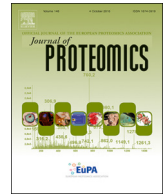




Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Proteomics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jprot

Correlação entre as proteínas do exsudato da úlcera venosa crônica e o perfil clínico: um estudo transversal

Nayara Rodrigues Vieira Cavassan^a, Caio Cavassan Camargo^a, Letícia Gomes de Pontes^a,
Benedito Barraviera^{a,b}, Rui Seabra Ferreira^{a,b}, Hélio Amante Miot^c,
Luciana Patrícia Fernandes Abbade^c, Lucilene Delazari dos Santos^{a,b,*}

^a Graduate Program in Tropical Diseases, Botucatu Medical School (FMB), Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu, Sao Paulo, Brazil

^b Center for the Study of Venoms and Venomous Animals (CEVAP), Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu, Sao Paulo, Brazil

^c Department of Dermatology and Radiology, Botucatu Medical School (FMB), Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu, Sao Paulo, Brazil

INFORMAÇÕES DO ARTIGO

Palavras-chave:

Úlceras venosas crônicas
Exsudato inflamatório
Espectrometria de massa
Proteômica clínica

RESUMO

As úlceras venosas crônicas afetam a qualidade de vida de pacientes em todo o mundo. Os objetivos deste estudo foram identificar as proteínas expressas no exsudato da úlcera venosa crônica, categorizá-las quanto ao seu papel e correlacioná-las com os aspectos clínicos e epidemiológicos da doença. A população do estudo consistiu de 37 úlceras de 28 pacientes, e os exsudatos inflamatórios dessas trinta e sete úlceras foram submetidos à digestão trípica e análise por espectrometria de massa. Vinte e três pacientes eram do sexo feminino (62,2%) e cinco (37,8%) do sexo masculino. Os pacientes tinham idade média de 70 (\pm 10,1) anos. Dos pacientes, 73% aderiram à compressão e repouso, 81,1% relataram história de varizes primárias, 54,1% relataram história de hipertensão arterial sistêmica, 54,1% relataram história de tecido desvitalizado no leito da ferida e 64,9% relataram úlceras com mais de dez anos de evolução. Setenta e seis proteínas foram identificadas e agrupadas de acordo com seu papel principal no processo de cicatrização. Oito correlações entre dados clínico-epidemiológicos e expressão proteica foram dignas de nota: diabetes mellitus vs. Ig gama-2 e apolipoproteína-A1 e albumina; insuficiência cardíaca congestiva vs. Ig lambda-2; colonização vs. actina; terapia compressiva vs. Ig kappa; hipertensão arterial sistêmica vs. alfa-2-macroglobulina e apolipoproteína-A1; área de úlcera vs. apolipoproteína-A1; raça vs. Ig de cadeia pesada e cadeia de Ig γ -1; idade e raça vs. cadeia Ig γ -1. Essas associações podem ajudar a elucidar o prognóstico e a cronicidade das úlceras venosas crônicas com base nas proteínas secretadas.

Significância biológica

As úlceras venosas crônicas (UVCs) são um problema de saúde pública mundial e representam um ônus para os serviços de saúde e para o erário público. As pessoas que têm úlceras de perna têm uma qualidade de vida ruim por causa da dor, dificuldade de locomoção, mau cheiro que exala da ferida, visitas frequentes ao médico e alto custo do tratamento. Por outro lado, um novo selante de fibrina heteróloga foi desenvolvido a partir do sangue de búfalos *Bubalus bubalis*, e uma serinoprotease do veneno da cobra *Crotalus durissus terrificus* está sendo considerada por pesquisadores brasileiros como um medicamento promissor para tratar UVCs. Este estudo é original ao propor a descrição da composição proteica de exsudatos de UVCs. Esses resultados podem facilitar a compreensão do prognóstico e cronicidade de úlceras venosas crônicas com base nas proteínas expressas e fornecer suporte científico para saber se esse selante de fibrina heterólogo tem propriedades terapêuticas ou oclusivas.

1. Introdução

As úlceras venosas crônicas (UVCs) são um problema de saúde pública mundial e representam um ônus para os serviços de saúde e para o erário público. As pessoas que têm úlceras de perna têm uma qualidade de vida ruim por causa da dor, dificuldade de locomoção, mau cheiro que exala da ferida, visitas frequentes ao médico e alto custo do tratamento. Por outro lado, um novo selante de fibrina heteróloga foi desenvolvido a partir do sangue de búfalos *Bubalus bubalis*, e uma serinoprotease do veneno da cobra *Crotalus durissus terrificus* está sendo considerado por pesquisadores brasileiros como um medicamento promissor para tratar UVCs. Este estudo é original ao propor a descrição da composição proteica de exsudatos de UVCs. Esses resultados podem facilitar a compreensão do prognóstico e cronicidade de úlceras venosas crônicas com proteínas de base nas expressas e fornecer suporte científico para saber se esse selante de fibrina heterólogo tem propriedades terapêuticas ou oclusivas.

Autor correspondente em: Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.
E-mail: lucilene@cevap.unesp.br (L.D. dos Santos).

<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.09.009>

Received 22 March 2018; Received in revised form 8 September 2018; Accepted 10 September 2018

1874-3919/© 2018 Published by Elsevier B.V.

fa cicatrização tecidual envolve uma complexa rede de sinalização que inclui atores de crescimento e seus receptores, proteínas da matriz extracelular e diferentes classes de proteases e seus inibidores [11]. A interação organizada desses mediadores direciona a regeneração da pele por meio da epitelização das estruturas dérmicas, formando tecido de granulação com deposição de matriz de reparo. O exsudato inflamatório das UVCs é uma mistura complexa e dinâmica dessas proteínas, modula o ambiente da ferida e pode refletir o estado geral de cicatrização, indicando o estado de cura da ferida, tornando-as úteis na identificação dos fatores envolvidos na reparação tecidual ou a falta dela [12-16].

A espectrometria de massa tornou-se uma ferramenta analítica importante na identificação de proteínas em várias amostras biológicas [17-20] e na caracterização de CVUs [21-24]. Esta caracterização visa ajudar a entender melhor a cicatrização retardada de feridas crônicas, esclarecendo os diferentes papéis que as proteínas desempenham no microambiente da ferida, bem como definir como os dados clínicos e epidemiológicos se correlacionam com o perfil proteômico. Os objetivos deste estudo foram identificar as proteínas expressas nos exsudatos da UVC, agrupá-las de acordo com suas principais funções e correlacionar seus níveis de expressão com variáveis clínicas. Acreditamos que nossos resultados podem ajudar a identificar a melhor decisão terapêutica clínica.

2. Materiais e métodos

2.1. Tipo de estudo e população

Este foi um estudo transversal, no qual trinta e sete CVUs de 28 pacientes foram incluídos. Os pacientes foram atendidos no Ambulatório de Úlceras Crônicas do Serviço de Dermatologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu, SP, Brasil, e apresentavam uma ou mais UVCs ativas com diâmetro linear de 2 a 15 cm e com evolução superior a seis semanas confirmado clinicamente e por ultrassonografia Doppler vascular (DV 610B). Foram excluídas úlceras infectadas e de outras etiologias associadas à doença arterial periférica ou com tecido necrótico. Os pacientes e feridas foram incluídos consecutivamente de acordo com a ordem de admissão.

Todos os pacientes preencheram um questionário clínico e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido aprovando o uso de seu material biológico para pesquisa acadêmica (comitê de ética em pesquisa institucional, protocolo nº 501.218/2013). Nenhuma terapia curativa foi padronizada para este estudo, e o tratamento foi prescrito individualmente de acordo com a indicação pragmática do dermatologista responsável por cada paciente.

3. Análise da área da úlcera

O perímetro de cada UVC foi desenhado em filme plástico com marcador e depois transferido para uma folha de papel branco, onde foi fotografado. Uma escala de 2 cm foi colocada ao lado do desenho para criar uma referência. A análise digital automática das imagens das úlceras foi analisada com o software ImageJ 1.46v [25] (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA).

4. Recolha e preparação de material

O exsudato foi coletado no local, com base no protocolo desenvolvido por Fernandez e colaboradores [22]. Primeiramente, a úlcera foi lavada com solução de cloreto de sódio 0,9% (p/v) e, em seguida, seca com gaze estéril. A lesão foi então coberta com curativo semi-oclusivo transparente de poliuretano (Tegaderm®; 3 M Health Care, St. Paul, MN, USA) e o paciente foi mantido em repouso por 30 a 60 minutos para aguardar o exsudação tecidual. O exsudato acumulado entre o leito da UVC e o curativo foi coletado com o auxílio de uma micropipeta com ponta estéril descartável. Em seguida, foi transferido para tubos plásticos LoBind (Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha), os quais foram rotulados e armazenados em gelo até a chegada ao laboratório. Os tubos foram centrifugados a 14.000 × g a 4 ° C por 10 min para induzir a sedimentação dos detritos celulares.

O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C até o uso.

5. Quantificação de proteínas

As proteínas presentes no exsudato foram então quantificadas em triplicata usando o método de Bradford [26] (BioRad®; Protein Assay, cod. 500-0001, Hercules, Califórnia, EUA), com albumina de soro bovino (BSA) como padrão proteíno.

6. Digestão de proteínas em solução

As amostras foram digeridas em solução, começando pelas etapas de redução e alquilação, utilizando-se ditiotretol (DTT) 10 mM e iodoa-cetamida (IAA) 45 mM, respectivamente, ambos em solução aquosa de bicarbonato de amônio 50 mM. Em seguida, as amostras foram submetidas à digestão proteolítica na presença de tripsina na concentração de 1:50 (p:p enzima:substrato) em solução tampão de bicarbonato de amônio 50 mM, pH 7,8. As proteínas foram digeridas com tripsina a 37 °C por 18 h, e esse processo foi interrompido com a adição de ácido fórmico 1% (v/v) em relação ao volume da amostra. As amostras foram então dessalinizadas usando cartuchos Sep-Pak Vac C18 (Waters, Milford, MA, EUA). As amostras digeridas e dessalinizadas foram concentradas em SpeedVac™ (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) e mantidas a 4 °C até análise por espectrometria de massas.

