizes primárias e hipertensão arterial sistêmica (HAS) (Tabela 1).

Setenta e quatro proteínas totais foram identificadas e posteriormente foram agrupadas de acordo com a principal função desempenhada pelas mesmas no processo de cicatrização e resposta local da lesão em seis categorias: transportadoras, imunomoduladoras, proteínas de matriz, inibidores de protease, componentes genéticos e atividade antimicrobiana (Tabela 2). Informações adicionais sobre os dados de identificação proteica se encontram na seção de Materiais Suplementares deste periódico.

Das proteínas identificadas, vinte e seis se relacionaram à processos imunes, sendo a categoria de proteínas imunomoduladoras a mais abundante nestas amostras biológicas, seguidas por 19 proteínas da matriz extracelular, 15 proteínas de transporte, 5 proteínas que atuam com atividade antimicrobiana, 5 proteínas que atuam como inibidores de proteases e 4 proteínas de componente genético. Posteriormente, as interações conhecidas e previsíveis entre as proteínas foram exploradas para funções moleculares, processos biológicos e componentes celulares (Figura 1).

O exsudato inflamatório das UVs foi obtido de lesões em diferentes etapas de

cicatrização, sendo assim, as proteínas das amostras refletem um perfil global dos pacientes atendidos no serviço ambulatorial.

Após a caracterização do exsudato das UVs estudadas, os dados clínicos e proteômicos foram explorados a partir do escalonamento multidimensional. As proteínas que apresentavam menor distanciamento com as variáveis clínico-epidemiológicas foram: tempo de evolução vs. albumina; idade vs. Apolipoproteína A-II; área vs. Complemento C4-B e colonização vs. Apolipoproteína A-IV (Figura 2).

## **DISCUSSÃO**

Nesta investigação, verificou-se uma população de indivíduos predominantemente composta por pacientes do sexo feminino, idosos, aderentes à compressão e ao repouso, portadores de histórico de varizes primárias e HAS, como já observado em outros estudos com lesões crônicas. Além disso, foi possível observar nas UVs uma predominância de lesões ativas a mais de 10 anos e com tecido do leito desvitalizado, fatores relacionados a alta cronicidade deste tipo de ferida <sup>(19-28)</sup>.

A abordagem proteômica tem sido amplamente utilizada como uma ferramenta na avaliação de UVs no que se refere a etapa de cicatrização por meio da expressão diferencial das proteínas presentes em seus exsudatos inflamatórios e envolvidas no processo de reparo. Há um forte consenso entre os pesquisadores sobre as proteínas expressas no fluido de feridas, atuarem como importantes moduladores no ambiente da lesão. Por sua vez, estas proteínas podem refletir o estágio e a condição de cicatrização das UVs e, auxiliar na compreensão do processo cicatricial <sup>(16, 29, 30)</sup>.

Um dos trabalhos pioneiros utilizando abordagem proteômica de exsudatos

de UVs foi realizado por Fernandez e colaboradores <sup>(16)</sup>, os quais identificaram 16 proteínas por LC-ESI-MS/MS, classificando estas moléculas como responsáveis por atuar nas fases de coagulação, aguda e fibrinolítica da cicatrização, além do transporte de substâncias <sup>(16)</sup>. Já Edsberg et al. <sup>(31)</sup> analisaram os exsudatos de 46 úlceras de pressão com no mínimo 4 semanas de evolução, utilizando LC-ESI-MS/MS com auxílio de marcações por isótopos (iTRAQ, Applied Biosystems, Foster City, CA), encontrando 381 proteínas totais.

Estudos comparativos entre úlceras agudas provenientes de processos cirúrgicos e UVs crônicas foram realizados por Eming et al. <sup>(32)</sup> por meio da mesma estratégia *shotgun*, e análises em LC-ESI-MS/MS, tendo 149 proteínas identificadas no total. A diferença de expressão entre úlceras agudas e crônicas já foi descrita por outros autores, ressaltando uma maior concentração de proteínas pró inflamatórias e disfunções em proteínas da matriz extracelular em lesões com dificuldade de cicatrização <sup>(32-34)</sup>.

Tendo em vista a utilização de amostras biológicas similares, a diferença entre o número de proteínas encontradas nos estudos em relação a este trabalho pode ser explicada pelo tempo de evolução das lesões e pelas técnicas de investigação proteômica adotadas em cada abordagem, bem como as distintas sensibilidades e resoluções dos equipamentos utilizado em cada análise. Porém, comparativamente, o número de proteínas em estudos com UVs tenha variado, o perfil das funções que as mesmas desempenham no microambiente da lesão apresentou-se constante, principalmente, devido a presença de proteínas com ação imunomoduladora, de matriz extracelular, e de transporte <sup>(31-35)</sup>.

A maioria das proteínas identificadas neste trabalho apresentam funções imunomoduladoras. Acredita-se que, estas proteínas estejam envolvidas em

processos de ativação do sistema complemento, marcação de antígenos, ativação ou inibição de apoptose e lise celular, indução da resposta inflamatória e participando de vários processos do sistema imune inato e específico <sup>(32,35)</sup>. Das 35 proteínas imunomoduladoras identificadas neste estudo, complemento C3 foi a mais abundante. A molécula quimiotática C3 é a principal moduladora da resposta inflamatória que ocorre no dano tecidual, atuando na ativação do sistema complemento. Este processo se dá pela hidrólise da mesma liberando os fragmentos C3a e C3b. Por sua vez, estes fragmentos são depositados nas membranas de células danificadas, os quais são reconhecidas pelo sistema complemento ativado, levando a uma cascata de eventos responsáveis por induzir a inflamação e posteriormente, a fagocitose ou outros mecanismos para eliminação das células lesadas. Disfunções na cicatrização podem ocorrer quando há uma perda na tolerância do sistema complemento aos fragmentos de C3, induzindo assim, mecanismos autoimunes, a cronicidade e dano tecidual <sup>(36, 37)</sup>.

As proteínas de matrizes são moléculas estruturais que podem mediar a motilidade, orientação e adesão celular, contribuindo para a reparação de feridas e estabilização de lesões. 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 <sup>(32,38)</sup>.

Proteínas de transporte são responsáveis pelo transporte sistêmico de

muitos gases e íons, auxiliando no controle da homeostasia e osmolaridade dos tecidos. A albumina é uma proteína transportadora de zinco abundante nos fluidos humanos, principalmente, no exsudato de úlceras em geral. Por sua vez, o zinco atua no crescimento tissular e cicatrização, bem como em funções imunes e na síntese de colágeno. Os níveis de zinco no microambiente e alguns fatores de reconstrução do tecido podem diminuir pelo excesso de exsudação de algumas feridas, e, conseqüentemente, impedir que uma úlcera se cicatrize. Sendo assim, é comum feridas crônicas em franco progresso de cicatrização apresentarem elevados níveis de albumina <sup>(39-41)</sup>.

As úlceras de perna não constituem um ambiente estéril. Elas estão muitas vezes associadas à presença de microrganismos como bactérias e fungos, os quais podem afetar a cicatrização por meio da produção de toxinas e de biofilme, criando uma barreira química e física contra o sistema imune do hospedeiro e a entrada de demais substâncias <sup>(42,43)</sup>. Neste contexto, algumas proteínas parecem desempenhar atividade antimicrobiana contra uma variedade de microrganismos. *Neutrophil defensin 1* é uma proteína da família das defensinas estocada nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos, a qual tem como função aumentar a permeabilidade das células bacterianas. Todavia, esses fatores antimicrobianos não são específicos aos patógenos, e caso haja uma estimulação contínua e desregulada de neutrófilos no sítio da lesão, uma auto degradação dos fatores de crescimento tissular pode ocorrer dificultando a regeneração <sup>(44)</sup>.

Cinco proteínas constitutivas do DNA e que atuam na regulação de funções cromossômicas durante a mitose foram encontradas nas UVs crônicas neste trabalho. A proteína Histona H2A tipo 2-C se mostrou mais abundante entre as moléculas que compreendiam o grupo de componentes genéticos. Desta forma, sua

expressão pode estar relacionada a proliferação celular e, conseqüentemente, na cicatrização das feridas, bloqueando ou estimulando a síntese de proteínas importantes do processo de cicatrização (45, 46).

Níveis elevados de proteases são comuns em processos inflamatórios persistentes, como os encontrados em UVs crônicas, caracterizando assim, um quadro de proteólise descontrolada. Inibidores de proteases podem proteger o microambiente da úlcera em um processo inflamatório desordenado (32). A molécula alpha-2-macroglobulina identificada neste trabalho como um dos inibidores mais abundantes atua impedindo a ação de componentes relacionados ao processo inflamatório e, conseqüentemente, permitindo que o processo de cicatrização seja restaurado na lesão.

Uma vez caracterizado o perfil proteômico das UVs e categorizadas as 74 proteínas identificadas no fluido destas lesões, explorou-se de forma multivariada as variáveis clínicas e epidemiológicas com o perfil proteômico, a fim de avaliar a existência de interações. Neste contexto, verificou-se que quatro variáveis clínicas e epidemiológicas apresentaram correlação com quatro proteínas identificadas: albumina com o tempo de evolução da úlcera; apolipoproteína A-II com a idade do paciente; Complemento C4-B à área enquanto que Apolipoproteína A-IV com a colonização da úlcera.

As UVs de pernas têm sido conhecidamente descritas como lesões com maior proporção entre a população idosa, com idade média variando dos 60 aos 75 anos (19-22). Pessoas nessa faixa etária estão mais susceptíveis à desidratação e deficiência nutricional, que contribui para a redução nos níveis séricos de albumina e zinco, porém, alguns estudos têm relatado diminuições substanciais destes níveis a partir dos 40 anos de idade, culminando em quadros de déficit no transporte e

diminuição de zinco sistêmico <sup>(47-49)</sup>. Desta forma, os autores do presente trabalho corroboram a relação entre a presença da proteína albumina e o tempo de evolução da lesão na população idosa, uma vez que, um quadro de deficiência do zinco sérico pode interferir na síntese de colágeno no microambiente da ferida, aumentando o tempo de evolução das lesões.

