

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA**

FRANCIANE MENDES DE OLIVEIRA

**Caracterização do microbioma em úlcera de perna de pacientes com
Doença Falciforme**

São Paulo

2022

Franciane Mendes de Oliveira

**Caracterização do microbioma em úlcera de perna de pacientes com
Doença Falciforme**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento de Moléstias Infecciosas e
Parasitárias

Orientadora: Professora Doutora Ester
Cerdeira Sabino

São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Mendes-Oliveira, Franciane
Caracterização do microbioma em úlcera de perna
de pacientes com Doença Falciforme / Franciane
Mendes-Oliveira. -- São Paulo, 2022.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientadora: Ester Cerdeira Sabino.

Descritores: 1.Úlcera da perna 2.Anemia
falciforme 3.Microbiota 4.Sequenciamento 5.RNA
ribossômico 16S 6.Staphylococcus

USP/FM/DBD-484/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Nome: Mendes-Oliveira, Franciane

Título: *Caracterização do microbioma em úlcera de perna de pacientes com Doença Falciforme.*

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências; Programa de Pós-graduação do Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Aprovado em XX de abril de 2023.

Banca examinadora

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Prof. Dr.

A Deus, a minha família
e a todos que se fizeram presentes na minha trajetória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por proporcionar-me tanto.

Aos meus pais por todo amor e carinho dedicado a mim, que me orientou nos primeiros passos da minha vida, que me ensinou valores e princípios, os quais levo por onde for. Obrigada por ser parte da família que vocês construíram!

Aos meus irmãos, Fabrício, Francilene e Felipe tenho a imensa felicidade de compartilhar toda a minha vida com eles, deles serem meus primeiros amigos e que permanecerão por toda minha existência.

A minha orientadora, Professora Ester, meu eterno agradecimento por tamanha generosidade, que me acolheu e compartilhou um pouco de sua família comigo. Que me ofereceu a oportunidade e depositou sua confiança para que desenvolvesse o presente trabalho. A ela toda minha admiração e inspiração de como estimular e promover a educação e o conhecimento científico em nosso país para o desenvolvimento de nossa sociedade.

À Dra. Anna Bárbara minha profunda e eterna admiração em como conduzir a vida de forma mais leve, humorada e gentil, em como fazer do limão uma bela limonada. Obrigada, Dra. Anna, por tantos ensinamentos!

Agradeço imensamente a todos os companheiros de trabalho, em especial a Marina, André, Lucas e Roberta que contribuíram com todo seu conhecimento para a construção deste trabalho.

Aos amigos que são meus irmãos de caminhada, que sempre me oferecem todo carinho, suporte, empatia, companhia e acolhimento tornando a jornada mais leve. Obrigada por serem vocês!

Agradeço também a imensa oportunidade de ter começado minha trajetória acadêmica no grupo REDS na Fundação Hemominas, desde a iniciação científica até os primeiros passos da vida profissional. Lá, eu compreendi a importância da pesquisa na saúde pública, conheci e acompanhei as histórias compartilhadas pelos pacientes e doadores, conheci a minha primeira mentora (Dra. Anna), conheci pesquisadores fantásticos e ganhei amigas que com certeza serão para minha vida toda.

Aos colegas e amigos do laboratório LIM46 que me receberam com tanto carinho em uma breve estadia em 2019, foram fundamentais para eu escolher São Paulo como

minha segunda casa. Obrigada a todos vocês pelos aprendizados de excelência e pelos inúmeros momentos de diversão!

Meus agradecimentos também à Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelos fomentos adquiridos.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editor* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Agência USP de Gestão da Informação Acadêmica. Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: parte I (ABNT) / Agência USP de Gestão de Informação Acadêmica; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, coordenadora; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro. [et al]. – 4a Ed. – São Paulo: AGUIA, 2020.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

RESUMO

Mendes-Oliveira, F. *Caracterização do microbioma em úlcera de perna de pacientes com Doença Falciforme* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

INTRODUÇÃO: A Doença Falciforme (DF) é uma doença hematológica hereditária monogênica caracterizada pela produção anormal de hemoglobinas, sendo a mais comum a hemoglobina S (HbS), que se polimeriza sob condições de desoxigenação, deformando as hemácias, que assumem forma de foices e apresentam deficiência no transporte de oxigênio e gás carbônico. Essa deficiência leva a inúmeras complicações, inclusive úlceras de pernas. A microbiota humana é a soma de todos os micro-organismos que residem nos tecidos, composto principalmente por bactérias. Cada local anatômico (pele, boca, intestino, mucosas) possui sua microbiota específica e seu desequilíbrio pode estar associado à doenças crônicas. A microbiota das úlceras de perna na DF ainda é pouco conhecida. O presente trabalho teve por objetivo identificar e caracterizar a microbiota presente em úlceras de perna de pacientes portadores de DF em um hemocentro público de grande porte (Fundação Hemominas), localizado na Região Sudeste do Brasil.

MÉTODOS: Trata-se de um estudo transversal que incluiu 30 pacientes com DF e úlcera ativa durante a coleta, 60 pacientes com DF sem histórico de úlcera de perna, ambos os grupos de genótipo SS da DF, e 30 participantes sem história de doenças crônicas. Todos os participantes foram entrevistados, as amostras e as características clínicas coletadas, após consentimento. Caracterizamos os táxons constituintes da microbiota dos participantes pelo sequenciamento do gene 16S rRNA e as sequências geradas foram analisadas através das ASVs (*amplicon sequence variants*), verificando a cobertura e profundidade necessárias para identificação e classificação de comunidades bacterianas. Foi avaliada a associação da diversidade alfa e beta da microbiota com a úlcera de perna. Os dados clínico/epidemiológicos, sociodemográficos e hábitos da população de pacientes com DF foram analisados para verificar sua associação com a presença da úlcera de perna na DF.