7. Sequenciamento de peptídeos por espectrometria de massa

As amostras foram solubilizadas em 60 µL de solução de ácido fórmico a 0,1% (v/v). Em seguida, uma alíquota de 15 µL dos digestos de tripsina de cada amostra foi injetada individualmente em uma coluna analítica BEH 130 (100 µm × 100 mm) C18 de 1,7 µm em um sistema de cromatografia líquida de fase reversa (RP-UPLC - NanoAcquity UPLC, Waters), que foi acoplado a um instrumento de espectrômetro de massa MicroMass Q-ToF PREMIER (Waters), para análise em triplicata. O gradiente linear utilizado foi de 2% a 90% (v/v) de acetonitrila em 0,1% (v/v) de ácido fórmico por 60 min com uma taxa de fluxo de 600 nL/min. O instrumento foi operado usando o modo de ionização positiva e os espectros de MS entre 100 e 2000 m/z foram registrados.

8. Análise de dados para identificação de proteínas

As proteínas dos dados de espectrometria de massa (espectrometria de massa em tandem de cromatografia líquida [LC MS-MS]) foram identificadas pelo software Mascot Distiller v.2.3.2.0 (Matrix Science, Boston, MA, EUA) usando bancos de dados públicos (NCBI, taxonomia Homo sapiens, 33.695.097 seqüências). A tripsina foi usada como enzima proteolítica. A carbamidometilação foi definida como uma modificação fixa (massa monoisotópica 57,0215 Da) e a oxidação da metionina como uma modificação variável (massa monoisotópica 15,9949 Da). Uma margem de erro de 0,1 Da foi escolhida para MS e MS/MS. Notavelmente, os dados MS/MS foram considerados válidos de acordo com o algoritmo estatístico da ferramenta Mascot, com valores de identificação Mascot Score acima de 42 e pelo menos uma das seqüências peptídicas identificadas com um valor Ion Score maior que 30 indicando validade. As contagens espectrais de todas as proteínas identificadas foram realizadas com a ferramenta Scaffold Q+ (Proteome Software, Inc., Portland, OR), e a taxa de falsa descoberta (FDR) foi de 1% para as proteínas e 0,1% para os peptídeos, com uma confiabilidade de 95%. As proteínas label-free foram quantificadas com a exigência de que pelo menos dois peptídeos fossem compartilhados entre as amostras, e as contagens médias de íons das três análises de cada proteína foram consideradas as variáveis do estudo. Após a identificação, as proteínas foram agrupadas de acordo com suas funções mais importantes e caracterizadas as principais proteínas de cada grupo envolvidas no processo cicatricial. As interações de proteínas também foram investigadas em relação às suas funções moleculares, processos biológicos e componentes celulares usando o software STRING (versão 10.5, <http://string-db.org>) [27] com os parâmetros básicos: pontuação de corte de 0,40, confiança como rede

bordas e valor p de enriquecimento PPI de < 1,0e-16.

8.1. Análise estatística

Para caracterizar o perfil proteômico das CVUs, as contagens espectrais de cada proteína identificada foram representadas pela média ponderada das triplicatas de cada amostra: $(3 * \text{mediana} + \text{mínimo} + \text{máximo}) / 5$. Proteínas que foram identificadas em < 30% das exsudatos foram excluídos da análise, e para os demais, as quantificações que resultaram em zero sofreram imputações múltiplas [28]. Valores outliers ($> 1,5 \times$ o desvio interquartil adicionado ao terceiro quartil ou subtraído do primeiro quartil) foram corrigidos por winsorização [29]. A normalidade das amostras foi estimada pelo teste de Shapiro-Wilk [30]. Para verificação de outliers na amostra, foi realizada uma análise dos quatro primeiros componentes principais (rotação Varimax) dos dados escalonados (divisão pela mediana). Casos extremos foram excluídos das análises subsequentes.

As variáveis clínicas foram selecionadas de acordo com a literatura epidemiológica da UVC com o objetivo de testar as correlações entre os achados proteômicos [31-35].

A análise de euforia foi realizada usando o coeficiente de correlação de Spearman [36] entre os dados clínicos do paciente e as proteínas identificadas. Um coeficiente de correlação (ρ) acima de 0,35, que é o critério utilizado para a seleção de variáveis para a análise multivariada, foi considerado adequado. Para a análise multivariada, os dados escalonados foram submetidos à análise fatorial de correspondência múltipla [37] com matriz de componentes rotacionados (Varimax), e foi considerada uma seleção de cargas fatoriais variáveis $> 0,3$ dispostas nos primeiros quatro componentes principais. As associações entre variáveis clínicas e proteômicas indicadas pela análise multivariada foram validadas por modelos lineares generalizados. Todos os testes foram realizados usando o software IBM SPSS v.22 [38]. A significância foi determinada como $p < 0,05$.

9. Resultados

Trinta e sete CVUs de 28 pacientes, com idade média de 70 anos ($\pm 10,1$ anos), foram incluídos no estudo. A área mediana das lesões foi de 16,85 cm² (percentil 25 = 10,64 e percentil 75 = 30,40), sendo a maioria em mulheres (62%) de raça branca e com tempo de início da UVC > 10 anos e apresentava tecido desvitalizado no leito da ferida. Além disso, a maioria dos pacientes relatou adesão à compressão e repouso, história de varizes primárias e história de hipertensão arterial sistêmica (Tabela 1).

Um total de 110 proteínas foram identificadas nos exsudatos inflamatórios das UVCs. Trinta e quatro proteínas pertencentes a clusters de proteínas foram excluídas por serem proteínas homólogas e apresentarem contagem espectral reduzida em relação à proteína majoritária do mesmo locus genético. As 76 proteínas restantes foram então classificadas em ordem decrescente pelo valor de suas contagens espectrais totais, e estas foram classificadas de acordo com a principal função desempenhada no processo de cicatrização e resposta local à lesão, o que resultou em seis categorias: transporte, imunomoduladores, proteínas da matriz, inibidores de protease, componentes genéticos e atividade antimicrobiana (Tabela 2). Uma vez identificadas as proteínas mais abundantes no exsudado inflamatório, estas foram analisadas quanto à sua função biológica, função molecular e localização celular (Fig. 1). As interações proteína-proteína são exibidas na Fig. 2.

As variáveis clínicas selecionadas para o modelo foram: sexo, idade avançada (> 60 anos), raça, tempo de evolução, leito da úlcera, colonização, varizes primárias, varizes pós-trombóticas, adesão à compressão, adesão ao repouso, hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes mellitus (DM), insuficiência cardíaca congestiva (ICC) e área ulcerosa. Uma correlação bivariada significativa foi observada entre várias características clínicas e proteínas secretadas. As úlceras um e sete (outliers), que tiveram proteínas identificadas em < 30% dos exsudatos e as que não apresentaram coeficiente de correlação $> 0,35$ na análise bivariada,

Tabela 1

Distribuição das 37 úlceras observadas em 28 pacientes e seus dados epidemiológicos. e variáveis clínicas, do Ambulatório de Úlceras Crônicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu, SP – Brasil, em 2015.

Variável	Número	Porcentagem
Sex		
Female	18 ^a	64.2 ^a
Race		
Mixed or Black	4 ^a	14.2 ^a
White	24 ^a	85.7 ^a
Varices		
Primary	22 ^a	78.6 ^a
Post-thrombotic	9 ^a	32.0 ^a
Treatment compliance		
Compression	20 ^a	71.4 ^a
Rest	20 ^a	71.4 ^a
Comorbidities		
Systemic hypertension	16 ^a	57.1 ^a
Diabetes Mellitus	7 ^a	25.0 ^a
Congestive heart failure	3 ^a	10.7 ^a
Progression time (years)		
1-5	10 ^b	27.0 ^b
6-10	3 ^b	8.1 ^b
> 10	24 ^b	64.9 ^b
Devitalised tissue	20 ^b	54.1 ^b
Bacterial colonization	4 ^b	10.8 ^b

^a Data for twenty-eight patients.

^b Data for thirty-seven ulcers.

foram todos excluídos da análise de correlação multivariada.

Vinte e uma proteínas e quatorze variáveis clínicas foram incluídas na análise fatorial de correspondência múltipla. O modelo de quatro componentes explicou 51% da variância dos dados, indicando proximidade (associação) entre as seguintes variáveis clínicas e proteínas, o que foi validado por um modelo linear generalizado: diabetes mellitus (DM), região C da cadeia Ig gama-2 (P20), apolipoproteína A1 (P8) e albumina (P1); insuficiência cardíaca congestiva (ICC) e regiões C da cadeia lambda-2 de Ig (P11); colonização e actina (P21); terapia compressiva e região V-III da cadeia kappa de Ig (P37); hipertensão arterial sistêmica (HAS), alfa-2-macroglobulina (P5) e apolipoproteína A1 (P8); área de úlcera e apolipoproteína A1 (P8); raça, região Ig V-III de cadeia pesada (P57) e região C da cadeia Ig γ -1 (P6); idade, raça e região C da cadeia Ig γ -1 (P6) (Fig. S1 complementar).

10. Discussão

Uma abordagem proteômica baseada em MS tem sido amplamente utilizada para avaliar os estágios de cicatrização de UVCs [21-24] e outras úlceras agudas [39,40] e crônicas [41,42] identificando proteínas com expressão positiva ou negativa a partir do exsudato inflamatório. Existe um forte consenso entre os pesquisadores de que as proteínas expressas no fluido da ferida atuam como importantes moduladores no microambiente da lesão. Essas proteínas podem refletir a fase e a condição cicatricial e ajudar a entender o processo de cicatrização [43-47].

Uma vez caracterizado o perfil proteômico das CVUs e categorizadas as proteínas, foram investigadas as principais interações entre o perfil proteômico e as variáveis clínicas.

O DM foi associado às proteínas da região C da cadeia gama-2 (P20) e albumina (P1) em dois componentes distintos na análise fatorial de correspondência múltipla. As complicações do DM levaram ao aparecimento de muitas anormalidades teciduais e metabólicas, como insuficiência renal e aterosclerose, que podem favorecer o estresse oxidativo, e até mesmo calcificações anormais dos tecidos moles e vasculares dos membros inferiores. Todos esses eventos contribuem para a limitação do fluxo venoso com subsequente aumento da pressão arterial, favorecendo a hipóxia tecidual e o dano endotelial [48-53].

Tabela 2

Identificação e categorização de 76 proteínas dos exsudatos inflamatórios de úlceras venosas crônicas atendidas no Ambulatório de Úlceras Crônicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu, SP – Brasil, em 2015.