Outra interação encontrada no presente trabalho foi idade e apolipoproteína (APO) AII. As APOs dos tipos AI e AII (APOAI e APOAII) formam o composto HDL (*High density lipoprotein*), ao se ligarem aos lipídios. As funções específicas da APOAII não são bem conhecidas, contudo, acredita-se que a mesma quando livre da ligação com HDL, se une às partículas livres de compostos VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*), tidos como “colesteróis ruins”, realizando assim, seu transporte reverso e, conseqüentemente, desempenha uma função protetora contra aterosclerose <sup>(50)</sup>. Xavier et al. <sup>(51)</sup> demonstraram que há um aumento de casos de aterosclerose a medida que ocorre um envelhecimento da população. Então sugere-se que, o aumento de aterosclerose na população idosa pode estar relacionado à diminuição nos níveis de APOs ao carrear os compostos VLDL plasmáticos e induzir assim, uma maior deposição dos mesmos nas paredes das veias e artérias. A aterosclerose está relacionada também ao desenvolvimento da trombose venosa profunda (TVP), fator crucial para o aumento do risco de aparecimentos das UVs crônicas <sup>(52)</sup>.

As APOs do grupo AIV (APOAIV), assim como as demais do grupo A, também tem funções relacionadas a mobilização do colesterol e a inflamação por comporem o HDL <sup>(53)</sup>. Sua correlação foi associada a colonização das UVs neste estudo. Infecções bacterianas são a principal causa das sepsemias e pela da ativação de altos níveis de citocinas pró inflamatórias resultam em dano celular.

Baixos níveis de APOA séricos foram descritos como indicativos de mau prognóstico na sepse, por formarem poucos complexos do HDL. Conhecido por neutralizar os produtos liberados pelas células gram-positivas (ácido lipotécóico) e gram-negativas (lipopolissacarídeo) bacterianas, o HDL participa da neutralização de processos inflamatórios mediados por macrófagos <sup>(54)</sup>, sendo assim a presença de APOAIV nas UVs poderia ser uma tentativa do organismo em bloquear a colonização bacteriana no leito da ferida.

A proteína complemento C4 e a área da lesão também apresentaram proximidade neste estudo. Esta relação pode ser explicada pelo importante papel desta proteína na ativação do sistema complemento. A resposta imune que acontece no microambiente das UVs é, assim como por células C3, também mediada por proteínas C4 que induzem uma série de reações enzimáticas, podendo culminar em uma resposta inflamatória normal ou em inflamação tissular insatisfatória e incontrolada <sup>(55)</sup>. Uma boa resposta inflamatória resulta na cicatrização da lesão e conseqüentemente, à diminuição de sua área, enquanto que em um processo crônico, a progressão das fases precoces da cicatrização é impedida, interferindo negativamente na redução da área da ferida.

Há um número limitado de estudos com caracterização de proteínas presentes nos exsudatos exclusivamente de UVs crônicas, existindo uma lacuna de trabalhos científicos na literatura onde se avalia a associação do perfil proteico do exsudato inflamatório de UVs com as variáveis clínicas epidemiológicas dos pacientes portadores destas lesões. Esse tipo de correlação pode auxiliar em um melhor entendimento de como as proteínas presentes no microambiente de uma lesão atuam diretamente no prognóstico das mesmas, auxiliando o entendimento de como o sinergismo entre essas moléculas induz a quadros de alta cronicidade.

Portanto podemos concluir que o perfil proteico do exsudato de UVs apresentou uma maior prevalência de proteínas do sistema imune e transportadoras. Houve associação da expressão com características clínicas como: tempo de evolução; idade do paciente; área e colonização, denotando que a alta cronicidade destas lesões está relacionada ao aumento dessas moléculas no microambiente da ferida, capazes de induzir uma atividade inflamatória recorrente e desregulada, impedindo a cicatrização tecidual.

Como limitações, os diferentes períodos de evolução cicatricial das UVs na admissão ao estudo ou os diferentes tratamentos ambulatoriais administrados podem influenciar o padrão de expressão proteômica local, porém, este é um estudo clínico pragmático e preliminar, que visa refletir o real quadro dos pacientes tratados em serviços públicos de saúde, para compreender os fatores clínicos e proteômicos envolvidos na cicatrização de UVs, independentemente de sua heterogeneidade.

Da mesma forma a proporção de UV para o número de variáveis estudadas desfavorece o desempenho de técnicas investigativas multivariadas por inflacionar o erro amostral, o que é bastante recorrente em estudos de proteômica e metabolômica. Finalmente, a investigação em um único centro, de pacientes em serviço de referência público reduzem a generalização dos resultados, entretanto, fortalece a homogeneidade da amostra e sua validade interna.

Além disso não foi realizado nenhum tipo de análise microbiana. Tendo em vista que o microambiente da lesão não reflete um ambiente estéril, para diminuir quaisquer limitações cicatriciais decorrentes de complicações da colonização por microrganismos, úlceras infectadas foram desconsideradas neste estudo.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores gostariam de agradecer ao Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), à Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPex) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) e ao Ambulatório de Úlceras Crônicas da FMB, pela disponibilização de recursos e equipamentos que contribuíram para a realização deste trabalho.

---

**REFERÊNCIAS**

1. 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.
2. Bergqvist D, Lindholm C, Nelzen O. Chronic leg ulcers: the impact of venous disease. *J Vasc Surg.* 1999; **29**:752-5.
3. Nelson EA, Bell-Syer SE. Compression for preventing recurrence of venous ulcers. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014; **9**:CD002303.
4. Mayer W, Jochmann W, Partsch H. Ulcuscruris: Abheilungunterkonservativer Therapie. Eineprospektive Studie. *Wien Med Wochenschr.* 1994; **144**:250-2.
5. Chase SK, Whittemore R, Crosby N, *et al.* Living with chronic venous ulcers: a descriptive study of knowledge and functional health status. *J Community Health Nurs.* 2000; **17**:1–13.
6. Graham ID, Harrison MB, Nelson EA, *et al.* Prevalence of lower-limb ulceration: a systematic review of prevalence studies. *Adv Skin Wound Care.* 2003;**16**:305-16.
7. Ruckley CV, Evans CJ, Allan P, *et al.* Chronic venous insufficiency: clinical and duplex correlations. The Edinburgh Vein Study of venous disorders in the general population. *J Vasc Surg.* 2002; **36**:520–5.
8. Callam MJ, Ruckley CV, Harper DR, *et al.* Chronic ulceration of the leg: extent of the problem and provision of care. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1985; **290**:1855-6.
9. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, *et al.* Wound repair and regeneration. *Nature.* 2008; **453**:314-21.

10. Drinkwater SL, Smith A, Burnand KG. What can wound fluids tell us about the venous ulcer environment? *Int J Low Extrem Wounds*. 2002; **1**:184–90.
11. Buchstein N, Hoffmann N, Smola H, *et al.* Alternative proteolytic processing of hepatocyte growth factor during wound repair. *Am J Pathol*. 2009; **174**:2116–28.
12. Moor AN, Vachon DJ, Gould LJ. Proteolytic activity in wound fluids and tissues derived from chronic venous leg ulcers. *Wound Repair Regen*. 2009; **17**:832–9.
13. Rayment EA, Upton Z, Shooter GK. Increased matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity observed in chronic wound fluid is related to the clinical severity of the ulcer. *Br J Dermatol*. 2008; **158**:951–61.
14. Lauer G, Sollberg S, Cole M, *et al.* Expression and Proteolysis of VEGF is increased in chronic wounds. *J Invest Dermatol*. 2000; **115**:12–8.
15. Miot HA, Mendacoli TJ, Costa SV, *et al.* Ulceras crônicas dos membros inferiores: avaliação pela fotografia digital. *Rev Assoc Med Bras*. 2009; **55**:145-8.
16. 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.
17. 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.
18. Hout MC, Papesh MH, Goldinger SD. Multidimensional scaling. *WIREs Cognit Sci*. 2013; **4**:93-103.

19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. Abbade LPF, Lastoria S. Abordagem de pacientes com ulcera da perna de etiologia venosa. *An Bras Dermatol*. 2006; **81**:509-22.
25. Smões MV, Schmidt A. Hipertensão arterial como fator de risco para doenças cardiovasculares. *Medicina (Ribeirão Preto)*. 1996; **29**:214-9.
26. Baker SR, Stacey MC. Epidemiology of chronic leg ulcers in Australia. *Aust N Z J Surg*. 1994; **64**:258-61.
27. Borges EL, Caliri MHL, Haas VJ. Revisão sistemática do tratamento tópico da úlcera venosa. *Rev Lat Am Enfermagem*. 2007; **15**:1163-70.
28. 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.

- 
29. Zillmer R, Trøstrup H, Karlsmark T, *et al.* Duration of wound fluid secretion from chronic venous leg ulcers is critical for interleukin-1 $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , interleukin-8 levels and fibroblast activation. *Arch Dermatol Res.* 2011; **303**:601-6.
30. 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.
31. Edsberg LE, Wyffels JT, Brogan MS, *et al.* Analysis of the proteomic profile of chronic pressure ulcers. *Wound Repair Regen.* 2012; **20**:378-401.
32. 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.
33. Serra R, Buffone G, Falcone D, *et al.* Chronic venous leg ulcers are associated with high levels of metalloproteinases-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *Wound Repair Regen.* 2013;**21**:395-401.
34. Serra R, Grande R, Buffone G, *et al.* Extracellular matrix assessment of infected chronic venous leg ulcers: role of metalloproteinases and inflammatory cytokines. *Int Wound J.* 2014;**13**:53-8.
35. 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 11.
36. Cazander G, Jukema GN, Nibbering PH. Complement activation and inhibition in wound healing. *Clin Dev Immunol.* 2012; **2012**.