RESULTADOS: As diversidades alfa e beta nas úlceras de perna em pacientes com DF foram menores comparadas aos grupos de pele íntegra. Os filos Firmicutes (51%) e Proteobacteria (41%) predominaram nas úlceras, embora sem diferenças estatísticas. O gênero *Staphylococcus* também predominou nas úlceras de perna com diferença estatística significativa quando comparada à pele íntegra adjacente (16,4% versus 6,8%, respectivamente; $p = 0,02$). No entanto, não houve diferenças

estatísticas da presença do *Staphylococcus* nas úlceras quando comparado aos grupos controles. O gênero bacteriano de maior abundância na pele íntegra adjacente às úlceras e na pele do grupo controle com DF no geral foi *Ralstonia* ssp. (11,0% e 13,6%, respectivamente). *Corynebacterium* ssp. foi maior na pele íntegra adjacente (13,1% versus 0,2%; $p = 0,003$); dentre os controles as abundâncias foram similares (7,9%, 7,4% e 0,3%; $p < 0,001$). Houve menor abundância deste gênero nas úlceras. **CONCLUSÃO:** Nossos resultados evidenciaram menor diversidade significativa alfa e beta nas úlceras de perna da DF, maior abundância dos filos Firmicutes e Proteobacteria e maior abundância de *Staphylococcus* ssp. nas úlceras em relação à pele adjacente, sugerindo relação de espécies desse gênero com as úlceras de perna da DF.

Descritores: Úlcera de perna. Doença falciforme. Microbiota. Sequenciamento. RNA ribossômico 16S. *Staphylococcus*.

ABSTRACT

Mendes-Oliveira, F. *Characterization of the microbiome in leg ulcer of patients with sickle cell disease* [dissertation]. São Paulo: Faculty de Medicina, University of São Paulo; 2022.

INTRODUCTION: Sickle Cell Disease (SCD) is a monogenic hereditary hematological disease characterized by the abnormal production of hemoglobin, the most common being hemoglobin S (HbS), which polymerizes under deoxygenation conditions, deforming the red blood cells, which assume the shape of sickles and are deficient in the transport of oxygen and carbon dioxide. This deficiency leads to many complications, including leg ulcers. The human microbiota is the sum of all microorganisms residing in tissues, composed mainly of bacteria. Each anatomical site (skin, mouth, intestine, mucous membranes) has its specific microbiota and its imbalance can be associated with chronic diseases. The microbiota of leg ulcers in SCD is still poorly understood. The present study aimed to identify and characterize the microbiota present in leg ulcers of patients with SCD in a large public blood center (Fundação Hemominas), located in the Southeast Region of Brazil. **METHODS:** The present is a cross-sectional study that included 30 patients with SCD and active ulcer during collection, 60 SCD patients with no history of leg ulcer, both SS SCD genotype groups, and 30 participants with no history of chronic diseases. All participants were interviewed, samples collected and clinical characteristics collected, after consent. We characterized the constituent taxa of the participants' microbiota by sequencing the 16S rRNA gene and the sequences generated were analyzed using ASVs (amplicon sequence variants), verifying the coverage and depth necessary for the identification and classification of bacterial communities. The association of alpha and beta diversity of the microbiota with leg ulcers were evaluated. Clinical/epidemiological, sociodemographic and habits data of the SCD patient population were analyzed to verify their association with the presence of leg ulcers in SCD. **RESULTS:** The alpha and beta diversities in leg ulcers in patients with SCD were lower compared to the intact skin groups. The phyla Firmicutes (51%) and Proteobacteria (41%) predominated in ulcers, although without statistical differences. The *Staphylococcus* genus also predominated in leg ulcers, with a statistically significant difference when compared to adjacent intact skin (16.4% versus 6.8%, respectively; $p = 0.02$). However, there were no statistical differences in the presence of *Staphylococcus* in ulcers when compared to the control groups. The most abundant bacterial genus in the

intact skin adjacent to the ulcers and in the skin of controls with SCD in general was *Ralstonia* ssp. (11.0% and 13.6%, respectively). *Corynebacterium* ssp. was higher in adjacent intact skin (13.1% versus 0.2%; $p = 0.003$); among the controls, the abundances were similar (7.9%, 7.4% and 0.3%; $p < 0.001$). There was less abundance of this genus in ulcers. **CONCLUSION:** Our results showed significant lower alpha and beta diversity in SCD leg ulcers, higher abundance of Firmicutes and Proteobacteria phyla, and higher abundance of *Staphylococcus* ssp. in ulcers when compared to the adjacent skin, suggesting a relationship between species of this genus and SCD leg ulcers.

Descriptors: Leg ulcer. Sickle Cell Disease. Microbiota. Sequencing. 16S ribosomal RNA. *Staphylococcus*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características sociodemográfica e hábitos de higiene dos pacientes com DF com UP e sem o histórico de úlcera.	31
Tabela 2. Hábitos de vida dos pacientes com DF com UP e sem o histórico de úlcera. 32	
Tabela 3. Características e aspectos clínicos das úlceras de perna em pacientes com DF.	34
Tabela 4. Tipos de cuidados e tratamentos para UP nos últimos 15 dias dos pacientes com DF.	35
Tabela 5. História clínica dos pacientes com DF com e sem histórico de UP.	36
Tabela 6. Comparações da diversidade alfa entre os quatro grupos avaliados (G1-G4).38	
Tabela 7. Comparações da diversidade beta entre os quatro grupos avaliados (G1-G4).	38
Tabela 8. Comparação das abundâncias dos táxons à nível taxonômico de filo entre úlcera e pele íntegra (G1 e G2) dos pacientes com UP ativa.	41
Tabela 9. Comparação das abundâncias dos táxons à nível taxonômico de filo entre úlcera (G1) e pele íntegra dos pacientes DF sem histórico de úlceras de perna e voluntários sem doenças crônicas (G3 e G4).	42
Tabela 10. Comparação de quinze táxons à nível taxonômico de gênero com maior abundância nas úlceras e nas peles íntegras dos pacientes com UP ativa (G1 e G2).	44
Tabela 11. Comparação de quinze táxons à nível taxonômico de gênero com maior abundância nas úlceras (G1) e nas peles íntegras dos pacientes DF sem histórico de úlceras de perna e dos voluntários sem doenças crônicas (G3 e G4).	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma dos procedimentos do recrutamento e coleta do material biológico e dos dados do prontuário.....	25
Figura 2. Curva de rarefação das sequências ASVs observadas por diversidade alfa para os quatro grupos avaliados (G1-G4).....	37
Figura 3. Índices da diversidade alfa: Chao 1 ($p < 0,001$), ASVs Observadas ($p < 0,001$), Shannon ($p < 0,001$) e Simpson ($p < 0,001$) para os quatro grupos (G1-G4).	39
Figura 4. Índices da diversidade beta por Análise de Coordenadas Principais (PCoA): A) Bray-Curtis ($p = 0,001$), B) Jaccard ($p = 0,001$) e C) Unifrac ponderada ($p = 0,001$) e D) não ponderada ($p = 0,001$) para os grupos (G1-G4).	39
Figura 5. Frequência relativa da abundância por amostra entre os grupos (G1-G4). Gráfico de histograma para demonstrar a distribuição da classificação taxonômica à nível de filo.	40
Figura 6. Boxplot dos quinze gêneros mais abundantes entre as úlceras e peles íntegras dos pacientes DF com UP ativa (G1 e G2).....	45
Figura 7. Boxplot dos quinze gêneros mais abundantes entre as úlceras (G1) e peles íntegras dos pacientes DF sem histórico de UP (G3) e dos voluntários sem doenças crônicas (G4).	46