ID	Protein Name	Code Number	Function	Spectral counting ^a	SD	Medium	Quartile 1	Quartile 3
P1	Albumin	P02768.2	Transporter protein	326.1027027	89.78768316	290.4	253.8	430
P2	Transferrin	P02787.3	Transporter protein	40.96216216	9.596276806	39.6	35.8	47.2
P3	Haptoglobin	J3QLC9	Imunomodulation	22.65945946	11.27049884	22	14	31.6
P4	Complement C3	P01024.2	Imunomodulation	19.28648649	5.908100003	20	14.4	22.4
P5	Alpha2M	P01023.3	Protease Inhibitor	19.57297297	6.836204626	18.6	15.6	23.8
P6	Ig γ -1 chain C region	P01857.1	Imunomodulation	31.46486486	10.29585181	30.6	25	37
P7	Ig α -1 chain C region	P01876.2	Imunomodulation	16.49189189	7.704052987	16.2	11.4	21.4
P8	Apolipoprotein-AI	P02647.1	Transporter protein	16.08108108	5.006542266	15.4	12.2	19
P9	Hemoglobin- β	P68871.2	Transporter protein	14.14054054	11.5529568	13.2	5.8	18.6
P10	Alpha1antitrypsin	P01009.3	Protease Inhibitor	12.71351351	5.120881118	12.8	10.6	15.2
P11	Ig lambda-2 chain C regions	POCG05.1	Imunomodulation	25.56216216	7.516180744	26.8	23.6	31
P12	Ig kappa chain C region	P01834.1	Imunomodulation	23.67027027	6.045975009	25	19	28
P13	Apo-AII	P02652.1	Transporter protein	7.956756757	2.81627616	7.6	6.2	9.2
P14	Hemopexin	P02790.2	Transporter protein	8.243243243	2.761294034	7.6	6.4	10.6
P15	DBP	P02774.1	Imunomodulation	7.902702703	2.761087395	8	6	10.4
P16	Alpha-globin	P69905.2	Transporter protein	7.67027027	5.757934857	6	3.2	10
P17	Ceruloplasmin	P00450.1	Transporter protein	5.383783784	2.984917039	5	4	6.2
P18	Ig gamma-4 chain C region	P01861.1	Imunomodulation	21.68648649	6.910787146	20.8	16.8	26.4
P19	AGP 1	P02763.1	Transporter protein	5.383783784	2.723306152	4.6	3.2	7.8
P20	Ig gamma-2 chain C region	P01859.2	Imunomodulation	14.61621622	4.986064665	14.4	10.8	17.6
P21	Actin	P60709.1	Extracellular matrix protein	3.659459459	3.12262883	2.8	1	5.2
P22	Ig gamma-3 chain C region	P01860.2	Imunomodulation	19.07027027	6.360680644	18.2	14.8	23.2
P23	Alpha-2-HS-glycoprotein	P02765.1	Imunomodulation	2.691891892	1.745848787	2.4	1	3.6
P24	HP1	P59665.1	Antimicrobial activity	3.091891892	2.209874101	2.6	1.6	4
P25	Complement C4-B	POCOL5.2	Imunomodulation	3.048648649	3.279026077	2.2	0.4	4.4
P26	Ig mu chain C region	P01871.3	Imunomodulation	2.751351351	3.233300826	2	0.6	3.6
P27	Alpha-1B-glycoprotein	P04217.4	Imunomodulation	2.275675676	1.542977894	2.2	0.8	3.6
P28	Fibrinogen beta chain	P02675.2	Extracellular matrix protein	1.589189189	2.652020591	0.6	0	1.8
P29	Fibrinogen alpha chain	P02671.2	Extracellular matrix protein	1.637837838	1.679178263	1	0.4	2.4
P30	AGP 2	P19652.2	Transporter protein	2.686486486	1.8009507	2	1.4	3.4
P31	Fibrinogen gamma chain	P02679.3	Extracellular matrix protein	1.459459459	2.103364957	0.4	0	2
P32	Complement factor B	P00751.2	Imunomodulation	1.243243243	0.808476118	1.2	0.6	2
P33	VN	P04004.1	Extracellular matrix protein	0.972972973	1.077200242	0.6	0.2	1.4
P34	Apo B-100	P04114.2	Transporter protein	0.72972973	0.911916439	0	0	1.2
P35	HPRG	P04196.1	Imunomodulation	0.605405405	0.701564104	0.4	0	1
P36	Kininogen-1	P01042-2	Protease Inhibitor	0.540540541	0.642676461	0.2	0	0.8
P37	Ig kappa chain V-III region SIE	P01620.1	Imunomodulation	0.654054054	0.740343237	0.4	0	1
P38	Ig heavy chain V-III region TUR	P01779.1	Imunomodulation	0.589189189	0.683042126	0.2	0.2	1
P39	Beta-2-glycoprotein 1	P02749.3	Extracellular matrix protein	0.583783784	0.790749825	0	0	1
P40	H2B K	O60814.3	Genetic component	0.578378378	1.472551666	0	0	0.2
P41	Lactoferrin	P02788.6	Antimicrobial activity	0.47027027	1.928854707	0	0	0
P42	Apo-AIV	P06727.3	Transporter protein	0.410810811	0.836588238	0	0	0.4
P43	Angiotensinogen	P01019.1	Antimicrobial activity	0.394594595	0.584021473	0	0	0.8
P44	MPO	P05164.1	Antimicrobial activity	0.264864865	0.766020096	0	0	0
P45	C1 Inh	P05155.2	Imunomodulation	0.237837838	0.364654594	0	0	0.2
P46	Collagen alpha-1(I) chain	P02452.5	Extracellular matrix protein	0.205405405	0.448420652	0	0	0.2
P47	ACT	P01011.2	Protease Inhibitor	0.27027027	0.672005648	0	0	0
P48	Neutrophil elastase	P08246.1	Imunomodulation	0.178378378	0.388111621	0	0	0.2
P49	Histone H2A type 2-C	Q16777.4	Genetic component	0.297297297	1.410769389	0	0	0
P50	FN	P02751.4	Extracellular matrix protein	0.145945946	0.354804011	0	0	0
P51	Stratifin	P31947.1	Extracellular matrix protein	0.064864865	0.362258514	0	0	0
P52	CK-6A	P02538.3	Extracellular matrix protein	0.037837838	0.103685827	0	0	0
P53	GAPDH	P04406.3	Extracellular matrix protein	0.254054054	0.621197139	0	0	0
P54	Plastin-2	P13796.6	Imunomodulation	0.183783784	0.375287677	0	0	0.2
P55	Alpha-enolase	P06733.2	Extracellular matrix protein	0.118918919	0.314322762	0	0	0
P56	ATIII	P01008.1	Extracellular matrix protein	0.102702703	0.285274221	0	0	0
P57	Ig heavy chain V-III region BRO	P01766.1	Imunomodulation	0.875675676	0.939682395	0.4	0.2	1
P58	Lumican	P51884.2	Extracellular matrix protein	0.059459459	0.301348321	0	0	0
P59	SAA	P0DJ18.1	Imunomodulation	0.183783784	1.084618088	0	0	0
P60	Keratin II cytoskeletal 1	P04264.6	Extracellular matrix protein	0.102702703	0.289142877	0	0	0
P61	Isoform 3 of Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	P19827-3	Protease Inhibitor	0.064864865	0.194673824	0	0	0
P62	NGAL	P80188.2	Transporter protein	0.108108108	0.446205221	0	0	0
P63	ITI heavy chain H4	Q14624.4	Imunomodulation	0.037837838	0.147857573	0	0	0
P64	Titin	Q8WZ42.4	Genetic component	0.032432432	0.110689892	0	0	0
P65	ITI-HC2	P19823.2	Transporter protein	0.032432432	0.100150038	0	0	0
P66	Lysozyme C	P61626.1	Antimicrobial activity	0.064864865	0.271022976	0	0	0
P67	Zn-alpha-2-GP	P25311.2	Imunomodulation	0.043243243	0.125920038	0	0	0
P68	Clipin-A	P31146.4	Extracellular matrix protein	0.054054054	0.192346035	0	0	0
P69	Apo-E	P02649.1	Transporter protein	0.037837838	0.199097061	0	0	0
P70	Histone H4	P62805.2	Genetic component	0.010810811	0.065759595	0	0	0
P71	Ig kappa chain V-III region VG	P04433.1	Imunomodulation	0.059459459	0.301348321	0	0	0
P73	CK-10	P13645.6	Imunomodulation	0.010810811	0.065759595	0	0	0

(continued on next page)

Tabela 2 (continuação)

ID	Protein Name	Code Number	Function	Spectral counting ^a	SD	Medium	Quartile 1	Quartile 3
P74	Gelsolin	P06396.1	Extracellular matrix protein	0.054054054	0.2968301	0	0	0
P75	Adrenocortical dysplasia protein homolog	Q96AP0.3	Extracellular matrix protein	0.059459459	0.192346035	0	0	0
P76	Ig kappa chain V-III region NG9	P01621.1	Extracellular matrix protein	0.016216216	0.098639392	0	0	0

ID = Identification of protein; SD = Standard deviation. The proteins were identified with Mascot Distiller v.2.3.2.0 (Matrix Science, Boston, MA, USA), using public databases (NCBI, taxonomy *Homo sapiens*, 33,695,097 sequences) with MS data from the LC MS-MS. The proteins are ranked according to their most important roles and the main proteins in each group involved in the healing process were characterized.

^a Average of spectral count.

Os autores, portanto, acreditam que a expressão local de imunoglobulina, incluindo a região C da cadeia gama IgG2, pode estar ligada à liberação de citocinas pró-inflamatórias, ativação de neutrófilos em resposta a danos celulares e geração de estresse oxidativo por complicações do diabetes, que pode contribuir para a cronicidade das úlceras venosas. A associação entre diferentes classes de imunoglobulinas e outras moléculas identificadas no perfil proteômico das lesões deste estudo, por meio da resposta ao estresse, são apresentadas na Fig. 3A.