- 
37. 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.
38. 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.
39. King JC. Zinc: an essential but elusive nutrient. *Am J Clin Nutr.* 2011;**94** Suppl: 679S-84S.
40. Langemo D, Anderson J, Hanson D, *et al.* Nutritional considerations in wound care. *Adv Skin Wound Care.* 2006; **19**:297-8, 300,303.
41. Cutting KF. Wound exudate: composition and functions. *Br J Community Nurs.* 2003; **8**(9 Suppl):4-9.
42. Wolcott R. Disrupting the biofilm matrix improves wound healing outcomes. *J Wound Care.* 2015; **24**:366-71.
43. Percival SL, Suleman L. Slough and biofilm: removal of barriers to wound healing by desloughing. *J Wound Care.* 2015; **24**:498-510.
44. Wilgus TA, Roy S, McDaniel JC. Neutrophils and wound repair: positive actions and negative reactions. *Adv Wound Care.* 2013; **2**:379-88.
45. Karaczyn AA, Cheng RY, Buzard GS, *et al.* Truncation of Histone H2A's C-terminal tail, as is Typical for Ni(II) - assisted specific peptide bond hydrolysis, has gene expression altering effects. *Ann Clin Lab Sci.* 2009; **39**:251-62.
46. Redon C, Pilch D, Rogakou E, *et al.* Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev.* 2002; **12**:162-9.

47. Santos NSJ, Draibe SA, Kamimura MA, *et al.* Albumina sérica como marcador nutricional em pacientes com hemodiálise. *Rev Nutr.* 2004;**17**:339-49.
48. Cesar TB, Wada SR, Borges RG. Zinco Plasmático e Estado nutricional em idosos. *Rev Nutr.* 2005; **18**:357-65.
49. Amavizca K, Yang SP, Idicula A, *et al.* Lower serum albumin shortly after admission predicts prolonged hospital stay in younger burn patients. *J Burn Care Res.* 2015 Nov 20. Epub ahead of print.
50. Rohatgi A, Khera A, Berry JD, *et al.* HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2014; **371**: 2383-93.
51. Xavier HT, Izar MC, Faria Neto JR, *et al.* V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arq Bras Cardiol.* 2013;**101**(4 Suppl 1):1-20.
52. Rothschild C. Anticorpos antifosfolípidos e aterosclerose em pacientes com trombose venosa e/ou arterial. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2007; **29**:201-2. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-84842007000200023&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842007000200023&lng=en). <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842007000200023>. (cited 2015 Nov 29).
53. Novak EM, Bydlowski SP. Biologia molecular das dislipidemias. Variação genética das apolipoproteínas/ Molecular biology of hyperlipidemias. Genetic variation of apolipoproteins. *Arq Bras Cardiol.* 1996;**67**:411-7.
54. Morin EE, Guo L, Schwendeman A, *et al.* HDL in sepsis – risk factor and therapeutic approach. *Front Pharmacol.* 2015 Oct 23. doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2015.00244>
55. Amara U, Rittirsch D, Flierl M, *et al.* Interaction between the coagulation and complement system. *Adv Exp Med Biol.* 2008; **632**:71-9.

**Tabela 1:** Variáveis clínicas e epidemiológicas dos pacientes e úlceras estudados.

<b>Pacientes</b>	<b>Média</b>	<b>DP <sup>a</sup></b>
<b>Idade</b>	70.1	10.1
<b>Úlceras</b>	<b>Frequência</b>	<b>Percentual</b>
<b>N</b>	37	100
<b>Sexo</b>		
Feminino	23	62.2
<b>Etnia</b>		
Pardo ou Negro	6	16.2
Branco	31	83.8
<b>Tempo de Evolução</b>		
1-5 anos	10	27.0
5-10 anos	3	8.1
Mais de 10 anos	24	64.9
<b>Tecido Desvitalizado</b>	20	54.1
<b>Colonização Bacteriana</b>	4	10.8
<b>Varizes</b>		
Primárias	30	81.1
Pós-trombóticas	10	27.0
<b>Adesão</b>		
Compressão	27	73.0
Repouso	27	73.0
<b>Comorbidades</b>		
Hipertensão Arterial Sistêmica	20	54.1
Diabetes Mellitus	8	21.6
Insuficiência Cardíaca Congestiva	4	10.8

a – Desvio padrão

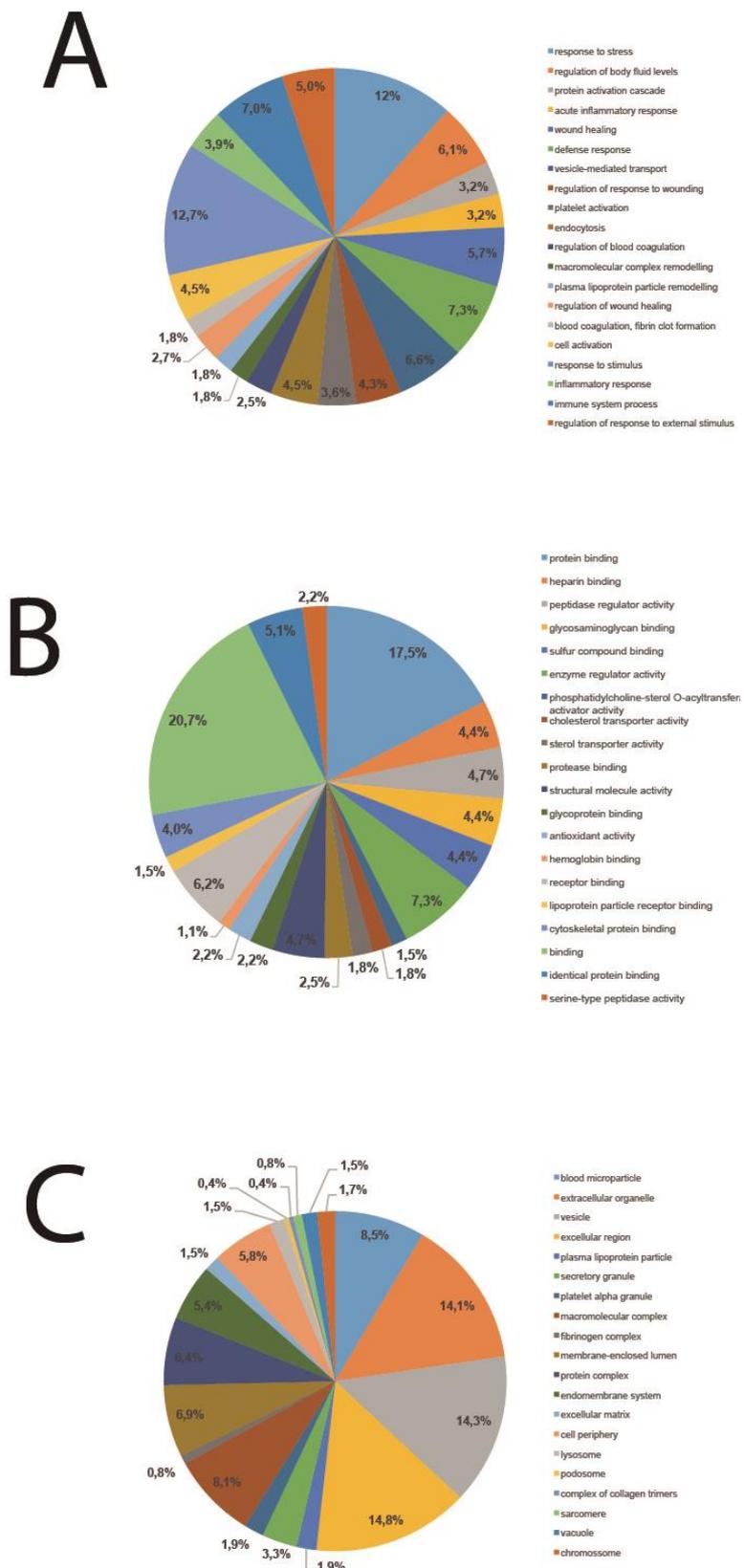
**Tabela 2:** Identificação e categorização do perfil proteômico do exsudato inflamatório das úlceras venosas.