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	A doença falciforme.....	16
1.2	Úlcera de perna	17
1.3	Microbioma de pele e feridas.....	18
2	JUSTIFICATIVA.....	21
3	OBJETIVOS.....	22
3.1	Objetivo Geral.....	22
3.2	Objetivos Específicos	22
4	MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1	Populações de estudo	23
4.2	Entrevistas e coleta de material	23
4.2.1	Entrevistas	23
4.2.2	Coleta de amostras biológicas	24
4.2.3	Fluxo de procedimentos	25
4.2.4	Confidencialidade.....	25
4.3	Aspectos éticos do estudo	25
4.4	Caracterização da microbiota.....	26
4.4.1	Processamento da amostra.....	26
4.4.2	Amplificação de sequências-alvo.....	26
4.4.3	Precipitação de DNA.....	26
4.4.4	Purificação e quantificação	27
4.4.5	Preparo do pool equimolar das bibliotecas amplificados.....	28
4.4.6	Montagem da biblioteca e sequenciamento	28
4.5	Análise estatística	28
4.6	Análise do microbioma	29
5	RESULTADOS	31
5.1	Caracterização da população	31
5.2	Composição da microbiota da úlcera e pele	37
6	DISCUSSÃO.....	48

7	REFERÊNCIAS	55
8	APÊNDICE A – FORMULÁRIOS I AO IV	60
9	APÊNDICE B – FORMULÁRIO V	79
10	ANEXO A – BIORREPOSITÓRIO	81
11	ANEXO B – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA....	86
12	ANEXO C – ANÁLISE POR ANCOM	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 A doença falciforme

A doença falciforme (DF) é uma hemoglobinopatia hereditária e o primeiro relato de caso da DF na literatura foi documentado por Herrick e Iron em 1910, que identificou hemácias alongadas - *sickle-shaped* - presentes através de esfregaço de sangue de paciente com quadro clínico de ferida no tornozelo, leucócitos aumentados e crise respiratória (1). Mais tarde, um estudo corroborou com este achado, evidenciando em um experimento *in vitro* transição de eritrócitos esféricos para a forma de foice em amostras de sangue de paciente com úlcera de membros inferiores, sugerindo que condições fisiológicas anormais poderiam estar relacionadas a este fenômeno (2).

Outros relatos semelhantes de pacientes com a DF foram surgindo de forma crescente desde a sua descoberta. No final da década de 40, Paulling e colaboradores descreveram a DF como a primeira doença molecular da literatura (3), ganhando destaque na comunidade médica por sua importância clínica e marcando o início da era de estudos de doenças moleculares (4). Nesse estudo, as diferenças na mobilidade entre as hemoglobinas normal e falciforme (S) foram observadas, com a hemoglobina S sendo mais positiva nos estados oxigenado e desoxigenado comparado à hemoglobina normal, postulando a hipótese de diferenças nessas proteínas, podendo ser atribuídas a um processo de evolução dos mamíferos (3).

Nesse mesmo sentido, outro experimento demonstrou que a hemoglobina S apresentava menor solubilidade em relação à hemoglobina normal e seu formato de foice estava relacionado às condições de redução do oxigênio, todavia, podendo ser um estado reversível (5). Posteriormente, novos experimentos mostraram que a beta globina das hemoglobinas - S e normal - eram idênticas em tamanho, porém, análises mais detalhadas revelaram a ocorrência de uma substituição dos aminoácidos entre as globinas, sendo encontrado ácido glutâmico (Glu) na hemoglobina normal e valina (Val) na hemoglobina S (6, 7). Entretanto, em meados da década de 60, a lacuna da diferença na solubilidade entre as hemoglobinas (S e normal) foi parcialmente compreendida com a demonstração da posição da Val, que localizada mais à superfície da cadeia estrutural da globina S em relação ao Glu na globina normal, confere a esta maior carga positiva isoelétrica como vista em estudos anteriores (5, 7, 8)

Deste modo, a conformação da hemoglobina S contribui para o seu processo de polimerização, devido a presença de uma fibra alongada e pontiaguda constituída por 6 filamentos de hemoglobina S aderidos e dispostos de forma helicoidal em eritrócitos deformados do sangue de pessoas com DF(8, 9). No entanto, a proporção dos eritrócitos polimerizados varia de pessoa para pessoa, conforme a fatores genéticos e condições do ambiente ao longo do tempo (9).