Uma das complicações do DM é a disfunção renal e, conseqüentemente, ocorre um aumento da albumina na excreção urinária [54-56]. A albumina é uma proteína transportadora de zinco geralmente abundante no exsudato de úlceras. Estudos mostram que o íon zinco atua no crescimento e cicatrização dos tecidos, bem como nas funções imunológicas e na síntese de colágeno. Níveis diminuídos de zinco no microambiente da lesão levam à diminuição dos fatores de reconstrução tecidual e, conseqüentemente, ao impedimento cicatricial nas lesões ulcerativas. Portanto, é comum que feridas crônicas com uma clara progressão de cicatrização tenham altos níveis de albumina [57-59]. Acreditamos que a diminuição do transporte de zinco e fatores dependentes de albumina que contribuem para a aterogênese no DM não controlado podem promover a estagnação cicatricial das UVCs.

A ICC não foi predominante entre os pacientes deste estudo; entretanto, esta parece ser uma comorbidade comumente encontrada em estudos epidemiológicos de UVCs. Embora não seja bem compreendido, a somatória do edema cardíaco e venoso decorrente da ICC parece contribuir para o desenvolvimento das UVC; no entanto, eles não têm um efeito significativo no potencial de cura dessas úlceras [60]. O aparecimento de lesões crônicas pode estimular ainda mais a ativação de mediadores do complemento e moléculas de adesão, como a imunoglobulina Ig da região C da cadeia lambda-2 (P11) na área da ferida, evitando assim a evolução cicatricial das CVUs [61].

Por um lado, a característica clínica da terapia compressiva foi associada à região V-III da cadeia kappa da Ig neste estudo. Esta terapia é considerada fundamental para o tratamento da insuficiência venosa crônica por melhorar o volume de ejeção de sangue periférico, favorecendo assim a cicatrização das UVCs [62]. A não adesão à medicação e o uso indevido da compressão resulta em hipertensão venosa dos membros inferiores, levando à liberação de componentes pró-inflamatórios [62].

Várias doenças inflamatórias, incluindo doenças de pele, têm sido associadas à alta capacidade de ligação e ativação de neutrófilos e outras células de defesa, bem como à expressão de imunoglobulinas de cadeia kappa (P37) e cadeia pesada (cadeia gama Ig) [63, 64]. Assim, a associação entre a terapia compressiva clínica e as imunoglobulinas de cadeia kappa da Ig é factível sob o ponto de vista de que a falha da terapia promove a expressão diferencial dessa proteína no exsudato inflamatório.

Por outro lado, em nosso estudo, a HAS foi correlacionada com as proteínas alfa-2-macroglobulina (P5) e apolipoproteína A1 (P8). As úlceras venosas dos membros inferiores têm sido descritas como lesões frequentes entre os idosos com idade média entre 60 e 75 anos [65-68]. Muitos estudos também mostram maior incidência de HAS em indivíduos nessa faixa etária. O aumento da pressão arterial pode induzir disfunção endotelial vascular, favorecendo a formação de fibrose e ateroma no vaso

lúmen. Essa formação pode ser facilitada pela presença da proteína plasmática alfa-2-macroglobulina, que é um inibidor de várias classes de proteínases, dificultando a fibrinólise pela inibição da plasmina e da calicreína. A diminuição da plasmina pode levar ao desequilíbrio da coagulação/fibrinolítico, favorecendo a formação de trombos no interior dos vasos e aterosclerose, fatores que contribuem para o aparecimento de úlceras [69-71].

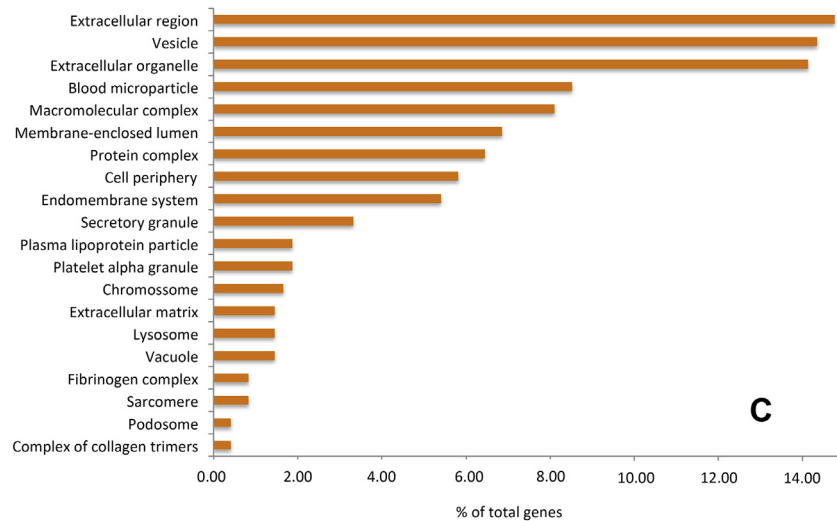
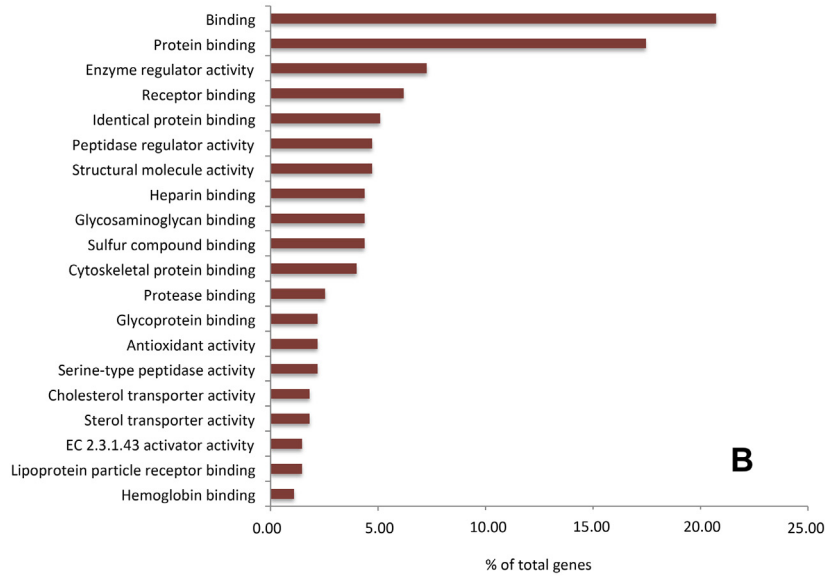
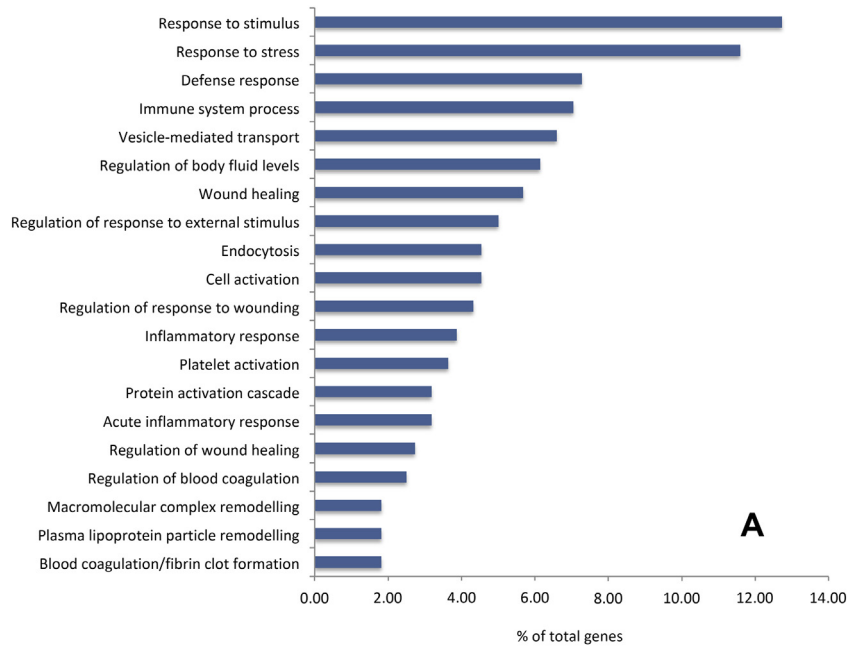
Muitos estudos têm mostrado uma correlação entre HAS, doença cardiovascular e metabolismo lipídico irregular. Apolipoproteínas como A1 (ApoA1), que é o principal composto proteico do HDL, e apolipoproteína B-100 (ApoB100) são descritas como biomarcadores em distúrbios coronarianos [72-75]. Em um estudo avaliando o perfil de apolipoproteínas em pacientes hipertensos, foram apresentados níveis séricos mais baixos de ApoA1 e HDL em comparação com controles saudáveis, enquanto os níveis de ApoB100 em comparação com compostos aterogênicos foram aumentados em pacientes com hipertensão [74]. Além disso, o composto HDL parece afetar positivamente o padrão cicatricial das lesões cutâneas, contribuindo para a formação de tecido de granulação e mediando positivamente o processo inflamatório local [76].

Além das propriedades antiaterogênicas da ApoA ligadas à sua capacidade de reverter o transporte do colesterol, quando esta proteína se liga à proteína ApoB100 por pontes dissulfeto, torna-se a proteína lipoproteína A (LpA), que é descrita na literatura como um modulador da angiogênese e inflamação e fibrinólise tecidual, atuando em homologia com o plasminogênio [74,77-81]. Yano e colegas [77] analisaram amostras de feridas em diferentes estágios de cicatrização e mostraram apolipoproteínas A em células endoteliais em todas as fases de reconstrução tecidual e valores mais altos de LpA apenas nas fases inflamatórias, então eles mostraram que estava associado com cicatrização principalmente por ser um bloqueio da fibrinólise e da angiogênese.

Assim, neste estudo, a ApoA1 parece estar associada à HAS devido ao seu fator protetor contra aterosclerose e insuficiência cardíaca e à área da lesão, principalmente por ser um bloqueio da fibrinólise desordenada que contribui para a proliferação das células endoteliais na cura. A correlação entre as proteínas que medeiam a resposta inflamatória e a cicatrização tecidual pode ser observada na Fig. 3B.

Estudos têm mostrado que a raça é um fator que altera a correlação entre as concentrações de LpA e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Nesse caso, os níveis de LpA são 2 a 3 vezes maiores em indivíduos negros do que em caucasianos [80,81]. No entanto, distúrbios vasculares associados a altos níveis dessa molécula apresentam maior incidência na população branca [82-85]. Pela predominância da raça branca e alta frequência de HAS em nossa população de estudo, acreditamos que possa haver alterações plaquetárias e endoteliais devido ao LpA, que resultam em aumento de infiltrados e substâncias pró-inflamatórias nos tecidos e aumento no desenvolvimento da resposta imune humoral, justificando assim a associação entre raça e imunoglobulinas P57 e P6 [83,86].