Nº	Identificação	Código de acesso	M.M. <sup>a</sup> (kDa)	Contagem de espectros <sup>b</sup>	Desvio Padrão <sup>c</sup>	Σ pep. únicos <sup>d</sup>	Função
p1	Albumin	gij113576	69	313,64	31,76	10.608	Transportadora
p2	Serotransferrin	gij313104271	77	40,91	6,61	4.157	Transportadora
p3	Complement C3	gij119370332	187	20,41	6,19	2.127	Imunomoduladora
p4	Ig gamma-1 chain	gij121039	36	31,21	7,83	935	Imunomoduladora
p5	Beta-globin	gij56749856	16	14,60	10,26	1.335	Transportadora
p5,2	Delta-globin	gij122713	16	5,36	4,46	14	Transportadora
p6	Alpha-2-M	gij308153640	163	20,34	7,32	2.402	Inibidor de protease
p7	Alpha-globin	gij57013850	15	8,13	6,35	719	Transportadora
p8	Ig γ-4 chain C	gij121047	36	21,73	5,35	380	Imunomoduladora
p9	Ig lambda-2 chain C	gij298351714	11	26,28	7,74	596	Imunomoduladora
p9,3	Ig lambda-7 chain C	gij294956599	11	4,20	3,33	64	Imunomoduladora
p10	Haptoglobin	J3QLC9	451	22,96	10,60	1836	Imunomoduladora
p10,1	Haptoglobin	J3QLC9	451	19,44	9,46	1285	Imunomoduladora
p10,2	Haptoglobin-related	gij262527547	39	6,08	3,44	275	Imunomoduladora
p11	Apolipoprotein A-I	gij113992	31	15,97	4,11	108	Transportadora
p11,2	Apolipoprotein A-I	F8W696	30	6,00	6,77	10	Transportadora
p12	Ceruloplasmin	gij116117	122	5,77	3,09	110	Transportadora
p12,2	Ceruloplasmin	E9PFZ2	115	3,23	2,73	1	Transportadora
p13	Ig alpha-1 chain C	gij113584	38	16,55	6,66	1.383	Imunomoduladora
p13,2	Ig alpha-2 chain C	gij218512088	37	10,15	4,33	6	Imunomoduladora
p14	Ig gamma-3 chain C	gij193806361	41	19,04	4,44	355	Imunomoduladora
p15	Ig kappa chain C	gij125145	12	23,27	5,14	74	Imunomoduladora
p16	Alpha-1-acid glycoprotein	gij112877	24	5,68	2,49	483	Transportadora
p17	Complement C4-B	gij476007828	193	3,38	3,50	408	Imunomoduladora
p18	Vitamin D-Binding Protein	gij139641	53	8,10	2,52	593	Imunomoduladora
p19	Ig gamma-2 chain C	gij218512079	36	15,32	5,09	377	Imunomoduladora
p20	Alpha-2-Z-globulin	gij112910	39	3,18	1,85	296	Imunomoduladora
p21	Haemopexin	gij1708182	52	8,74	3,22	822	Transportadora
p22	Apolipoprotein A-II	gij114000	11	7,91	2,19	745	Transportadora
p23	Alpha-1B-glycoprotein	gij317373553	54	2,70	1,59	307	Imunomoduladora
p24	Fibrinogen beta chain	gij399492	56	1,87	2,99	275	Proteína de matriz
p25	Actin, cytoplasmic 1	gij46397333	42	4,07	3,60	456	Proteína de matriz
p25,2	Alpha-cardiac actin	gij54036697	42	1,27	1,92	49	Proteína de matriz
p26	Neutrophil defensin 1	gij30316322	10	3,08	1,80	345	Atividade antimicrobiana
p27	Apolipoprotein B-100	gij300669605	516	,86	1,05	137	Transportadora
p28	Myeloperoxidase	gij129825	84	,32	,82	40	Atividade antimicrobiana
p29	Fibrinogen gamma chain	gij20178280	52	1,51	2,11	228	Proteína de matriz
p30	Complement factor B	gij584908	86	1,45	,76	173	Imunomoduladora
p31	Vitronectin	gij139653	54	1,22	1,14	112	Proteína de Matriz

p32	Histone H2A type 2-C	gi 47117890	14	,32	1,49	49	Componente genético
p32,2	Histone H2A type 1-J	gi 12585257	14	,30	1,42	2	Componente genético
p33	Alpha-1-antitrypsin	gi 1703025	47	12,73	5,10	1451	Inibidor de protease
p34	Lactotransferrin	gi 85700158	78	,52	1,93	54	Atividade antimicrobiana
p35	Alpha-1-acid glycoprotein	gi 231458	24	2,78	1,67	214	Transportadora
p36	Beta-2-glycoprotein 1	gi 543826	38	,67	,85	94	Proteína de matriz
p37	Fibrinogen alpha chain	gi 1706799	95	1,87	1,70	212	Proteína de matriz
p38	Ig heavy chain V-III TUR	gi 123858	12	,78	,88	106	Imunomoduladora
p39	Histone H2B type 1-D	gi 21542074	14	,53	1,22	65	Componente genético
p40	Apolipoprotein A-IV	gi 93163358	45	,51	,95	54	Transportadora
p41	Plasma protease C1 inhibitor	gi 124096	55	,30	,41	51	Imunomoduladora
p42	Ig kappa chain V-III	gi 125797	12	,70	,71	92	Imunomoduladora
p43	Cytokeratin-6A	gi 1346344	60	,07	,19	25	Proteína de matriz
p44	Ig heavy chain V-III BRO	gi 123845	13	1,10	1,12	15	Imunomoduladora
p45	Titin	gi 384872704	3816	,06	,20	7	Componente genético
p46	Keratin I cytoskeletal 16	gi 23503075	51	,07	,28	9	Imunomoduladora
p46,2	Keratin I cytoskeletal 14	gi 229463044	52	,01	,06	2	Proteína de matriz
p47	Ig mu chain C region	gi 193806374	49	2,88	3,14	361	Imunomoduladora
p48	Histidine-rich glycoprotein	gi 123523	60	,77	,79	95	Imunomoduladora
p49	Isoform Kininogen-1	P01042-2	719	,67	,70	117	Inibidor de protease
p50	Angiotensinogen	gi 113880	53	,50	,72	53	Atividade antimicrobiana
p51	Alpha-1 type I collagen	gi 296439504	139	,26	,52	50	Proteína de matriz
p52	Alpha-1-antichymotrypsin	gi 112874	48	,33	,78	41	Inibidor de protease
p53	Neutrophil elastase	gi 119292	29	,19	,38	44	Imunomoduladora
p54	Fibronectin	gi 300669710	263	,21	,47	33	Proteína de matriz
p55	Stratifin	gi 398953	28	,08	,43	28	Proteína de matriz
p56	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	gi 120649	36	,34	,78	30	Proteína de matriz
p57	Plastin-2	gi 308153685	70	,22	,41	27	Imunomoduladora
p58	Alpha-enolase	gi 119339	47	,17	,42	30	Proteína de matriz
p59	Antithrombin-III	gi 113936	53	,16	,36	20	Proteína de matriz
p60	Lumican	gi 20141464	38	,11	,58	17	Proteína de matriz
p61	Serum amyloid A-1 protein	gi 395406826	14	,19	1,06	15	Imunomoduladora
p62	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy	P19827-3	101	,11	,29	15	Inibidor de protease
p63	Cytokeratin-1	gi 238054406	66	,15	,38	19	Proteína de matriz
p64	Lipocalin-2	gi 1171700	23	,15	,55	15	Transportadora
p65	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	gi 229463048	103	,08	,35	13	Imunomoduladora
p66	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	gi 229462889	106	,07	,22	13	Transportadora
p67	Lysozyme C	gi 48428995	17	,08	,28	16	Atividade antimicrobiana
p68	Zinc-alpha-2-glycoprotein	gi 292495049	34	,08	,24	14	Imunomoduladora
p69	Clipin-A	gi 1706004	51	,10	,36	8	Proteína de matriz
p70	Apolipoprotein E	gi 114039	36	,05	,23	11	Transportadora
p71	Histone H4	gi 51317339	11	,02	,11	11	Componente genético

p72	Ig kappa chain V-III VG	gi 125811	13	,07	,33	10	Imunomoduladora
p73	Cytokeratin-10	gi 269849769	59	,02	,12	5	Proteína de matriz
p74	Gelsolin	gi 121116	86	,07	,39	6	Proteína de matriz

A - Massa molecular; b –Contagem de espectros obtidos nas análises em triplicadas; c- Desvio padrão em relação à contagem de espectros; d- Somatória dos peptídeos únicos identificados por proteína.



**Figura 1:** Classificação das proteínas segundo *Gene ontology* de acordo com seus envolvimento em (A) processos biológicos, (B) função molecular e (C) componentes celulares.



**Artigo 2 preparado para o periódico**  
***Journal of Investigative Dermatology***

## **Artigo Original**

### **IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES DO EXSUDATO INFLAMATÓRIO DE ÚLCERAS VENOSAS DE ELEVADA CRONICIDADE**

Nayara Rodrigues Vieira Cavassan<sup>1</sup>, Letícia Gomes de Pontes<sup>1</sup>, Caio Cavassan de Camargo<sup>1</sup>, Hélio Amante Miot<sup>2</sup>, Rui Seabra Ferreira Junior<sup>1,3</sup>, Benedito Barraviera<sup>1,3</sup>, Luciana Patricia Fernandes Abbade<sup>2</sup>, Lucilene Delazari dos Santos<sup>1,3</sup>.

1. Programa de Pós Graduação em Doenças Tropicais, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP, Brasil.
2. Departamento de Dermatologia e Radiologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP, Brasil.
3. Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo – Brasil.

#### **Email:**

bio.nayaravieira@gmail.com; caiocavassan@gmail.com; heliomiot@gmail.com;  
rseabra@gnosis.com.br; bbviera@gnosis.com.br; lpfabbade@gmail.com;  
lucilene@cevap.unesp.br; lekapontes@hotmail.com

#### **Endereço de Correspondência:**

Lucilene Delazari dos Santos  
Avenida José Barbosa de Barros, 1780  
18610-307 - Botucatu/São Paulo - Brasil  
Fone/FAX: 55 (14) 3880-7108  
Email: lucilene@unesp.cevap.br

## RESUMO

A identificação de potenciais biomarcadores presentes no exsudato inflamatório das úlceras venosas crônicas (UVs) pode facilitar a compreensão da dinâmica global de cicatrização das mesmas, além de auxiliar no entendimento dos processos de cura ou falha terapêutica na cicatrização de feridas crônicas. Desta forma, o presente trabalho visa identificar as proteínas diferencialmente expressas no exsudato inflamatório de UVs crônicas, correlacionando-as à redução da lesão, a fim de caracterizar úlceras que cicatrizam daquelas que apresentam dificuldades no processo de cicatrização. Foram incluídas ao estudo 37 UVs crônicas ao estudo e, após 90 dias, foi possível observar que 25 (67.6%) lesões apresentaram redução de área, com uma média de cicatrização de 1,68 ( $\pm 11.76$ ) cm<sup>2</sup>. Análises de espectrometria de massas do tipo *shotgun* do fluido inflamatório das UVs foram realizadas, sendo identificadas 5 proteínas relacionadas à cicatrização. Das cinco proteínas relacionadas à cicatrização, Ig lambda VII chain C region e Apolipoproteína A-II foram consideradas como potenciais biomarcadoras por apresentarem expressão diferenciada em úlceras de difícil cicatrização e estarem presentes em mais de 80% das amostras. Desta forma, pode-se concluir que as proteínas Ig lambda VII chain C region e Apolipoproteína A-II expressas no exsudato das UVs crônicas neste estudo, são potenciais biomarcadoras de uma má cicatrização em úlceras venosas crônicas.