Atualmente, sabe-se que a doença falciforme (DF) é uma desordem genética hereditária que compreende as doenças originárias da mutação de ponto no gene rs334, que codifica a subunidade beta (β^s) da hemoglobina (HBB) (10, 11). A hemoglobina S herdada por ambos os pais pode caracterizar em homozigose do gene S (HbSS) - denominada anemia falciforme (AF) – e, quando a herança genética do gene S por um dos pais for associada a outra variante da DF também herdada podem ocorrer as heterozigoses do gene: S/ β Talassemia (Hb S/ β Tal), Hb SC, Hb SD entre outras (11, 12). A hemoglobina S polimerizada resulta em inúmeros prejuízos ao organismo e o aparecimento subsequente de diversas complicações secundárias frequentes na DF, estando entre elas a úlcera de perna (UP) (10, 13).

1.2 Úlcera de perna

A UP em portador da DF foi observada pela primeira vez em 1904 (1). As úlceras de perna são caracterizadas por danos no tecido epidérmico e na DF, elas podem estar associadas a diversos fatores: exógenos e endógenos, como traumas na pele, picadas de insetos, localização geográfica, avanço da idade, maior taxa de hemólise, infecção, incompetência venosa e fenótipos de gravidade da DF (13-16).

A classificação das úlceras pode ser dos tipos aguda ou crônica, sendo determinadas pelo seu tempo de duração. Geralmente, uma úlcera aguda tem um tempo previsível podendo levar cerca de um mês para a sua cicatrização, enquanto, as úlceras de perna crônicas apresentam um tempo mais longo, entre seis meses até anos para cicatrização (13). As úlceras quando associadas a algumas manifestações clínicas, como é o caso da osteomielite na DF, podem apresentar seu estado agravado, principalmente nos casos de feridas profundas (13, 17).

A fisiopatologia da UP na DF ainda é pouco compreendida. Alguns biomarcadores, como metabólitos (nitrito e nitrato) da via do óxido nítrico e a presença de marcadores de inflamação (IL-8 e IL-10), além de pró-inflamação (IL-15) foram

relacionados com a presença de UP em adultos com DF (18). Os processos inflamatórios no local da úlcera, geralmente, podem causar dor e até levar ao comprometimento das atividades cotidianas dos pacientes, além de gerar impacto nos relacionamentos sociais, atividades laborais e levar a quadros de depressão (13, 14, 19, 20).

A UP em pacientes com genótipo SS é comum e os indicadores variam, sendo 8-10% encontrado na América do Norte, enquanto taxa maior, 50%, foi registrada em pacientes jamaicanos e para os residentes em regiões tropicais (13, 14, 21). Estudos epidemiológicos relatam que a condição socioeconômica precária tem impacto importante na frequência de UP (22). É mais comum no sexo masculino, pode surgir a partir dos 10 anos de idade, mas tem incidência aumentada com a idade e, raramente, as úlceras de perna levam a morte (13, 22). Menores frequências de UP foram encontradas em pacientes com variantes do gene S (SC e S β -talassemia) e níveis de hemoglobina total e fetal aumentados (Hb F) (13, 14).

Infecções por alguns agentes virais foram associadas à presença de UP na DF, como o vírus Linfotrópico de células T humanas I (HTLV-I), vírus da Hepatite C (HCV) e Hepatite B (HBV) (23). Além disso, infecção sistêmica e até sepse podem ocorrer por agentes colonizadores das úlceras de perna na DF, no entanto, estes eventos são muito raros (13).

1.3 Microbioma de pele e feridas

A pele humana é uma ampla barreira física cornificada e sob sua superfície são encontradas moléculas orgânicas e inorgânicas secretados por folículos pilosos e glândulas do tecido epidérmico que realizam a manutenção fisiológica do corpo (24). Conjunto a isso, diversos micro-organismos constituem a microbiota da pele desempenha uma interação equilibrada com seu hospedeiro a partir da modulação do sistema imunológico contra patógenos e doenças inflamatórias, além de processamento de metabólitos, contribuindo para sua saúde (25).

A colonização inicial da pele por micro-organismos ocorre durante o nascimento do bebê que ao passar pelo canal vaginal materno adquire espécies comuns desta cavidade, como *Lactobacillus* spp., *Prevotella* spp., *Sneathia* spp. (26, 27). Em nascimentos por parto cesárea, as espécies colonizadoras da pele do recém-nascido serão as presentes na microbiota da pele da mãe, como *Propionibacterium* spp., *Corynebacterium* spp. e *Staphylococcus* spp. dentre outras (26, 27).

A dinâmica das espécies da microbiota na pele se estabelece de acordo com a fisiologia dos microambientes. Espécies de bactérias como *Propionibacterium acnes*, *Corynebacterium tuberculostearicum* e *Streptococcus mitis* são abundantes em regiões mais secas da pele, enquanto *Corynebacterium tuberculostearicum*, *Staphylococcus hominis* e *Propionibacterium acnes* predominam regiões úmidas da pele (28). Nos microambientes da pele ricos em lipídios encontram-se as espécies como *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* e *Corynebacterium tuberculostearicum* e na região dos pés as espécies *Corynebacterium tuberculostearicum*, *Staphylococcus hominis* e *Staphylococcus warneri* (28).

A estabilidade da microbiota de pele pode durar por anos, no entanto, alguns fatores podem desestabilizar essa constituição microbiana, como é o exemplo dos fagos capazes de modularem a abundância de espécies bacterianas (29-32). Porém, o conhecimento da dinâmica dos fagos na microbiota da pele ainda se encontra limitado, devido a sua baixa abundância (31). Tal perturbação da composição da microbiota ou injúrias ocorridas à pele leva ao aparecimento de diversas doenças de pele ou até mesmo doenças sistêmicas (28).

A úlcera de pé de diabético é uma ferida crônica que tem sido muito estudada quanto a sua diversidade microbiana baseada por métodos moleculares (33, 34). A composição microbiana da pele íntegra de indivíduos diabéticos difere dos indivíduos saudáveis para táxons menos abundantes, e na úlcera de pé de diabéticos o *Staphylococcus* spp. é o agente patogênico aeróbio com maior predominância (35).