As correlações entre a colonização bacteriana e a proteína actina (P21) foram previamente descritas por vários estudos [34,87-91]. Eles estão ligados à capacidade de algumas exotoxinas excretadas por patógenos de alterar a actina em mamíferos pela inibição de pequenas GTPases e componentes com atividade juncional da barreira endotelial. Esta função leva à redução da fagocitose impulsionada pelo citoesqueleto



(legenda na próxima página)

Fig. 1. Classificação da ontologia gênica de 76 proteínas obtidas de 37 úlceras de 28 pacientes com base em seu envolvimento com String. Pacientes atendidos no Ambulatório de Úlceras Crônicas (UNESP) em SP, Brasil, em 2015. Porcentagem de acertos gênicos contra genes totais em processos biológicos para (A), função molecular (B) e componente celular (C) da base de dados online STRING.

remodelação, com disseminação bacteriana ocorrendo devido à formação reduzida de fibras de tensão e comprometimento cicatricial ocorrendo devido à diminuição da capacidade de migração de células epiteliais [92-97]. Messad e colegas [98] investigaram a distribuição de um gene codificador de fatores de diferenciação epidérmica (EDIN) de *Staphylococcus aureus* em

úlceras infectadas, e apresentaram alta prevalência desse gene em infecções moderadas a graves. Além disso, Humphreys e colaboradores [95] demonstraram que o fator de virulência EspG de *Escherichia coli* tem a capacidade de inibir a fagocitose pela polimerização da proteína actina, facilitando o escape patogênico e o estabelecimento da colonização.

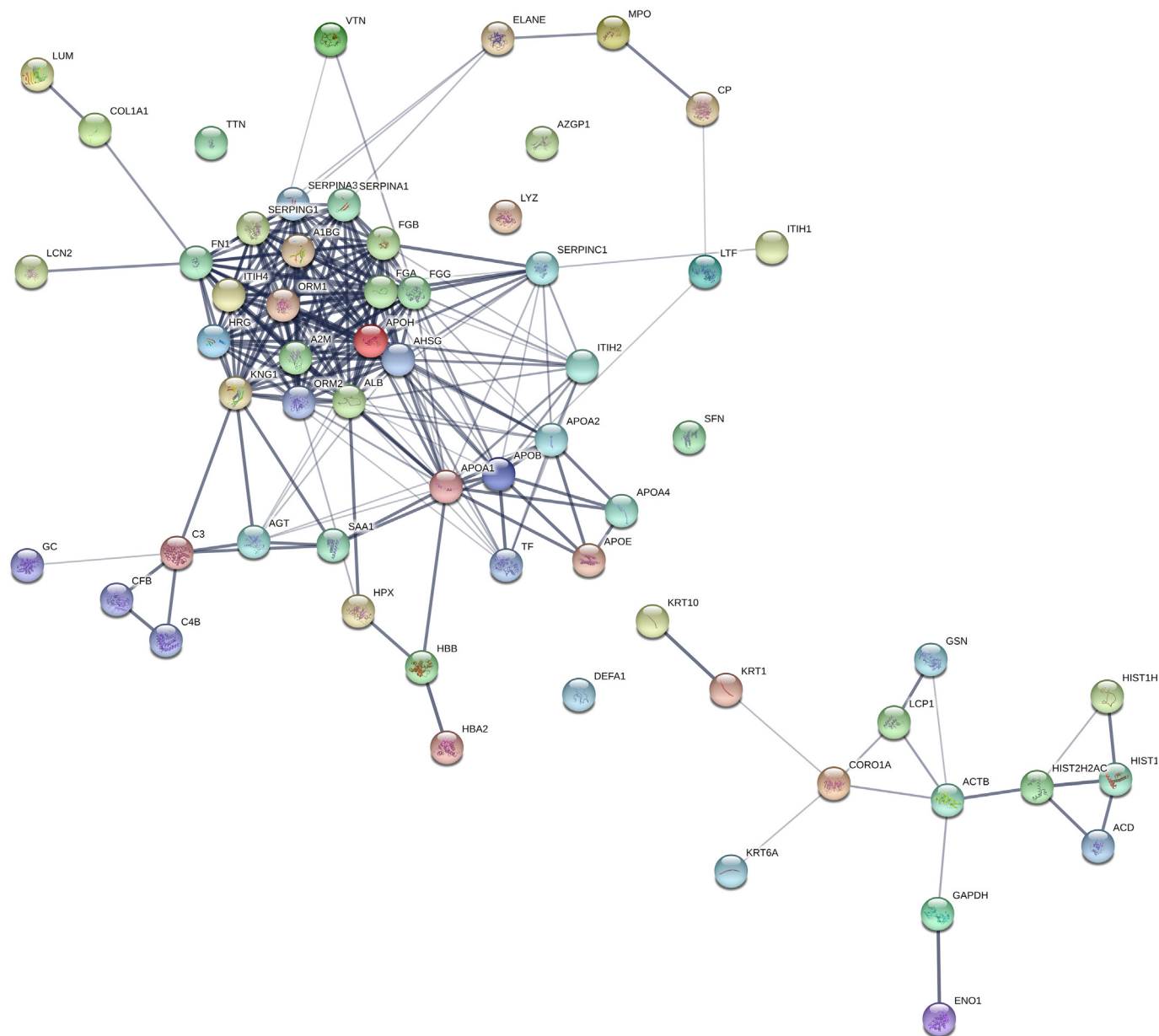
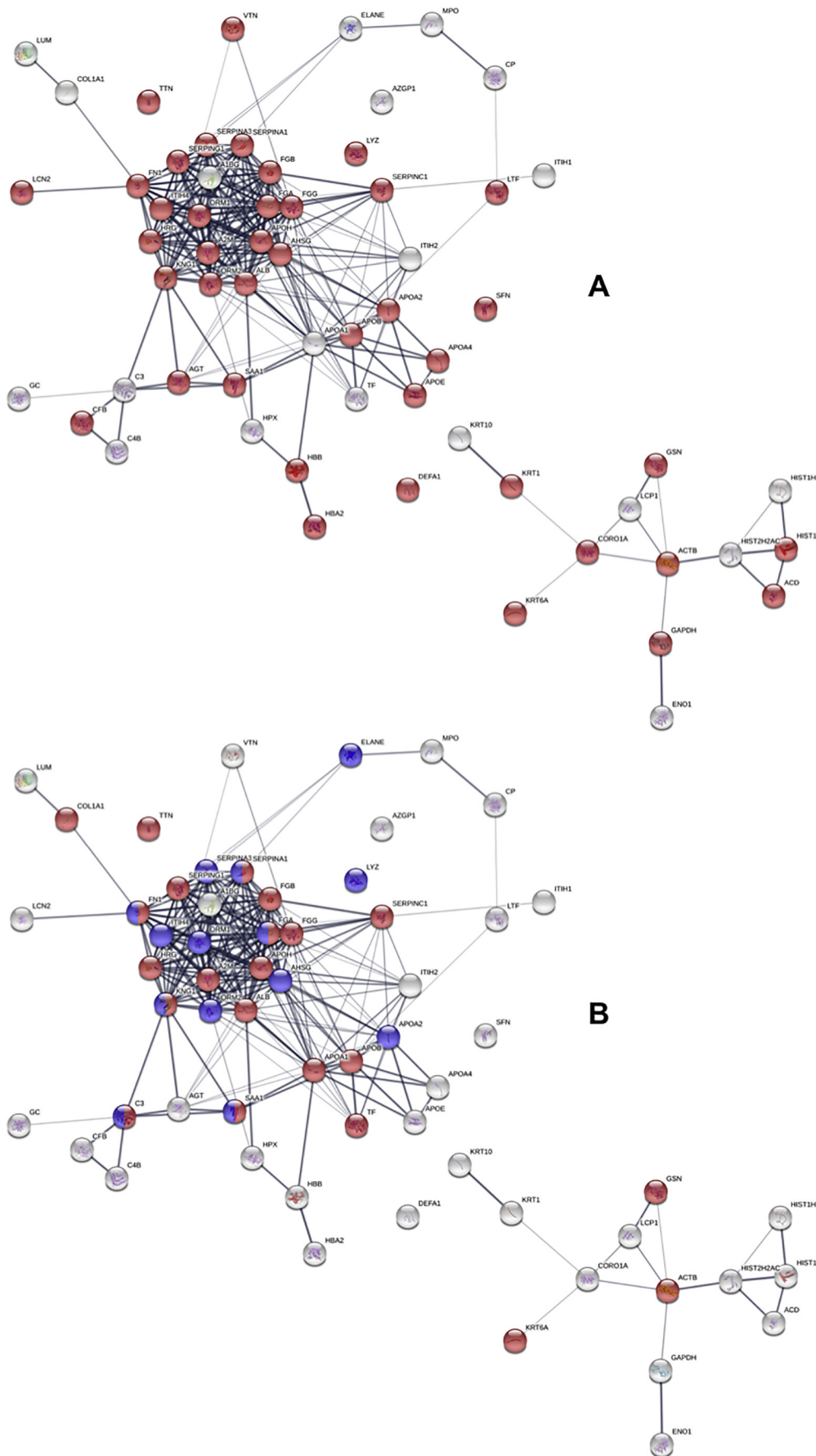


Fig. 2. Rede de interação proteína-proteína entre todas as proteínas identificadas neste estudo pelo software STRING. As feições escuras representam alta interação, enquanto as feições mais claras representam interações mais fracas. APOH: beta-2-glicoproteína 1; CORO1A: proteína de ligação à actina; MPO: colágeno tipo 1; VTN: vitronectina; GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; LTF: lactotransferrina; HRG: glicoproteína rica em histidina; APOB: apolipoproteína B; ENO1: enolase 1; APOA1: apolipoproteína A-1; C3: componente 3 do complemento; HBA2: hemoglobina, alfa 2; KRT1: queratina; APOE: apolipoproteína E; ORM1: orosomucóide 1; LYZ: lisozima; A1BG: alfa-1-b-glicoproteína; ELANE: elastase; CP: ceruplasmina; KNG1: cininogênio 1; HPX: hemoexina; ITIH4: família pesada dos inibidores de inter-alfa-tripsina; LUM: lumican; KRT10: queratina; ITH11: cadeia pesada 1 do inibidor inter-alfa-tripsina; LCN2: lipocalina 2; SERPING1: inibidor da serpina peptidase; HIST1H4H: histona; AZGP1: alfa-2-glicoproteína 1; ALB: albumina; FGB: cadeia beta do fibrinogênio; FGA: cadeia alfa do fibrinogênio; LCP1: proteína cistólica de linfócitos 1; A2M: alfa-2-macroglobulina; HIST2H2AC: histona; HBB: hemoglobina beta; FGG: cadeia gama de fibrinogênio; SFN: estratifica; TNN: Titina; FN1: fibronectina; SERPINA1: inibidor da serpina peptidase; SAA1: amilóide sérico A1; HIST1H2BK: histona; ACTB: actina beta; APOA4: apolipoproteína A-IV; ITIH2: cadeia pesada inter-alfa-tripsina 2; AGT: angiotensinogênio; SERPINC1: antitrombina; APOA2: apolipoproteína A-II; GSN: gelsolina; KRT6A: queratina; DEF1: defensina alfa; SERPINA3: alfa-1-antiproteínase; DCA: adrenocortical; TF: transferrina; ORM2: orosomucóide 2; C4B: componente 4B do complemento; CFB: fator B do complemento; GC: proteína de ligação da vitamina D.