**Palavras-chaves:** Marcadores moleculares, exsudato inflamatório, úlceras venosas, cronicidade.

## INTRODUÇÃO

As úlceras crônicas de perna são lesões com perda do tegumento (derme e/ou epiderme), de longa duração (> 6 semanas), de recorrência frequente e em 80% dos casos, relacionadas às complicações tardias da insuficiência venosa nos membros inferiores (Fonder et al, 2008; Frade et al, 2005).

O exsudato inflamatório das úlceras venosas (UVs) é uma mistura complexa de proteínas que banha o local da lesão, refletindo o estado global de cicatrização das feridas através da expressão de fatores de crescimento, proteínas de matriz, proteinases e citocinas. Sendo assim, as variações destes componentes no fluido das UVs crônicas podem ser utilizadas como uma ferramenta de entendimento dos eventos patológicos e inflamatórios que podem modular a cronicidade deste tipo de lesão (Fernandez et al, 2008; Gurtner et al, 2008; Escalante et al, 2009; Zilmer et al, 2011). Neste contexto, a análise proteômica de fluidos humanos, como o exsudato, tem sido vista como uma poderosa ferramenta analítica para a descoberta de proteínas biomarcadoras que auxiliam no diagnóstico e prognóstico em condições patológicas (Escalante et al, 2009; Hu et al, 2006).

A identificação de potenciais biomarcadores presentes no exsudato das UVs pode significar um melhor entendimento na dinâmica global de cicatrização das mesmas, além de auxiliar no entendimento dos processos de cura ou falha na cicatrização em feridas crônicas. Assim, a descoberta de biomarcadores na cicatrização de UVs pode auxiliar os tratamentos atuais, através do diagnóstico precoce da cronicidade da lesão, permitindo um melhor prognóstico ao paciente e no desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas (Fernandez et al, 2008; Wyffels et al, 2010).

Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo identificar as proteínas diferencialmente expressas no exsudato inflamatório de UVs crônicas, correlacionando-as à redução da lesão, a fim de diferenciar úlceras que cicatrizam daquelas de difícil cicatrização.

## **RESULTADOS**

Foram incluídas ao estudo 37 UVs crônicas, de 28 pacientes. A primeira análise da área foi feita em T=0 e, após 90 dias, as úlceras foram reavaliadas. Após o cálculo de diferença entre as áreas iniciais e finais, foi possível observar que 25 (67.6%) lesões apresentaram redução da sua área no T=90, com uma média de cicatrização de 1,68 ( $\pm 11.76$ ) cm<sup>2</sup> (Tabela 1).

Análises de espectrometria de massas realizadas nos exsudatos das UVs em T = 0 e T = 90, identificaram 74 proteínas totais, as quais foram caracterizadas segundo sua provável função neste tipo de amostra biológica (Tabela 2). Através da correlação dos coeficientes da PLS das amostras escalonadas e dos valores de VIP (Tabela 3), foram identificadas 5 proteínas relacionadas à cicatrização das UVs. O diagrama Volcano plot evidenciou que as proteínas titina (p45), Ig lambda VII chain C region (p9.3), apolipoproteína A-II (p22), histona H 2B tipo 1D (p39) e Ig kappa chain V - III region (p72), se expressaram diferentemente nos exsudatos das UVs, estando a proteína p45 diferencialmente expressa nas úlceras em franco processo de cicatrização, enquanto que as proteínas p9.3, p22, p39 e p72 diferencialmente expressas nas úlceras que não cicatrizaram no período de 90 dias (Figura 1). Os dados de identificação dessas proteínas encontram-se dispostos na Tabela 2.

Das cinco proteínas relacionadas à cicatrização, Ig lambda VII chain C region

e apolipoproteína A-II foram identificadas em pelo menos 80% das amostras do estudo, sendo então consideradas como potenciais biomarcadoras do processo cicatricial prejudicado (Tabela 4). Não houve interações conhecidas entre as moléculas potenciais biomarcadoras, tampouco associações diretas, já que ambas parecem desempenhar funções independentes no microambiente da úlcera (Figura 2).

## **DISCUSSÃO**

A análise do exsudato de úlceras de perna tem sido muito utilizada como abordagem proteômica para investigar moléculas que apresentam expressão diferencial, a fim de evidenciar potenciais biomarcadores específicos ou não à cicatrização deste tipo de lesão. Entretanto, não há um consenso entre os pesquisadores acerca dos valores de identificação das proteínas na amostra que possam caracterizar uma expressão diferencial, bem como um percentual que determine uma prevalência mínima de moléculas para que essas possam ser indicadas como biomarcadoras. Sendo assim, nesta abordagem adotou-se como potenciais biomarcadoras de cicatrização normal ou reduzida, as proteínas mais abundantes com base no seu valor quantitativo e que fossem identificadas em pelo menos 80% das úlceras estudadas.

Eming e colaboradores realizaram um estudo com o exsudato de úlceras agudas pós cirúrgicas com predileção à cura e UVs crônicas, afim de elucidar possíveis biomarcadores envolvidos no processo de cicatrização. Foram identificadas 23 e 26 proteínas exclusivamente expressas no fluido das feridas agudas e crônicas, respectivamente, demonstrando que, por se tratar de moléculas

com expressão específica em um determinado tipo de lesão, podem ser sugestivas em relação a condição de cicatrização destas lesões. Entre as proteínas diferencialmente e exclusivamente expressas nestas úlceras, pode-se destacar a presença das proteases, como MMP9, neutrophil elastase e proteinase 3 em úlceras de difícil cicatrização, as quais podem estar relacionadas à resposta inflamatória crônica característica deste tipo de lesão, e moléculas de matriz, como várias classes de colágenos, fibulin-1 e heparina e sulfato proteoglycan 2, enquanto que, nas lesões agudas, componentes envolvidos nas fases pós inflamatórias da reconstituição tissular foram identificados (Eming et al, 2010).

Um estudo avaliando o fluido inflamatório de 19 úlceras de pressão por meio da técnica analítica eletroforese bidimensional (2DS-PAGE) foi desenvolvido por Wyffels e colaboradores, evidenciando a proteína S100A9, como sendo um novo potencial biomarcador de cicatrização neste tipo de úlcera (Wyffels et al., 2010).

Muitas proteínas de matriz, fatores de crescimento, proteases e seus inibidores são conhecidamente reguladores importantes do processo de cicatrização das feridas, modulando a reparação e reepitelização da pele. Entretanto Schäfer e colaboradores, ao realizarem uma revisão de literatura, evidenciaram que uma superexpressão de fatores de transcrição no tecido de feridas cutâneas, como por exemplo o ativador de proteína 1 (AP-1), composto por proteínas das famílias Fos, Jun e ATF, pode regular a expressão de genes que modulam a cicatrização tecidual normal, bem como uma diminuição da expressão desses fatores possa induzir uma resposta de recuperação dificultada, levando a feridas crônicas (Schäfer et al, 2007)

Embora neste estudo, cinco proteínas tenham se expressado diferentemente, duas destas foram caracterizadas como potenciais biomarcadoras de cicatrização

por serem identificadas em 80% ou mais das UVs analisadas. A proteína Ig lambda VII chain C region (IGLC7) estava presente em 92% das úlceras em T=90 e foi mais expressa em lesões que não apresentaram boa cicatrização nos 90 dias de estudo. Essa proteína foi classificada na categoria de moléculas imunomoduladoras, integrando com os demais fatores do sistema imunológico na presença de antígenos. A IGLC7 é uma imunoglobulina de cadeia leve e pode ser detectada em doenças inflamatórias, mediando a ativação de mastócitos ou outras células de defesa. Sabe-se que a ativação dos mastócitos resulta na liberação de vários mediadores pró-inflamatórios que podem causar processos inflamatórios recorrentes e duradouros (Redegeld et al, 2002; Rijniense et al, 2009; Braber et al, 2012), como os encontrados em úlceras que não cicatrizam.

Já a proteína apolipoproteína AII (APOAII) é uma proteína de transporte, que desempenha papel específico no metabolismo de lipídios e relacionando-se principalmente aos níveis de HDL (lipoproteínas de alta densidade) séricos (Remaley, 2013). Esta proteína foi identificada em 100% das amostras em T=90, encontrando-se mais expressa em lesões de difícil cicatrização. Sua alta expressão em UVs com cura dificultada pode relacionar-se a uma tentativa do organismo em conter altos níveis de colonização e infecção, muito presentes neste tipo de lesão. Uma vez que essa molécula é a principal constituinte do HDL, ela tem como principal ação inibir toxinas e outros produtos gerados por microrganismos durante a infecção e, que de certa forma, ela induz reações inflamatórias persistentes, dificultando a cicatrização (Femling et al, 2013; Pirillo et al, 2015). Além disso, a APOAII desempenha um importante papel no combate à aterogênese, através da proteção contra os danos endoteliais causados pelo LDL (lipoproteínas de baixa

densidade) (Li et al, 1998), sendo assim sua elevada concentração no exsudato de UVs crônicas pode refletir não apenas o microambiente da úlcera, como também o quadro sistêmico do paciente, em resposta a disfunções aterogênicas que podem representar fatores de predisposição a doenças venosas e ao aparecimento de úlceras.