Em indivíduos com UP na DF, a pele íntegra possui maior diversidade bacteriana e a abundância de aeróbios na pele diminui conforme se aproxima da ferida que possui maior abundância dos táxons anaeróbios facultativos (*Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Bacillus* e *Streptococcaceae*) e anaeróbios obrigatórios (*Finegoldia*, *Propionibacterium*, *Porphyromonas* e *Anaerococcus*), incluindo o anaeróbio facultativo *Staphylococcus* spp. sendo predominante na UP similar ao encontrado na úlcera de pé de diabético (36).

A relação dos fatores microbiológicos e a UP na DF não está totalmente compreendida. Portanto, a diversidade de comunidades bacterianas da úlcera e pele de pacientes com DF precisa ser bem investigada para entender seu papel no desfecho da UP. Além disso, estudos nessa área podem contribuir para o desenvolvimento de ferramentas moleculares visando o aprimoramento e padronização de novos protocolos e

métodos de amostragem. O presente trabalho buscou identificar e caracterizar a microbiota presente em úlceras de perna em pacientes portadores de Doença Falciforme tratados em um hemocentro público na região sudeste do Brasil, bem como compreender as variáveis epidemiológicas e clínicas associadas à presença de úlceras de pernas nos pacientes estudados.

2 JUSTIFICATIVA

A UP é uma manifestação clínica relativamente comum em pacientes com DF, geralmente dolorosa e incapacitante na maioria dos casos, podendo limitar a vida psicossocial desses pacientes e até gerar um impacto negativo em sua qualidade de vida. A incidência dos casos de UP nos pacientes com DF varia muito de acordo com as diferentes regiões geográficas.

Sabe-se que a presença de determinados micro-organismos nas úlceras de perna está implicada na persistência ou piora da ferida. Estudos da microbiota de UP em pacientes com DF ainda são escassos. Portanto, espera-se que o conhecimento sobre o microbioma da pele e da UP, bem como a dinâmica de composição desses micro-organismos forneça subsídio para a elaboração de estratégias de prevenção, diagnósticos e tratamento da UP nos pacientes com DF. Portanto, este estudo poderá dar subsídios para um melhor entendimento quanto aos agentes colonizadores comensais e patogênicos presentes nas úlceras de pacientes com DF e suas interações.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Identificar e caracterizar a microbiota presente em úlceras de perna em pacientes portadores de Doença Falciforme do Hemocentro de Belo Horizonte, Fundação HEMOMINAS.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar os fatores epidemiológicos, socioeconômicos e clínicos associados à presença de úlcera de perna em pacientes com Doença Falciforme;
- Comparar a microbiota presente na úlcera de perna com a microbiota presente na pele normal da outra perna do paciente com Doença Falciforme;
- Comparar a microbiota presente na úlcera de perna dos pacientes com Doença Falciforme com a microbiota presente na pele intacta daqueles pacientes que nunca tiveram histórico de úlcera de perna e do grupo controle sem a Doença Falciforme;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Populações de estudo

Este é um estudo transversal que propôs comparar a microbiota da UP da DF e pele íntegra dos grupos selecionados. Foram incluídos neste estudo 30 pacientes com DF que apresentaram UP ativa no período de coleta dos dados, 60 pacientes com DF que nunca tiveram histórico de UP e 30 participantes sem história de doenças crônicas. A idade mínima para inclusão dos casos no estudo foi a partir de 10 anos.

Os pacientes com DF e UP ativa foram encaminhados para a equipe de pesquisa através dos médicos que os acompanhavam, em seguida eles foram convidados e incluídos após o aceite para participação no estudo. Os controles com DF foram selecionados dentre os pacientes que compareceram ao ambulatório para consulta de rotina. Os controles sem história de doenças crônicas foram abordados no ambulatório do Hemocentro de Belo Horizonte (HBH) da Fundação Hemominas. As pessoas próximas aos pacientes puderam participar para compor o grupo controle sem história de doenças crônicas, exceto familiares e pessoas que residiam junto ao paciente. Também puderam participar funcionários do HBH, exceto os pertencentes à área técnica. Todos os controles do estudo foram convidados após a inclusão dos casos e pareados aos casos por sexo e idade.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para participação no estudo foi apresentado aos participantes e após a leitura, o TCLE foi assinado por aqueles que concordaram com a participação. No caso do participante menor de 18 anos, o TCLE foi assinado pelo responsável junto a um termo de Assentimento que também foi assinado pela criança ou adolescente. Todos os participantes do estudo receberam um número de identificação para manter a confidencialidade das informações, a fim de garantir o sigilo dos dados dos pacientes.

4.2 Entrevistas e coleta de material

4.2.1 Entrevistas

Todos os participantes da pesquisa foram entrevistados e seus dados de prontuário médico registrados, exceto os controles sem história de doenças crônicas, que tiveram seus dados coletados a partir do Formulário V (Apêndice B). Durante a entrevista foram

preenchidos quatro formulários: Formulário I - dados sócio-demográficos (aplicado aos 3 grupos participantes) (Apêndice A); Formulário II (apenas para os casos) - informações clínicas do paciente para aqueles com histórico de UP (Apêndice A); Formulário III (apenas para os casos) - características clínicas da lesão e registro de imagem da UP por fotografia (Apêndice A); Formulário V (apenas para os controles sem história de doenças crônicas) - informações gerais do participante.

Além das entrevistas, outros dados foram coletados para compor o Formulário IV (Apêndice A), a partir do prontuário médico de todos os participantes da pesquisa, com exceção do grupo de controles sem história de doenças crônicas. A entrevista com os participantes do estudo foi conduzida pelo pesquisador, em local privado para garantir o sigilo das informações fornecidas pelo paciente. Os pacientes com idade menor de 16 anos foram acompanhados pelo responsável durante a entrevista.