(legenda na próxima página)

Fig. 3. Análise da rede STRING de (A) imunoglobulinas e outras proteínas identificadas nas úlceras venosas crônicas deste estudo que estão envolvidas no mecanismo de resposta ao estresse oxidativo [esferas vermelhas] e (B) moléculas da resposta inflamatória [esferas azuis] e proteínas cicatrizantes [esferas vermelhas]. (Para interpretação das referências a cores nesta legenda de figura, o leitor deve consultar a versão web deste artigo.)

A presença de bactérias no tecido lesado também pode induzir necrose, apoptose ou morte celular, resultando na liberação de vários componentes, como actina e histona, no meio extracelular. Acredita-se que a actina livre ajude a preservar o equilíbrio entre a atividade antimicrobiana das histonas livres e sua citotoxicidade, inibindo sua degradação por proteases patogênicas [99]. A colonização de úlceras por patógenos não foi clinicamente proeminente neste estudo; no entanto, sua presença pode estar associada à proteína actina pela ação potencialmente lesiva das secreções bacterianas sobre a estrutura, migração celular e resposta imune inata do tecido acometido.

11. Conclusões

O presente trabalho caracterizou o perfil proteômico das UVCs e demonstrou correlações entre proteínas presentes no exsudato inflamatório e variáveis clínicas dos pacientes. Pelas correlações identificadas, a alta cronicidade das lesões pode estar relacionada a comorbidades basais em pacientes idosos e ao aumento de moléculas imunes no microambiente da ferida, bem como de moléculas que representam dano endotelial vascular. Essas proteínas são capazes de ativar e mediar respostas pró-inflamatórias e induzir atividades desreguladas dessa natureza no tecido, que impedem a cicatrização de úlceras.

Poucos estudos descrevem a relação entre o perfil proteômico das UVCs e as variáveis clínicas dos pacientes com essas lesões. Este estudo apresenta pela primeira vez uma descrição inédita na área de úlceras venosas crônicas. Como resultado, este estudo promoveu uma melhor compreensão do papel que as proteínas desempenham no microambiente da lesão, além de evidenciar o sinergismo entre essas moléculas e a alta cronicidade das úlceras venosas.

Aprovação ética e consentimento para participar

Todos os pacientes preencheram um questionário clínico e assinaram um termo de consentimento informado aprovando o uso de seu material biológico para pesquisa acadêmica. Todos os procedimentos realizados neste estudo estavam de acordo com as normas éticas do comitê de pesquisa institucional e/ou nacional. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da instituição responsável, protocolo no. 501.218/2013, em Botucatu, São Paulo, Brasil.

Disponibilidade de dados e materiais

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

Interesses competitivos

Os autores declaram que não têm interesses concorrentes.

Financiamento

Este estudo foi apoiado por bolsa da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), proc. não. 2014/13299-7, e bolsa do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) proc. não. 458919/2014-4.

Contribuições dos autores

N.V.R.C e L.D.S. participou da concepção do estudo, planejamento do estudo, análise dos dados e redação do manuscrito. N.V.R.C, C.C e L.G.P. realizou as análises de dados. L.D.S., R.S-F Jr., B.B., H.A.M e L.P.F.A. coletou os dados e revisou criticamente o manuscrito. Todos os autores leram e aprovaram a versão final do manuscrito.

Agradecimentos

Agradecemos especiais também ao Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), à Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEx) e ao ambulatório de Úlceras Crônicas do Serviço de Dermatologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (Faculdade de Medicina de Botucatu, FMB) por disponibilizar todos os recursos e equipamentos que contribuíram para a realização deste trabalho. Agradecemos ao Laboratório de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Biociências do CNPEM, Campinas, SP, Brasil pelo apoio com a análise de espectrometria de massas.

Apêndice A. Dados suplementares

Dados complementares a este artigo podem ser encontrados online em <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.09.009>.

Referências

- [1] F.H.A. Maffei, C. Magaldi, S.Z. Pinho, Varicose veins and chronic venous insufficiency in Brazil: prevalence among 1755 inhabitants of a country town, *Int J Epidemiol.* 15 (1986) 210–217.
- [2] D. Bergqvist, C. Lindholm, O. Nelzen, Chronic leg ulcers: the impact of venous disease, *J Vasc Surg.* 29 (1999) 752–755.
- [3] E.A. Nelson, S.E. Bell-Syer, Compression for preventing recurrence of venous ulcers, *Cochrane Database Syst Rev.* 9 (2014) CD002303.
- [4] M.A.N. Gatti, L.M. Vieira, B. Barraviera, S.R.C.S. Barraviera, Treatment of venous ulcers with fibrin sealant derived from snake venom, *J. Venomous Anim. Toxins* 17 (2011) 226–229.
- [5] L. Abbade, S.R.C.S. Barraviera, M.R. Silveiras, R.S.F. Junior, M.T.R. Carneiro, N.B. Medolago, B. Barraviera, A new fibrin sealant derived from snake venom candidate to treat chronic venous ulcers, *J. Am. Acad. Dermatol.* 72 (2015) AB271.
- [6] W. Mayer, W. Jochmann, H. Patsch, Ulcus cruris: Abheilung Unter Konservativer Therapie, Eineprospektive Studie. *Wien Med Wochenschr.* 144 (1994) 250–252.
- [7] S.K. Chase, R. Whittemore, N. Crosby, D. Freney, P. Howes, T.J. Phillips, Living with chronic venous ulcers: a descriptive study of knowledge and functional health status, *J Community Health Nurs.* 17 (2000) 1–13.
- [8] I.D. Graham, M.B. Harrison, E.A. Nelson, K. Lorimer, A. Fisher, Prevalence of lower-limb ulceration: a systematic review of prevalence studies, *Adv Skin Wound Care* 16 (2003) 305–316.
- [9] C.V. Ruckley, C.J. Evans, P. Allan, A.J. Lee, F.G. Fowkes, Chronic venous insufficiency: clinical and duplex correlations. The Edinburgh Vein Study of venous disorders in the general population, *J Vasc Surg.* 36 (2002) 520–525.
- [10] M.J. Callam, C.V. Ruckley, D.R. Harper, J.J. Dale, Chronic ulceration of the leg: extent of the problem and provision of care, *Br Med J (Clin Res Ed).* 290 (1985) 1855–1856.
- [11] G.C. Gurtner, S. Werner, Y. Barrandon, M.T. Longaker, Wound repair and regeneration, *Nature.* 453 (2008) 314–321.
- [12] S.L. Drinkwater, A. Smith, K.G. Burnand, What can wound fluids tell us about the venous ulcer environment? *Int J Low Extrem Wounds.* 1 (2002) 184–190.
- [13] N. Buchstein, N. Hoffmann, H. Smola, S. Lang, M. Paulsson, C. Niemann, T. Krieg, S.A. Eming, Alternative proteolytic processing of hepatocyte growth factor during wound repair, *Am J Pathol.* 174 (2009) 2116–2128.
- [14] A.N. Moor, D.J. Vachon, L.J. Gould, Proteolytic activity in wound fluids and tissues derived from chronic venous leg ulcers, *Wound Repair Regen.* 17 (2009) 832–839.
- [15] E.A. Rayment, Z. Upton, G.K. Shooter, Increased matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity observed in chronic wound fluid is related to the clinical severity of the ulcer, *Br J Dermatol.* 158 (2008) 951–961.
- [16] G. Lauer, S. Sollberg, M. Cole, I. Flamme, J. Stürzbecher, K. Mann, T. Krieg, Eming S.A. Expression, Proteolysis of VEGF is increased in chronic wounds, *J Invest Dermatol.* 115 (2000) 12–18.
- [17] L.G. Chuffa, B.A. Fioruci-Fontanelli, L.O. Mendes, F.R. Ferreira Seiva, M. Martinez, W.J. Fávaro, R.F. Domeniconi, P.F. Pinheiro, L. Delazari Dos Santos, F.E. Martinez, Melatonin attenuates the TLR4-mediated inflammatory response through MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways in an in vivo model of ovarian cancer, *BMC Cancer (Online)* 6 (2015) 34–43.