Alguns estudos têm adotado metodologias para remoção de proteínas abundantes na amostra afim de verificar a expressão diferencial das moléculas presentes em menores concentrações, porém o processo de depleção das amostras não foi realizado neste trabalho, uma vez que, os autores optaram por analisar as amostras nas mesmas circunstâncias em que são secretadas pelos pacientes. A estratégia era avaliar o perfil e abundância proteica real das UVs, bem como implementar uma abordagem de coleta e análise diagnóstica e prognóstica aplicável, rápida e menos custosa na rotina do atendimento do ambulatorial. Apesar de alguns autores discutirem a eficácia de um número limitado de biomarcadores em uma determinada amostra, tendo como justificativa o sinergismo entre as várias moléculas intrinsecamente relacionadas ao microambiente da ferida, muitos estudos em outras áreas da medicina, como por exemplo a oncologia, têm utilizado proteínas específicas como biomarcadoras de progressão de doenças ou como potenciais ferramentas no auxílio de um diagnóstico precoce ao paciente (Dvořáková et al, 2015; Wang et al, 2015).

Sendo assim, pode-se concluir que as proteínas IGLC7 e APOA2, diferencialmente expressas no exsudato das UVs crônicas de difícil cicatrização neste estudo, são potenciais biomarcadoras para cicatrização prejudicada, caracterizando assim úlceras de alta cronicidade. Entretanto, estudos adicionais

contendo um número maior de UVs com alta cronicidade devem ser realizados afim de confirmar a presença destes biomarcadores em seus exsudatos inflamatórios.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **População do Estudo**

Foram incluídas úlceras de pacientes maiores de 18 anos, atendidos no ambulatório de Úlceras crônicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo - Brasil, portadores de uma ou mais UVs ativas, confirmadas através de exame de ultrassonografia “Döppler” vascular (DV 610B), com diâmetro de dois a 15 cm<sup>2</sup> e com evolução maior do que seis semanas. Úlceras de outra etiologia, associadas à doença arterial periférica ou com tecido necrótico foram desconsideradas. Os pacientes foram incluídos consecutivamente à sua ordem de chegada ao serviço de atendimento.

Todos os pacientes foram submetidos à questionário clinico-epidemiológico com questões relevantes à pesquisa e requeridos quanto ao conhecimento e aprovação do uso do seu material biológico para pesquisa acadêmica através 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.

## **Análise da Área da Úlcera**

As análises das áreas de cada úlcera foram realizadas nos momentos T=0 e T=90, sendo T=0 a data de admissão da úlcera ao estudo e T=90 após 90 dias consecutivos da admissão da mesma.

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 fotografias dos desenhos e referenciais de todas as úlceras, que, após serem transferidas para computador puderam ser analisadas individualmente no software Image J 1,46v (Miot et al, 2009). A partir do referencial conhecido, foi realizada a calibragem do software, para estimar a área de cada lesão, a partir da relação (pixels/cm) de cada úlcera.

A área da úlcera em T=0 (A0), foi utilizada como referência para se determinar a diminuição ou não da lesão em T=90 (A90) pela equação  $\Delta A = A90 - A0$ . A diferença entre as áreas iniciais e finais de cada úlcera foi chamada de redução da úlcera.

## **Coleta e Preparo do Material**

A coleta dos exsudatos foi realizada junto à análise das áreas das UVs em T=0 e T=90, no local de atendimento e baseada em protocolo elaborado por Fernandez *et al.* (Fernandez et al, 2010)

Primeiramente a úlcera foi lavada com solução salina a 0,9% (m/v) de cloreto de sódio para limpeza, sendo posteriormente 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 afim de aguardar a exsudação natural do tecido. O exsudato acumulado entre o leito da úlcera e o curativo foi coletado com auxílio de uma micropipeta com ponteira estéril e descartável, sendo então transferido para tubos do tipo Eppendorf®, identificados e armazenado em caixa com gelo até a chegada ao 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 então quantificadas em triplicata pelo método de Bradford (Bradford, 1976), (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 Eppendorf® do tipo LoBind e diluídas com solução salina a 0,9% (m/v) para serem padronizadas quanto a sua concentração, estabelecendo-se a relação 50µg/40µL para cada amostra.

### **Digestão proteica em solução**

As amostras foram digeridas em solução individualmente, iniciando-se pelas etapas de redução e alquilação, utilizando ditioneitol (DTT) 10 mM e iodoacetamida (IAA) 45 mM, respectivamente. Em seguida, as amostras foram submetidas à

digestão proteolítica na presença da enzima tripsina na concentração 1:50 (enzima:substrato), solubilizada em tampão bicarbonato de amônio 50 mM, pH 7.8. A hidrólise ocorreu por 18 horas, sendo interrompida com a adição de ácido fórmico 1% (v/v) em relação ao volume da amostra. Estas foram então dessalinizadas utilizando-se cartuchos Sep-Pak Vac C18 (Waters). As amostras digeridas e dessalinizadas foram liofilizadas em SpeedVac™ (Thermo Scientific) e mantidas sob refrigeração até o momento da análise por espectrometria de massas.

### **Identificação por Espectrometria de Massas**

As análises de espectrometria de massas realizadas no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), localizado no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) em Campinas-SP. As amostras foram solubilizadas em 60 uL em solução 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, 1,7µm BEH 130 (100 µm 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 continua dos dados foram obtidas no intervalo de massas moleculares entre 100 a 2.000 Da.

## Análise dos dados de espectrometria de massas

A identificação das proteínas a partir dos dados de espectrometria de massas (LC MS-MS), foi realizada por meio da ferramenta de bioinformática 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.

Cabe ressaltar que 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. Os dados foram anexados para os grupos em T=0 e T=90 separadamente, e 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. Foram estabelecidas/adotadas como potenciais biomarcadoras de cicatrização normal ou reduzida, proteínas identificadas em pelo menos 80% das úlceras estudadas.

## **Análise Estatística**

A normalidade das amostras foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

As variáveis independentes foram representadas pelas proteínas identificadas e a variável dependente pela redução da área das úlceras no T90 ( $\Delta A = A_{90} - A_0$ ).

A identificação das proteínas relacionadas à 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  $< -0.1$ . Os dados foram analisados nos softwares JMP 10 e SPSS 22.

Foram consideradas como potenciais biomarcadoras, aquelas proteínas presentes em pelo menos 80% das úlceras estudadas.

## **CONFLITO DE INTERESSE**

Os autores declaram não ter conflito de interesse

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores gostariam de agradecer ao Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), à Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPex) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) e ao Ambulatório de Úlceras Crônicas da FMB, pela disponibilização de recursos e equipamentos que contribuíram para a realização deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

Braber S, Thio M, Blokhuis BR, *et al.* An association between neutrophils and immunoglobulin free light chains in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012; 185:817-24.

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.

Dvořáková M, Jeřábková J, Procházková I, *et al.* Transgelin is upregulated in stromal cells of lymph node positive breast cancer. *J Proteomics.* 2015; 132:103-11.

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.

Escalante T, Rucavado A, Pinto AFM, *et al.* Wound exudate as a proteomic window to reveal different mechanisms of tissue damage by snake venom toxins. *J Proteome Res.* 2009;8:5120-31.

Femling JK, West SD, Hauswald EK, *et al.* Nosocomial Infections after severe trauma are associated with lower apolipoproteins B and AII. *J. Trauma Acute Care Surg.* 2013; 74:1067-73.

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.

Fonder MA, Lazarus GS, Cowan DA, *et al.* Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. *J Am Acad Dermatol.* 2008;58:185-206.

Frade MAC, Cursi IB, Andrade FF, *et al.* Úlcera de perna: um estudo de casos em Juiz de Fora-MG (Brasil) e região. *An Bras Dermatol.* 2005;80:41-6.

Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, *et al.* Wound repair and regeneration. *Nature.* 2008; 453:314-21.

Hu S, Loo JA, Wong DT. Human body fluid proteome analysis. *Proteomics.* 2006; 6:6326-53.

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; 111:78-81.

Miot HA, Mendacolli TJ, Costa SV, *et al.* Úlceras crônicas dos membros inferiores: avaliação pela fotografia digital. *Rev Assoc Med Bras.* 2009; 55:145-8.

Pirillo A, Catapano AL, Norata GD. HDL in Infectious diseases and sepsis. *Handb Exp Pharmacol*. 2015; 224:483-508.

Redegeld FA, van der Heijden MW, Kool M, *et al*. Immunoglobulin-free Light Chains Elicit Immediate Hypersensitivity-like Responses. *Nat Med*. 2002; 8:694-701.

Remaley AT. Apolipoprotein All: still second fiddle in high – density lipoprotein metabolism? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013; 33:166-7.

Rijnierse A, Kroese AB, Redegeld FA, *et al*. Immunoglobulin-free light chains mediate antigen-specific responses of murine dorsal root ganglion neurons. *J Neuroimmunol*. 2009; 208:80-6.

Schäfer M, Werner S. Transcriptional control of wound repair. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007; 23:69-92.

Wang S, Xu J, Zhang Q. Clinical significance of survivin and vascular endothelial growth factor mRNA detection in the peripheral whole blood of breast cancer patients. *Neoplasma*. 2016; 63:133-40.

Wyffels JT, Fries KM, Randall JS, *et al*. Analysis of pressure ulcer wound fluid using two-dimensional electrophoresis. *Int Wound J*. 2010; 7:236-48.

Zillmer R, Trøstrup H, Karlsmark T, *et al*. Duration of wound fluid secretion from chronic venous leg ulcers is critical for interleukin-1 $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , interleukin-8 levels and fibroblast activation. *Arch Dermatol Res*. 2011; 303:601-6.