4.2.2 Coleta de amostras biológicas

As amostras biológicas e as características clínicas das úlceras foram coletadas e registradas. Após a entrevista, as amostras da pele intacta dos casos e dos controles foram coletadas a partir da fricção de uma área delimitada (4x4 cm²) com *swab* estéril imerso em solução SCF-1, conforme descrito no Projeto de Microbioma Humano (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gap/cgi-bin/document.cgi?study_id=phs000228.v3.p1&phd=2235#app11). A amostra da UP foi coletada com *swab* estéril imerso em solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% por toda a extensão da ferida, cuidadosamente. Nos casos de pacientes que tinha mais de uma úlcera, adotamos o critério de coletar a úlcera mais antiga (UP1), embora, as informações de todas as úlceras (UP1 e/ou UP2) tivessem sido registradas no formulário III. Em seguida, um curativo foi oferecido ao paciente, a úlcera foi lavada com solução fisiológica pré-aquecida e o curativo finalizado conforme o procedimento individual de cada paciente. Todos os materiais biológicos coletados foram devidamente identificados por etiquetas, e em seguida, encaminhadas ao Laboratório de Pesquisa da Fundação Hemominas onde foram armazenadas em freezer a -80 °C, onde permaneceram estocadas até o seu processamento.

4.2.3 Fluxo de procedimentos

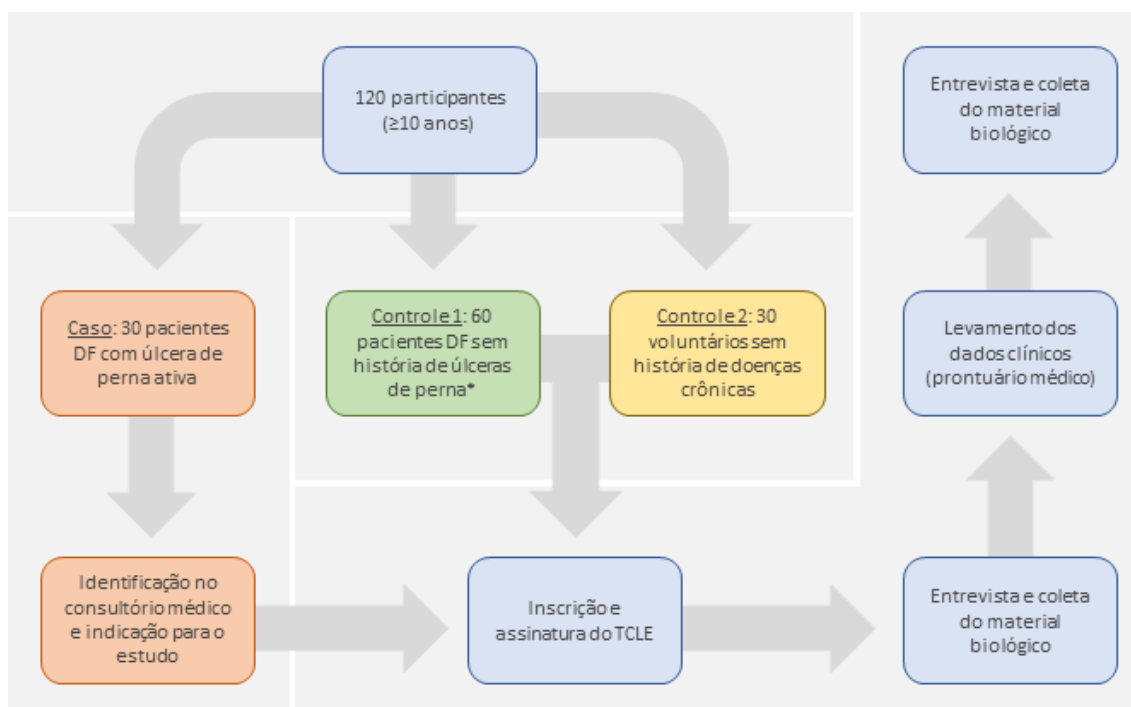


Figura 1. Fluxograma dos procedimentos do recrutamento e coleta do material biológico e dos dados do prontuário.

*Exclusão de três pacientes que não tiveram o diagnóstico confirmatório para o genótipo SS.

4.2.4 Confidencialidade

Os questionários respondidos e os registros de fotografia foram mantidos arquivados na sala de Pesquisa REDS, da Fundação Hemominas sob guarda e acesso exclusivo apenas dos membros da equipe, durante a pesquisa e após o seu encerramento, até o prazo de 5 anos. As amostras coletadas ficarão no Biorrepositório, sob guarda das instituições envolvidas, conforme mencionado e de acordo com o Termo de Constituição de Biorrepositório e Regimento Institucional de Biorrepositório (Anexo A).

4.3 Aspectos éticos do estudo

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas sob CAAE 51185415.0.0000.5118, sendo aprovado na data de 14 de março de 2016. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B) elaborado para este estudo obedece às recomendações do Conselho Nacional da Saúde conforme a Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012.

4.4 Caracterização da microbiota

4.4.1 Processamento da amostra

O *swab* das amostras da pele íntegra e da UP dos participantes foram processados e o material genético extraído no Laboratório de Pesquisa da Fundação Hemominas.

O DNA bacteriano foi extraído utilizando o kit *FastDNATM Spin* (MP Biomedicals, LLC, Irvine, CA, USA), conforme as instruções do fabricante. Após a extração, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Investigações Médicas (LIM-46) do Instituto de Medicina Tropical (IMT), da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) para continuação do processo e sequenciamento do 16S RNA bacteriano.

4.4.2 Amplificação de sequências-alvo

A amplificação do DNA bacteriano a partir das amostras foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os seguintes reagentes: 1 µL da solução de estoque dos oligonucleotídeos iniciadores a 10 µM, sendo 0,5 µL F515 (5' – CACGGTCGKCGGCCATT – 3') e 0,5 µL R806 (5' – GGACTACHVGGGTWTCTAAT – 3') para o domínio V4 do segmento 16S ribossômico; 12,5 µL *Q5 High-Fidelity 2X Master Mix* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA); 3,5 µL de água estéril e; 8 µL da amostra >5 ng de DNA genômico de alta qualidade.