- [18] J.R. dos Santos-Pinto, L.D. dos Santos, H.A. Arcuri, A.R. da Silva Menegasso, P.N. Pêgo, K.S. Santos, F.M. Castro, J.E. Kalil, S.G. De-Simone, M.S. Palma, B-cell linear epitopes mapping of antigen-5 allergen from *Polybia paulista* wasp venom, *J. Allergy Clin. Immunol.* 135 (2014) 264–267.
- [19] L.D. dos Santos, K.S. Santos, J.R. Pinto, N.B. Dias, B.M. de Souza, M.F. dos Santos, J. Perales, G.B. Domont, F.M. Castro, J.E. Kalil, M.S. Palma, Profiling the proteome of the venom from the social wasp *Polybia paulista*: a clue to understand the envenoming mechanism, *J. Proteome Res.* 9 (2010) 3867–3877.
- [20] C.A. Kobayashi, A.L. Leite, T.L. Silva, L.D. Santos, F.C. Nogueira, R.C. Oliveira, M.S. Palma, G.B. Domont, M.A. Buzalaf, Proteomics analysis in kidney in rats chronically exposed to fluoride, *Chem. Biol. Interact.* 180 (2009) 305–311.
- [21] J.T. Wyffels, K.M. Fries, J.S. Randall, D.S. Ha, C.A. Lodwig, M.S. Brogan, M. Shero, L.E. Edsberg, Analysis of pressure ulcer wound fluid using two-dimensional electrophoresis, *Int Wound J.* 7 (4) (2010 Aug) 236–248.
- [22] M.L. Fernandez, J.A. Broadbent, G.K. Shooter, J. Malda, Z. Upton, Development of an enhanced proteomic method to detect prognostic and diagnostic markers of healing in chronic wound fluid, *Br J Dermatol.* 158 (2008) 281–290.
- [23] L.E. Edsberg, J.T. Wyffels, M.S. Brogan, K.M. Fries, Analysis of the proteomic profile of chronic pressure ulcers, *Wound Repair Regen.* 20 (2012) 378–401.
- [24] S.A. Eming, M. Koch, A. Krieger, B. Brachvogel, S. Kreft, L. Bruckner-Tuderman, T. Krieg, J.D. Shannon, J.W. Fox, Differential proteomic analysis distinguishes tissue repair biomarker signatures in wound exudates obtained from normal healing and chronic wounds, *J. Proteome Res.* 9 (2010) 4758–4766.
- [25] H.A. Miot, T.J. Mendaçoli, S.V. Costa, G.R. Haddad, L.P. Abbade, Chronic ulcers of the lower limbs: area evaluation by digital photography, *Rev Assoc Med Bras.* 55 (2009) 145–148.
- [26] M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [27] B. Snel, G. Lehmann, P. Bork, M.A.S.T.R.I.N.G. Huynen, a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene, *Nucleic Acids Res.* 28 (18) (2000 Sep 15) 3442–3444.
- [28] P. Royston, Multiple imputation of missing values, *Stata J.* (2004) 227–241.
- [29] D. Ghosh, Vogt A. Outliers, An evaluation of methodologies, Joint Statistical Meetings. San Diego, CA: American Statistical Association, 2012, pp. 3455–3460.
- [30] S.S. Shapiro, B.W. Martin, J.C. Hwei, A comparative study of various tests for normality, *Journal of the American Statistical Association.* 63 (324) (1968) 1343–1372.
- [31] J.A. Marin, K.Y. Woo, Clinical characteristics of mixed arteriovenous leg ulcers: A descriptive study, *J Wound Ostomy Continence Nurs.* 44 (1) (2017) 41–47, <https://doi.org/10.1097/WON.0000000000000294>.
- [32] L.P. Abbade, S. Lastória, A. Rollo Hdé, Venous ulcer: clinical characteristics and risk factors, *Int J Dermatol.* 50 (4) (2011 Apr) 405–411, <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2010.04654.x>.
- [33] M.F. Scotton, H.A. Miot, L.P. Abbade, Factors that influence healing of chronic venous leg ulcers: a retrospective cohort, *An Bras Dermatol.* 89 (3) (2014 May-Jun) 414–422.
- [34] J.M. de Souza, Ê.C. Vieira, T.M. Cortez, A.L. Mondelli, H.A. Miot, L.P. Abbade, Clinical and microbiologic evaluation of chronic leg ulcers: a cross-sectional study, *Adv Skin Wound Care.* 27 (5) (2014 May) 222–227, <https://doi.org/10.1097/01.ASW.0000445952.83084.a0>.
- [35] R.B. Araújo, M.R. Fortes, L.P. Abbade, H.A. Miot, Translation, cultural adaptation to Brazil and validation of the Venous leg ulcer quality of life questionnaire (VLU-QoL-Br), *Rev Assoc Med Bras* 60 (3) (1992) 249–254.
- [36] G.R. Norman, D.L. Streiner, *Biostatistics: The Bare Essentials*, BC Decker, Hamilton, 2000, p. 2.
- [37] J.C.R. Pereira, Análise de dados qualitativos: estratégias metodológicas para as ciências da saúde humanas e sociais, 3ed, Edusp, 1999, pp. 1–163 v.1.
- [38] M.C. Hout, M.H. Papesh, S.D. Goldinger (Eds.), *Multidimensional scaling*, *WIREs Cognit Sci.* 4 (2013) 93–103.
- [39] S. Bekeschus, J.W. Lackmann, D. Gümbel, M. Napp, A. Schmidt, K.A. Wende, Neutrophil proteomic signature in surgical trauma wounds, *Int J Mol Sci.* 19 (3) (2018 Mar 7) E761, <https://doi.org/10.3390/ijms19030761>.
- [40] F. Sabino, F.E. Egli, S. Savickas, J. Holstein, D. Kaspar, M. Rollmann, J.N. Kizhakkedathu, T. Pohlemann, H. Smola, Auf dem Keller U. Comparative Degradomics of Porcine and Human Wound Exudates Unravels Biomarker Candidates for Assessment of Wound Healing Progression in Trauma Patients, *J Invest Dermatol.* 138 (2) (2018 Feb) 413–422.
- [41] C. Krisp, F. Jacobsen, M.J. McKay, M.P. Molloy, L. Steintraesser, Wolters DA Proteome analysis reveals antiangiogenic environments in chronic wounds of diabetes mellitus type 2 patients, *Proteomics.* 13 (17) (2013 Sep) 2670–2681, <https://doi.org/10.1002/pmic.201200502>.
- [42] D. Taverna, A.C. Pollins, G. Sindona, R.M. Caprioli, L.B. Nanney, Imaging mass spectrometry for assessing cutaneous wound healing: analysis of pressure ulcers, *J Proteome Res.* 14 (2) (2015 Feb 6) 986–996, <https://doi.org/10.1021/pr5010218>.
- [43] R. Zillmer, H. Trøstrup, T. Karlsmark, P. Iversen, M.S. Agren, Duration of wound fluid secretion from chronic venous leg ulcers is critical for interleukin-1α, interleukin-1β, interleukin-8 levels and fibroblast activation, *Arch Dermatol Res.* 303 (2011) 601–606.
- [44] M.W. Löffler, H. Schuster, S. Bühler, S. Beckert, Wound fluid in diabetic foot ulceration: more than just an undefined soup? *Int J Low Extrem Wounds.* 12 (2013) 113–129.
- [45] G. Cazander, G.N. Jukema, P.H. Nibbering, Complement activation and inhibition in wound healing, *Clin Dev Immunol.* 2012 (2012) 534291.
- [46] D.C. Mastellos, D. Ricklin, E. Hajishengallis, G. Hajishengallis, J.D. Lambris, Complement therapeutics in inflammatory diseases: promising drug candidates for C3-targeted intervention, *Mol Oral Microbiol.* 31 (2016) 3–17.
- [47] R. Serra, R. Grande, G. Buffone, V. Molinari, P. Perri, A. Perri, B. Amato, M. Colosimo, S. Franciscis, Extracellular matrix assessment of infected chronic venous leg ulcers: role of metalloproteinases and inflammatory cytokines, *Int Wound J.* 13 (2014) 53–58.
- [48] J.R. Gaughen Jr., T.E. Keats, Soft tissue calcifications in the lower extremities of severely diabetic patients simulating venous stasis or collagen vascular disease, *Emerg Radiol.* 13 (3) (2006) 135–138.
- [49] C. Erfurt-Berge, A.T. Seitz, C. Rehse, U. Wollina, K. Schwede, R. Renner, Update on clinical and laboratory features in necrobiosis lipoidica: a retrospective multicentre study of 52 patients, *Eur J Dermatol.* 22 (2012) 770–775.
- [50] E. Köstler, U. Wollina, Ulcerated necrobiosis lipoidica: a combined treatment approach with dermatosurgery and PUVA, *Int J Low Extrem Wounds.* 2 (2003) 243–245.
- [51] U. Wollina, L. Unger, C. Stelzner, J. Machtetanz, S. Schellong, Leg ulcers, *Internist (Berl).* 54 (11) (2013) 1323–1329.
- [52] S. Yigit, E. Estrada, Recurrent necrobiosis lipoidica diabeticorum associated with venous insufficiency in an adolescent with poorly controlled type 2 diabetes mellitus, *J Pediatr.* 141 (2) (2002) 280–282.
- [53] R. Mani, S. Yarde, M. Edmonds, Prevalence of deep venous incompetence and microvascular abnormalities in patients with diabetes mellitus, *Int J Low Extrem Wounds.* 10 (2) (2011 Jun) 75–79.
- [54] S. Neupane, R.K. Dubey, N. Gautam, K.K. Agrawal, A. Jayan, S. Shrestha, A.C. Jha, Association between serum uric acid, urinary albumin excretion, and glycated hemoglobin in Type 2 diabetic patient, *Front Microbiol.* 7 (2016) 1248.
- [55] A. Varghese, R. Deepa, M. Rema, V. Mohan, Prevalence of microalbuminuria in type 2 diabetes mellitus at a diabetes centre in Southern India, *Postgrad Med J.* 77 (2001) 399–402.
- [56] M. Modan, H. Halkin, A. Karasik, A. Lusky, Elevated serum uric acid – A facet of hyperinsulinaemia, *Diabetologia* 30 (1987) 713–718.
- [57] J.C. King, Zinc: An Essential but Elusive Nutrient, *Am. J. Clin. Nutr.* 94 (suppl) (2011) 679S–684S.
- [58] D. Langemo, J. Anderson, D. Hanson, S. Hunter, P. Thompson, M.E. Posthauer, Nutritional considerations in wound care, *Adv. Skin Wound Care.* 19 (6) (2006) 297–298.
- [59] K.F. Cutting, Wound exudate: composition and functions, *Br J Community Nurs.* 8 (9 Suppl) (2003) 4–9.
- [60] F. Augey, A. Pinet, P. Renaudier, Heart failure and stasis ulcer: A significant association (prospective study of 100 cases), *Ann Dermatol Venereol.* 137 (5) (2010) 353–358.
- [61] A.M. Cordero-Reyes, K.A. Youker, A.R. Trevino, R. Celis, D.J. Hamilton, J.H. Flores-Arredondo, C.M. Orrego, A. Bhimraj, J.D. Estep, G. Torre-Amione, Full expression of cardiomyopathy is partly dependent on B-cells: A pathway that involves cytokine activation, immunoglobulin deposition and activation of apoptosis, *J Am Heart Assoc.* 5 (1) (2016).
- [62] J. Dissemmond, B. Assenheimer, A. Bültemann, V. Gerber, S. Gretener, E. Kohler-von Siebenthal, S. Koller, K. Kröger, P. Kurz, S. Läubli, C. Münter, E.M. Panfil, S. Probst, K. Protz, G. Riepe, R. Strohal, J. Traber, H. Partsch, Compression therapy in patients with venous leg ulcers, *J Dtsch Dermatol Ges.* 14 (11) (2016) 1072–1087.
- [63] A. Harati, N.H. Brockmeyer, P. Altmeyer, A. Kreuter, Skin disorders in association with monoclonal gammopathies, *Eur J Med Res* 10 (2005) 93–104.
- [64] S. Braber, M. Thio, B.R. Blokhuis, P.A. Henricks, P.J. Koelink, T. Groot Kormelink, G.F. Bezemer, H.A. Kerstjens, D.S. Postma, J. Garssen, A.D. Kraneveld, F.A. Redegeld, G. Folkerts, An association between neutrophils and immunoglobulin free light chains in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease, *Am J Respir Crit Care Med.* 185 (8) (2012) 817–824.
- [65] M.J. Callam, D.R. Harper, J.J. Dale, C.V. Ruckley, Chronic ulcer of the leg: clinical history, *Br Med J (Clin Res Ed).* 294 (1987) 1389–1391.
- [66] P.A. Wachholz, P.Y. Masuda, D.C. Nascimento, C.M. Taira, N.G. Cleto, Quality of life profile and correlated factors in chronic leg ulcer patients in the mid-west of São Paulo State, Brazil, *An Bras Dermatol.* 89 (1) (2014) 73–81.
- [67] L. Stătescu, D. Vătă, E. Andrese, L.G. Solovăstru, Chronic venous disease cases at the Iași dermatology clinic, *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* 118 (4) (2014) 1000–1007.
- [68] H. Vlajinac, J. Marinkovic, M. Maksimovic, D. Radak, Factors related to venous ulceration: a cross-sectional study, *Angiology.* 65 (9) (2014) 824–830.
- [69] W. Wu, R. Liu, L. Chen, H. Chen, S. Zhang, Disequilibrium of blood coagulation and fibrinolytic system in patients with coronary artery Ectasia, *Medicine (Baltimore).* 95 (8) (2016) e2779.
- [70] T. Siddiqui, M.K. Zia, S.S. Ali, A.A. Rehman, H. Ahsan, F.H. Khan, Reactive oxygen species and anti-proteinases, *Arch Physiol Biochem.* 122 (1) (2016) 1–7.
- [71] W. Borth, Alpha 2-macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics, *FASEB J.* 6 (15) (1992) 3345–3353.
- [72] B.A. Bhavani, T. Padma, B.K. Sastry, N. Krishna Reddy, Plasma Lipoprotein (a) levels in patients with untreated essential hypertension, *Indian J Hum Genet.* 9 (2) (2003) 65–68.
- [73] C. Borghi, Interactions between hypercholesterolemia and hypertension; implications for therapy, *Curr Opin Nephrol and Hypertens.* 11 (5) (2002) 489–496.
- [74] P. Nayak, S. Panda, P.K. Thatoi, R. Rattan, S. Mohapatra, P.K. Mishra, Evaluation of lipid profile and apolipoproteins in essential hypertensive patients, *J Clin Diagn Res.* 10 (10) (2016 Oct) BC01–BC04.
- [75] Naito H.K. Apolipoproteins, Biochemistry, metabolism and clinical significance developed by lipid and lipoprotein division, *Clin Chem.* 33 (1987) 1051–1052.
- [76] H. Tsuruoka, W. Khovidhunkit, B.E. Brown, J.W. Fluhr, P.M. Elias, K.R. Feingold, Scavenger receptor class B type I is expressed in cultured keratinocytes and epidermis. Regulation in response to changes in cholesterol homeostasis and barrier