**Tabela 1:** Área de 37 úlceras venosas crônicas observadas num intervalo de 90 dias.

Úlceras	Pacientes	T= 0 (cm <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	T= 90 (cm <sup>2</sup> ) <sup>b</sup>	velocidade de redução da área (b-a)	% redução da área
1	ACB	20,768	5,898	-14,87	71,60*
2	JRP	37,709	37,266	-0,443	1,17*
3	TFCO	26,255	15,385	-10,87	41,40*
4	SAA	43,768	19,285	-24,483	55,94*
5	AT	19,439	15,938	-3,501	18,01*
6	AT	16,021	7,757	-8,264	51,58*
7	AT	8,467	10,166	1,699	-20,07†
8	CCO	23,692	9,311	-14,381	60,70*
9	AZM	15,753	12,971	-2,782	17,66*
10	AZM	3,659	2,647	-1,012	27,66*
11	TFFG	15,109	7,995	-7,114	47,08*
12	MLTM	50,742	29,11	-21,632	42,63*
13	MLBG	10,575	25	14,729	-139,28†
14	AS	2,339	13	10,663	-455,88†
15	AS	11,26	29	17,992	-159,79†
16	JZG	14,607	4	-11,103	76,01*
17	JZG	12,416	7	-5,612	45,20*
18	SLS	15,561	32,855	17,294	-111,14†
19	JMA	18,3	10	-8,025	43,85*
20	EAR	16,854	27,275	10,421	-61,83†
21	MMP	16,954	11,402	-5,552	32,75*
22	MJVC	47,305	43,87	-3,435	7,26*
23	MJVC	38,281	33,475	-4,806	12,55*
24	JN	10,623	19,819	9,196	-86,57†
25	ALM	13,044	2,473	-10,571	81,04*
26	MJAM	2,629	1,209	-1,42	54,01*
27	JCR	16,224	4,41	-11,814	72,82*
28	ELP	30,398	55,315	24,917	-81,97†
29	ELP	2,938	6,365	3,427	-116,64†
30	NGC	62,733	88,473	25,74	-41,03†
31	NGC	9,401	9,485	0,084	-0,89†
32	GJC	18,963	2,469	-16,494	86,98*
33	MARP	99,519	93,259	-6,26	6,29*
34	ADE	44,146	35,849	-8,297	18,79*
35	MVM	101,422	96,803	-4,619	4,55*
36	JMC	17,728	16,479	-1,249	7,05*
37	JMC	10,643	13,578	2,935	-27,58†

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

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

**Tabela 2:** Identificação e categorização do perfil proteômico das UVs estudadas.

Nº	Identificação	Código de acesso	M.M. <sup>a</sup> (kDa)	Contagem de espectros <sup>b</sup>	Desvio Padrão <sup>c</sup>	Σ pep. únicos <sup>d</sup>	Função
p1	Albumin	gi 113576	69	313,64	31,76	10.608	Transportadora
p2	Serotransferrin	gi 313104271	77	40,91	6,61	4.157	Transportadora
p3	Complement C3	gi 119370332	187	20,41	6,19	2.127	Imunomoduladora
p4	Ig gamma-1 chain	gi 121039	36	31,21	7,83	935	Imunomoduladora
p5	Beta-globin	gi 56749856	16	14,60	10,26	1.335	Transportadora
p5,2	Delta-globin	gi 122713	16	5,36	4,46	14	Transportadora
p6	Alpha-2-M	gi 308153640	163	20,34	7,32	2.402	Inibidor de protease
p7	Alpha-globin	gi 57013850	15	8,13	6,35	719	Transportadora
p8	Ig γ-4 chain C	gi 121047	36	21,73	5,35	380	Imunomoduladora
p9	Ig lambda-2 chain C	gi 298351714	11	26,28	7,74	596	Imunomoduladora
p9,3	Ig lambda-7 chain C	gi 294956599	11	4,20	3,33	64	Imunomoduladora
p10	Haptoglobin	J3QLC9	451	22,96	10,60	1836	Imunomoduladora
p10,1	Haptoglobin	J3QLC9	451	19,44	9,46	1285	Imunomoduladora
p10,2	Haptoglobin-related	gi 262527547	39	6,08	3,44	275	Imunomoduladora
p11	Apolipoprotein A-I	gi 113992	31	15,97	4,11	108	Transportadora
p11,2	Apolipoprotein A-I	F8W696	30	6,00	6,77	10	Transportadora
p12	Ceruloplasmin	gi 116117	122	5,77	3,09	110	Transportadora
p12,2	Ceruloplasmin	E9PFZ2	115	3,23	2,73	1	Transportadora
p13	Ig alpha-1 chain C	gi 113584	38	16,55	6,66	1.383	Imunomoduladora
p13,2	Ig alpha-2 chain C	gi 218512088	37	10,15	4,33	6	Imunomoduladora
p14	Ig gamma-3 chain C	gi 193806361	41	19,04	4,44	355	Imunomoduladora
p15	Ig kappa chain C	gi 125145	12	23,27	5,14	74	Imunomoduladora
p16	Alpha-1-acid glycoprotein	gi 112877	24	5,68	2,49	483	Transportadora
p17	Complement C4-B	gi 476007828	193	3,38	3,50	408	Imunomoduladora
p18	Vitamin D-Binding Protein	gi 139641	53	8,10	2,52	593	Imunomoduladora
p19	Ig gamma-2 chain C	gi 218512079	36	15,32	5,09	377	Imunomoduladora
p20	Alpha-2-Z-globulin	gi 112910	39	3,18	1,85	296	Imunomoduladora
p21	Haemopexin	gi 1708182	52	8,74	3,22	822	Transportadora
p22	Apolipoprotein A-II	gi 114000	11	7,91	2,19	745	Transportadora
p23	Alpha-1B-glycoprotein	gi 317373553	54	2,70	1,59	307	Imunomoduladora
p24	Fibrinogen beta chain	gi 399492	56	1,87	2,99	275	Proteína de matriz
p25	Actin, cytoplasmic 1	gi 46397333	42	4,07	3,60	456	Proteína de matriz
p25,2	Alpha-cardiac actin	gi 54036697	42	1,27	1,92	49	Proteína de matriz
p26	Neutrophil defensin 1	gi 30316322	10	3,08	1,80	345	Atividade antimicrobiana
p27	Apolipoprotein B-100	gi 300669605	516	,86	1,05	137	Transportadora
p28	Myeloperoxidase	gi 129825	84	,32	,82	40	Atividade antimicrobiana
p29	Fibrinogen gamma chain	gi 20178280	52	1,51	2,11	228	Proteína de matriz
p30	Complement factor B	gi 584908	86	1,45	,76	173	Imunomoduladora
p31	Vitronectin	gi 139653	54	1,22	1,14	112	Proteína de Matriz

p32	Histone H2A type 2-C	gi 47117890	14	,32	1,49	49	Componente genético
p32,2	Histone H2A type 1-J	gi 12585257	14	,30	1,42	2	Componente genético
p33	Alpha-1-antitrypsin	gi 1703025	47	12,73	5,10	1451	Inibidor de protease
p34	Lactotransferrin	gi 85700158	78	,52	1,93	54	Atividade antimicrobiana
p35	Alpha-1-acid glycoprotein	gi 231458	24	2,78	1,67	214	Transportadora
p36	Beta-2-glycoprotein 1	gi 543826	38	,67	,85	94	Proteína de matriz
p37	Fibrinogen alpha chain	gi 1706799	95	1,87	1,70	212	Proteína de matriz
p38	Ig heavy chain V-III TUR	gi 123858	12	,78	,88	106	Imunomoduladora
p39	Histone H2B type 1-D	gi 21542074	14	,53	1,22	65	Componente genético
p40	Apolipoprotein A-IV	gi 93163358	45	,51	,95	54	Transportadora
p41	Plasma protease C1 inhibitor	gi 124096	55	,30	,41	51	Imunomoduladora
p42	Ig kappa chain V-III	gi 125797	12	,70	,71	92	Imunomoduladora
p43	Cytokeratin-6A	gi 1346344	60	,07	,19	25	Proteína de matriz
p44	Ig heavy chain V-III BRO	gi 123845	13	1,10	1,12	15	Imunomoduladora
p45	Titin	gi 384872704	3816	,06	,20	7	Componente genético
p46	Keratin I cytoskeletal 16	gi 23503075	51	,07	,28	9	Imunomoduladora
p46,2	Keratin I cytoskeletal 14	gi 229463044	52	,01	,06	2	Proteína de matriz
p47	Ig mu chain C region	gi 193806374	49	2,88	3,14	361	Imunomoduladora
p48	Histidine-rich glycoprotein	gi 123523	60	,77	,79	95	Imunomoduladora
p49	Isoform Kininogen-1	P01042-2	719	,67	,70	117	Inibidor de protease
p50	Angiotensinogen	gi 113880	53	,50	,72	53	Atividade antimicrobiana
p51	Alpha-1 type I collagen	gi 296439504	139	,26	,52	50	Proteína de matriz
p52	Alpha-1-antichymotrypsin	gi 112874	48	,33	,78	41	Inibidor de protease
p53	Neutrophil elastase	gi 119292	29	,19	,38	44	Imunomoduladora
p54	Fibronectin	gi 300669710	263	,21	,47	33	Proteína de matriz
p55	Stratifin	gi 398953	28	,08	,43	28	Proteína de matriz
p56	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	gi 120649	36	,34	,78	30	Proteína de matriz
p57	Plastin-2	gi 308153685	70	,22	,41	27	Imunomoduladora
p58	Alpha-enolase	gi 119339	47	,17	,42	30	Proteína de matriz
p59	Antithrombin-III	gi 113936	53	,16	,36	20	Proteína de matriz
p60	Lumican	gi 20141464	38	,11	,58	17	Proteína de matriz
p61	Serum amyloid A-1 protein	gi 395406826	14	,19	1,06	15	Imunomoduladora
p62	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy	P19827-3	101	,11	,29	15	Inibidor de protease
p63	Cytokeratin-1	gi 238054406	66	,15	,38	19	Proteína de matriz
p64	Lipocalin-2	gi 1171700	23	,15	,55	15	Transportadora
p65	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	gi 229463048	103	,08	,35	13	Imunomoduladora
p66	Inter-alpha-trypsin inhibitor	gi 229462889	106	,07	,22	13	Transportadora

	heavy chain H2						
p67	Lysozyme C	gi 48428995	17	,08	,28	16	Atividade antimicrobiana
p68	Zinc-alpha-2-glycoprotein	gi 292495049	34	,08	,24	14	Imunomoduladora
p69	Clipin-A	gi 1706004	51	,10	,36	8	Proteína de matriz
p70	Apolipoprotein E	gi 114039	36	,05	,23	11	Transportadora
p71	Histone H4	gi 51317339	11	,02	,11	11	Componente genético
p72	Ig kappa chain V-III VG	gi 125811	13	,07	,33	10	Imunomoduladora
p73	Cytokeratin-10	gi 269849769	59	,02	,12	5	Proteína de matriz
p74	Gelsolin	gi 121116	86	,07	,39	6	Proteína de matriz