A reação foi incubada inicialmente a 98°C por 30 segundos para início da desnaturação do DNA, seguida de 35 ciclos a 98°C por 10 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, e sendo finalizada com a extensão da fita de DNA à condição de 72°C por 2 minutos e mantida a 4°C. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose na concentração de 2% para confirmação da presença do fragmento alvo, 16S RNA ribossômico bacteriano.

4.4.3 Precipitação de DNA

As amostras que não apresentaram confirmação de amplificação através de bandas por eletroforese foram submetidas ao procedimento de concentração de DNA. Foram

adicionados às amostras o dobro do seu volume de álcool absoluto (100%), homogenizadas e incubadas *overnight* a -20°C por no mínimo 12 horas.

Após, as amostras foram centrifugadas a rotação de 14.000 g por 30 minutos a temperatura de 4°C . O sobrenadante foi removido, deixando aproximadamente 15 μL da solução no tubo e adicionado 500 μL de álcool concentrado a 70%, seguido de agitação e centrifugação a 14.000 g por 15 minutos a 4°C . Os tubos foram colocados no concentrador à vácuo *Speed Vac (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA)* para evaporação completa do álcool e o DNA foi ressuscitado por 15 μL do tampão TE, Tris-HCl a 10 mM – pH 8,0; EDTA a 0,1 mM (*Thermo Fisher Scientific*).

Essas amostras foram submetidas novamente à amplificação por PCR, como descrito anteriormente, e confirmadas em gel. Ao todo, 84 amostras positivas seguiram para a etapa de purificação da biblioteca.

4.4.4 Purificação e quantificação

As bibliotecas foram purificadas utilizando 15 μL do reagente *Agencourt® AMPure® XP Reagent (Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, Indiana, United States)* que foi adicionado ao tubo A, 25 μL do produto da amplificação por PCR e incubados por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os tubos foram incubados na estante magnética *DynaMag™-2 magnet (Thermo Fisher Scientific)* por 2 minutos ou até que a solução estivesse completamente límpida. O sobrenadante foi coletado por completo cuidadosamente, sem perturbar o disco das esferas eletromagnéticas, e transferido para o tubo B que já continha os 30 μL do reagente *Agencourt® AMPure® XP Reagent (Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, Indiana, United States)*. Após agitação vagarosa, os tubos B foram incubados à temperatura ambiente por mais 5 minutos e incubados por mais 2 minutos na estante magnética. Desta vez, o sobrenadante foi retirado e desprezado preservando o disco no tubo e adicionado 300 μL de álcool a 70% de concentração para lavagem. Os tubos foram incubados por 30 segundos, sendo girados a rotação de 180° , incubados por mais 30 segundos e girados novamente. O sobrenadante foi desprezado e a etapa de lavagem foi repetida por mais uma vez. Após a lavagem, os tubos foram centrifugados rapidamente e colocados na estante magnética para secagem do disco de esferas eletromagnéticas contendo os fragmentos da biblioteca. Os tubos foram removidos da estante e adicionado 20 μL do tampão TE, Tris-HCl a 10 mM – pH 8,0; EDTA a 0,1 mM (*Thermo Fisher Scientific*), sobre os discos de esferas.

Os tubos foram agitados por 10 segundos, centrifugados rapidamente e incubados na estante magnética por mais 2 minutos. Cuidadosamente, sem perturbar do disco, o sobrenadante contendo a biblioteca foi coletado e transferido para tubo *Eppendorf Lo Bind*.

A quantificação de DNA para cada tubo (A e B) foi determinada no fluorímetro *Qubit® 2.0 (Invitrogen™)* utilizando *Qubit® dsDNA HS Assay kit*, conforme orientações do fabricante.

4.4.5 Preparo do pool equimolar das bibliotecas amplificadas

As amostras foram agrupadas em quantidades equimolares a fim de permitir total cobertura das sequências-alvo. Cada amostra foi quantificada no equipamento *Qubit®* através do *kit Qubit® dsDNA HS Assay* para determinar a concentração molar (nmol/L) de cada biblioteca. Todas as amostras tiveram suas concentrações equimolares utilizando a maior concentração possível e misturadas em um tubo contendo volumes iguais de cada amostra, para um volume total de no mínimo 25 µL.

4.4.6 Montagem da biblioteca e sequenciamento

Todos os insumos do *kit Ion PGM Hi-Q View Chef* foram alocados dentro do equipamento *Ion Chef System*, seguindo protocolo do fabricante. O pool equimolar das bibliotecas amplificadas foi inserido no cartucho de soluções na posição A e/ou B. Os chips de sequenciamento foram inseridos na centrífuga de chip do equipamento e identificados pela posição da centrífuga. A corrida foi planejada e ao término da mesma um dos chips foi guardado em geladeira dentro do recipiente para chips e o outro foi inserido no sequenciador, já inicializado, para o início do sequenciamento.

As soluções do *kit Ion PGM sequencer* foram preparadas segundo o protocolo do fabricante e acopladas aos respectivos recipientes. Após o preparo do sequenciador e a calibração do pH de todas as suas soluções, o chip foi carregado na etapa anterior e acoplado para o início do processo de sequenciamento.

4.5 Análise estatística

As informações dos pacientes foram compiladas em banco de dados elaborado no *software EpiData* (versão 3,1) e os arquivos gerados importados para o programa *RStudio*

(versão 4.0.3). Os dados clínico/epidemiológicos, sociodemográficos e hábitos da população de pacientes foram avaliados com testes estatísticos clássicos, conforme descritos a seguir, para verificar sua associação com a presença da UP em pacientes com DF. As variáveis categóricas foram analisadas pelos testes do qui-quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher, enquanto para as variáveis contínuas foram utilizados o teste t de Student ou o teste da soma dos postos de Wilcoxon. Adotou-se um nível de significância de 0,05.