- requirements, *J Biol Chem.* 277 (2002) 2916–2922.
- [77] Y. Yano, K. Shimokawa, Y. Okada, A. Noma, Immunolocalization of lipoprotein(a) in wounded tissues, *J Histochem Cytochem.* 45 (4) (1997) 559–568.
- [78] J.S. Kim, H.K. Yu, J.H. Ahn, H.J. Lee, S.W. Hong, K.H. Jung, S.I. Chang, Y.K. Hong, Y.A. Joe, S.M. Byun, S.K. Lee, S.I. Chung, Y. Yoon, Human apolipoprotein(a) kringles V inhibits angiogenesis in vitro and in vivo by interfering with the activation of focal adhesion kinases, *Biochem Biophys Res Commun.* 313 (3) (2004) 534–540.
- [79] S. Van Linthout, M. Frias, N. Singh, B. De Geest, Therapeutic potential of HDL in cardioprotection and tissue repair, *Handb Exp Pharmacol.* 224 (2015) 527–565.
- [80] A. Von Zychlinski, T. Kleffmann, M.J. Williams, S.P. McCormick, Proteomics of Lipoprotein(a) identifies a protein complement associated with response to wounding, *J Proteomics.* 74 (12) (2011) 2881–2891.
- [81] H.Y. Sun, S.F. Chen, M.D. Lai, T.T. Chang, T.L. Chen, P.Y. Li, D.B. Shieh, K.C. Young, Comparative proteomic profiling of plasma very-low-density and low-density lipoproteins, *Clin Chim Acta.* 411 (5–6) (2010) 336–344.
- [82] L. Dumitrescu, K. Glenn, K. Brown-Gentry, C. Shephard, M. Wong, M.J. Rieder, J.D. Smith, D.A. Nickerson, D.C. Crawford, Variation in LPA is associated with Lp(a) levels in three populations from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, *PLoS One.* 6 (1) (2011) e16604.
- [83] S. Tsimikas, P. Clopton, E.S. Brilakis, S.M. Marcovina, A. Khera, E.R. Miller, J.A. de Lemos, J.L. Witztum, Relationship of oxidized phospholipids on apolipoprotein B-100 particles to race/ethnicity, apolipoprotein(a) isoform size, and cardiovascular risk factors: results from the Dallas Heart Study, *Circulation.* 119 (13) (2009) 1711–1719.
- [84] M.J. Sorrentino, C. Vielhauer, J.D. Eisenbart, G.M. Fless, A.M. Scanu, T. Feldman, Plasma lipoprotein (a) protein concentration and coronary artery disease in black patients compared with white patients, *Am J Med.* 93 (1992) 658–662.
- [85] A.R. Sharrett, C.M. Ballantyne, S.A. Coady, G. Heiss, P.D. Sorlie, D. Catellier, W. Patsch, Coronary heart disease prediction from lipoprotein cholesterol levels, triglycerides, lipoprotein(a), apolipoproteins A-I and B, and HDL density subfractions: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, *Circulation.* 104 (2001) 1108–1113.
- [86] P. Libby, P.M. Ridker, G.K. Hansson, Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis, *Nature.* 473 (7347) (2011) 317–325.
- [87] F. Jockenhöfer, V. Chapot, M. Stoffels-Weindorf, A. Körber, J. Klode, J. Buer, B. Küpper, A. Roesch, J. Dissemond, Bacterial spectrum colonizing chronic leg ulcers: a 10-year comparison from a German wound care center, *J Dtsch Dermatol Ges.* 12 (12) (2014 Dec) 1121–1127.
- [88] S. O'Meara, D. Al-Kurdi, Y. Ologun, L.G. Ovington, M. Martyn-St James, R. Richardson, Antibiotics and antiseptics for venous leg ulcers, *Cochrane Database Syst Rev.* 12 (2013 Dec 23) CD003557.
- [89] K. Rahim, S. Saleha, X. Zhu, L. Huo, A. Basit, O.L. Franco, Bacterial Contribution in Chronicity of Wounds, *Microb Ecol.* 73 (3) (2017 Apr) 710–721, <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0867-9>.
- [90] D.J. Pugliese, Infection in venous leg ulcers: Considerations for optimal management in the elderly, *Drugs Aging.* 33 (2) (2016 Feb) 87–96, <https://doi.org/10.1007/s40266-016-0343-8>.
- [91] J. Dissemond, Chronic wounds and bacteria, Clinical relevance, detection and therapy. *Hautarzt.* 65 (1) (2014 Jan) 10–14.
- [92] K. Aktories, Bacterial protein toxins that modify host regulatory GTPases, *Nat Rev Microbiol.* 9 (2011) 487–498.
- [93] E. Lemichez, M. Lecuit, X. Nassif, S. Bourdoulous, Breaking the wall: targeting of the endothelium by pathogenic bacteria, *Nat Rev Microbiol.* 8 (2) (2010) 93–104.
- [94] M.Y. Radeva, J. Waschke, Mind the gap: mechanisms regulating the endothelial barrier, *Acta Physiol (Oxf).* 221 (1) (2018 Jan), <https://doi.org/10.1111/apha.12860> Epub 2017 Mar 22.
- [95] D. Humphreys, V. Singh, V. Koronakis, Inhibition of WAVE regulatory complex activation by a bacterial virulence effector counteracts pathogen phagocytosis, *Cell Rep.* 17 (3) (2016) 697–707.
- [96] V. Miskolci, L. Hodgson, D. Cox, Using fluorescence resonance energy transfer-based biosensors to probe Rho GTPase activation during phagocytosis, *Methods Mol Biol.* 1519 (2017) 125–143.
- [97] K.M. Brothers, N.A. Stella, K.M. Hunt, E.G. Romanowski, X. Liu, J.K. Klarlund, R.M. Shanks, Putting on the brakes: Bacterial impediment of wound healing, *Sci Rep.* 5 (2015) 14003.
- [98] N. Messad, L. Landraud, B. Canivet, G. Lina, J.L. Richard, A. Sotto, J.P. Lavigne, E. Lemichez, Distribution of edin in *Staphylococcus aureus* isolated from diabetic foot ulcers, *Clin Microbiol Infect.* 19 (9) (2013) 875–880.
- [99] A. Sol, Y. Skvirsky, E. Blotnick, G. Bachrach, Muhlrad A. Actin, DNA protect histones from degradation by bacterial proteases but inhibit their antimicrobial activity, *Front Microbiol.* 7 (2016) 1248.