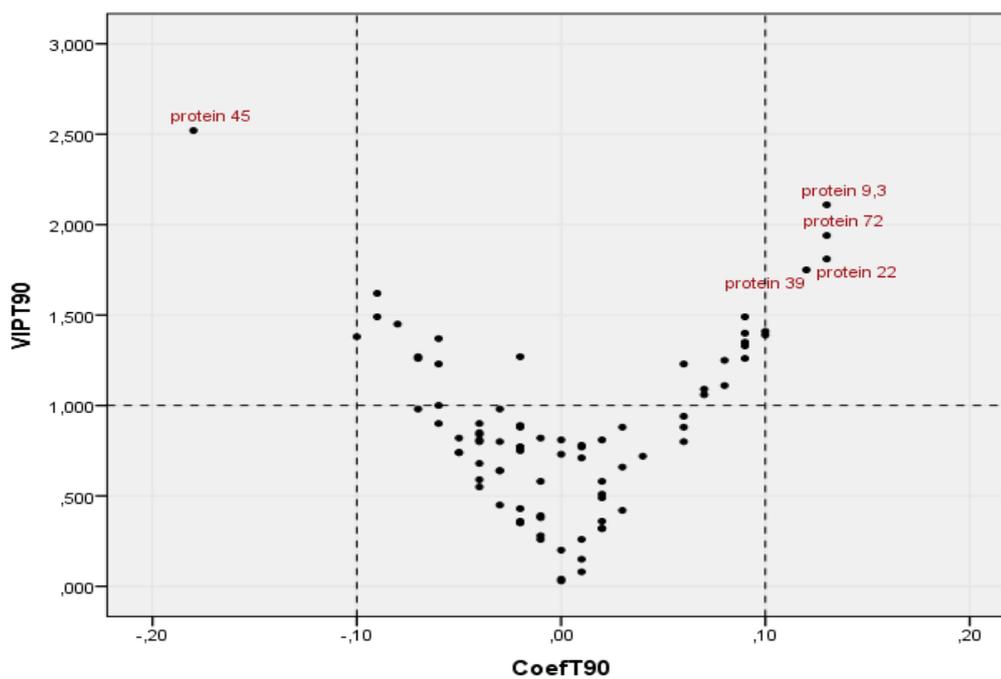
**Tabela 3:** Coeficientes da PLS das amostras escalonadas e os valores de VIP

Model Coefficients for Centered and Scaled Data		Variable Importance Table	
Amostras	Coeficiente	Amostras	VIP
protein 1	-0,01	protein 1	0,58
protein 2	0,09	protein 2	1,35
protein 3	-0,02	protein 3	1,27
protein 4	0,06	protein 4	1,23
protein 5	0,02	protein 5	0,32
protein 5,2	0,02	protein 5,2	0,49
protein 6	0,02	protein 6	0,51
protein 7	0,07	protein 7	1,06
protein 8	-0,07	protein 8	0,98
protein 9	-0,04	protein 9	0,55
protein 9,3	0,13	protein 9,3	2,11
protein 10	-0,02	protein 10	0,43
protein 10,1	-0,01	protein 10,1	0,39
protein 10,2	-0,06	protein 10,2	1,00
protein 11	0,03	protein 11	0,88
protein 11,2	0,02	protein 11,2	0,58
protein 12	0,01	protein 12	0,77
protein 12,2	-0,06	protein 12,2	1,37
protein 13	-0,04	protein 13	0,59
protein 13,2	-0,01	protein 13,2	0,28
protein 14	0,01	protein 14	0,78
protein 15	-0,10	protein 15	1,38
protein 16	0,09	protein 16	1,33
protein 17	-0,07	protein 17	1,27
protein 18	-0,04	protein 18	0,90
protein 19	-0,05	protein 19	0,74
protein 20	0,09	protein 20	1,26
protein 21	-0,09	protein 21	1,49
protein 22	0,13	protein 22	1,81
protein 23	-0,04	protein 23	0,85
protein 24	-0,04	protein 24	0,84
protein 25	-0,04	protein 25	0,68
protein 25,2	0,01	protein 25,2	0,15
protein 26	0,06	protein 26	0,80

protein 27	-0,01	protein 27	0,82
protein 28	-0,02	protein 28	0,77
protein 29	-0,03	protein 29	0,64
protein 30	-0,01	protein 30	0,26
protein 31	0,07	protein 31	1,09
protein 32	-0,03	protein 32	0,98
protein 32,2	-0,02	protein 32,2	0,77
protein 33	0,03	protein 33	0,42
protein 34	-0,03	protein 34	0,64
protein 35	0,04	protein 35	0,72
protein 36	-0,02	protein 36	0,89
protein 37	-0,04	protein 37	0,80
protein 38	0,06	protein 38	0,88
protein 39	0,12	protein 39	1,75
protein 40	0,00	protein 40	0,73
protein 41	0,08	protein 41	1,11
protein 42	0,06	protein 42	0,94
protein 43	0,09	protein 43	1,40
protein 44	-0,03	protein 44	0,45
protein 45	-0,18	protein 45	2,52
protein 46	0,09	protein 46	1,49
protein 46,2	0,03	protein 46,2	0,66
protein 47	0,00	protein 47	0,20
protein 48	0,10	protein 48	1,39
protein 49	0,01	protein 49	0,08
protein 50	0,00	protein 50	0,81
protein 51	-0,04	protein 51	0,81
protein 52	-0,05	protein 52	0,74
protein 53	0,01	protein 53	0,26
protein 54	0,02	protein 54	0,81
protein 55	0,02	protein 55	0,36
protein 56	0,00	protein 56	0,04
protein 57	-0,05	protein 57	0,82
protein 58	-0,06	protein 58	0,90
protein 59	-0,01	protein 59	0,38
protein 60	0,01	protein 60	0,71
protein 61	0,08	protein 61	1,25

---

protein 62	-0,03	protein 62	0,80
protein 63	-0,02	protein 63	0,36
protein 64	0,02	protein 64	0,32
protein 65	-0,02	protein 65	0,75
rotein 66	-0,02	protein 66	0,88
protein 67	-0,09	protein 67	1,62
protein 68	0,00	protein 68	0,03
protein 69	-0,02	protein 69	0,35
protein 70	-0,08	protein 70	1,45
protein 71	-0,07	protein 71	1,26
protein 72	0,13	protein 72	1,94
protein 73	0,10	protein 73	1,41
protein 74	-0,06	protein 74	1,23

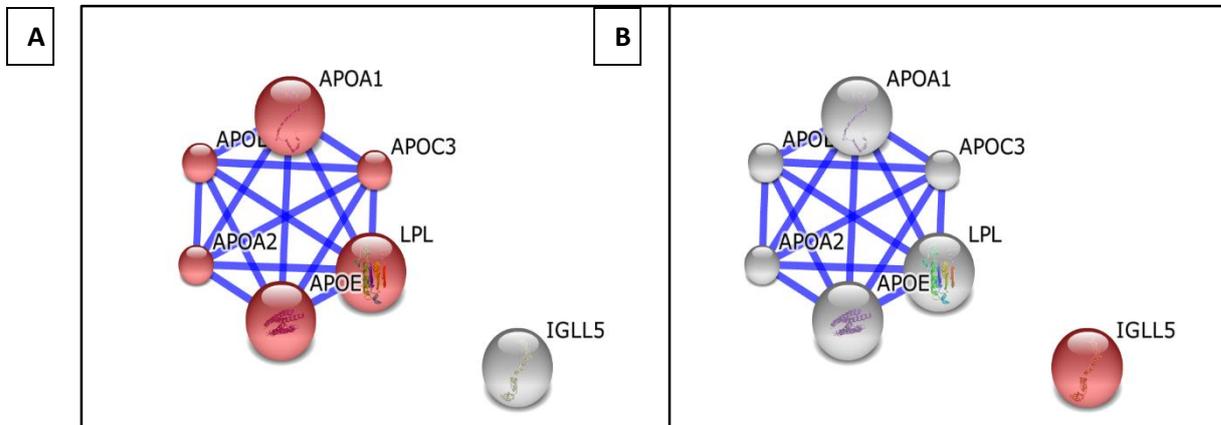


**Figura 1:** Diagrama (Volcano plot) das cinco proteínas que se expressaram diferentemente entre úlceras venosas crônicas que cicatrizam (CoefT90 negativo) e que não cicatrizam (CoefT90 positivo).

**Tabela 4:** Proteínas diferencialmente expressas identificadas entre as úlceras venosas que cicatrizam e aquelas úlceras que não cicatrizam.

Proteína	Nome	Código de acesso	Expressão diferencial *
p45	Titina	gi 384872704	C
P9.3	Ig lambda VII chain C region	gi 294956599	NC†
P22	Apolipoproteína A-II	gi 114000	NC†
P39	histona H 2B type 1D	gi 21542074	NC
P72	Ig kappa chain V - III region	gi 125811	NC

\* C - expressão diferencial em úlceras que cicatrizaram; NC - expressão diferencial em úlceras que não cicatrizaram. † Proteínas biomarcadoras em potencial de difícil cicatrização



**Figura 2:** Rede de interações entre as proteínas biomarcadoras APOA2 e IGLL5. **A:** associação direta entre a proteína APOA2 (apolipoproteína AII) e outras moléculas reguladoras de partículas lipoproteicas do plasma; **B:** Ausência de associação direta entre a proteína IGLL5 (Ig lambda VII chain C region), responsável por processos imunes e APOA2.