4.6 Análise do microbioma

A análise de bioinformática do microbioma foi realizada com o *software Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2 (QIIME 2)* versão 2019.10 (37). Dados de sequência demultiplexados foram submetidos ao processo de *denoise* com DADA2 (via *plugin q2-dada2*) com parâmetros padrão de 200 pb de *amplicons* e qualidade Phred *score* ≥ 30 para gerar as variantes das sequências de amplicons (ASVs - *amplicon sequence variants*) (38). A árvore filogenética foi construída usando o *plugin q2-fragment-insertion* (39), que usa o método de inserção *SATé-enabled phylogenetic placement - SEPP* (40). Métricas de diversidade alfa (Chao1, Simpson, número de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) observadas e Shannon) e métricas de diversidade beta (Jaccard, Bray-Curtis, UniFrac ponderada e não ponderada) foram estimadas usando o *plugin q2-diversity* após rarefação de 49.227 sequências por amostra (41-43). As curvas de rarefação para cada amostra atingiram um platô, sugerindo representação da comunidade microbiana. O índice de Shannon ou Shannon-Weaver (H') considera igual peso entre as espécies raras e as abundantes (44), enquanto Simpson é um índice de dominância que considera a probabilidade de dois indivíduos selecionados aleatoriamente serem pertencentes a uma mesma espécie (45). Chao 1 é um estimador não paramétrico que avalia o número de espécies em uma comunidade baseado no número de espécies raras de uma amostra (46) e as ASVs, que identifica sequências únicas, compara e determina a probabilidade dessas sequências pertencerem as sequências biológicas (38). O índice de Jaccard mede a proporção de espécies entre duas amostras em relação ao total de espécies, enquanto Bray-Curtis avalia a distância ou dissimilaridade das abundâncias das espécies no intervalo entre zero como mínimo e um como máximo (47). A métrica UniFrac ponderada avalia a abundância relativa por OTU

presente na comunidade (42, 48) e UniFrac não ponderada que avalia presença ou ausência de espécies raras (43, 48).

A análise de coordenada principal (PCoA) para cada métrica da diversidade beta foi gerada usando o *plugin Emperor* (Vázquez-Baeza et al. 2013). As ASVs foram classificadas taxonomicamente usando o *plugin q2-feature-classifier* (49) (naive Bayes classifier) contra o banco de dados de sequência referência *Greengenes* (versão 13.8) (50). A composição da microbiota foi analisada em termos de proporção em diferentes níveis taxonômicos, (filó, classe, ordem, família, gênero e espécie).

O teste estatístico Kruskal-Wallis foi realizado para explorar diferenças nas métricas de diversidade alfa, enquanto PERMANOVA (*Permutational Multivariate Analysis of Variance*) foi utilizado para avaliar as diferenças na composição da diversidade beta. A comparação por Kruskal-Wallis e PERMANOVA tiveram a significância ($q < 0,05$) corrigida pelo critério de FDR (*False Discovery Rate*) proposto por Benjamini & Hochberg (51). A análise de abundância diferencial foi realizada utilizando os métodos *Analysis of Composition of Microbiomes - ANCOM* (52) para verificar a presença significativa dos táxons utilizando o QIIME 2.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da população

O presente estudo consistiu em avaliar a composição da microbiota de amostras de UP e pele íntegra de 87 pacientes com DF, sendo 30 pacientes com úlcera ativa (UP) e 57 pacientes sem história de úlcera (CT), com idade média total concentrada em torno de 39,9 anos com desvio padrão $\pm 10,6$ (Tabela 1). No total das amostras analisadas dos pacientes com DF, o sexo feminino foi maioria entre os pacientes (64,4%) e as cores de pele preta e parda foram predominantes (41,4% e 49,4%; respectivamente). Enquanto, de todas as cores de pele autodeclaradas, no grupo UP, os pacientes com a cor de pele representaram a metade quando comparado aos pacientes do grupo CT (36,8%).

Pacientes que tinham o ensino médio ou formação técnica foram quase metade da amostra (49,4%), embora, com menor frequência registrada para os pacientes com UP em relação ao grupo CT (43,3 *versus* 52,6%, respectivamente). Ainda, o ensino fundamental foi mais frequente para os pacientes UP (23,3%). O estado civil solteiro e casado apresentaram frequências iguais no total amostral (43,0% em ambos), porém, pacientes solteiros do grupo UP a frequência foi maior em relação aos solteiros do CT (48,3% e 40,4%, respectivamente). Dos pacientes UP, mais da metade (66,7%) recebiam entre um até dois salários mínimos, 63,3% recebiam algum tipo de benefício social, 73,3% não possuía plano de saúde e 83,3% deles declararam não exercer qualquer forma de trabalho remunerado. Diferenças significativas não foram observadas nessas comparações.

Tabela 1. Características sociodemográfica e hábitos de higiene dos pacientes com DF com UP e sem o histórico de úlcera.

Características	Pacientes com DF		Total	Valor de p
	UP n (%) ou mediana (min- máx)/média (DV)	CT n (%) ou mediana (min- máx)/média (DV)		
	n = 30	n = 57	n = 87	
Sexo				
Feminino	19 (63,3%)	37 (64,9%)	56 (64,4%)	1 [‡]
Masculino	11 (36,7%)	20 (35,1%)	31 (35,6%)	
Idade	40,2 ($\pm 10,8$)	39,8 ($\pm 10,6$)	39,9 ($\pm 10,6$)	0,866 ^a
Cor				
Branca/Asiático/Amarelo	3 (10,0%)	5 (8,8%)	8 (9,2%)	0,432 [‡]
Preta/Negra	15 (50,0%)	21 (36,8%)	36 (41,4%)	
Parda/Morena	12 (40,0%)	31 (54,4%)	43 (49,4%)	

Escolaridade				
Ensino Fundamental básico	8 (26,7%)	11 (19,3%)	19 (21,8%)	0,564 [‡]
Ensino Fundamental	7 (23,3%)	9 (15,8%)	16 (18,4%)	
Ensino Médio/ Técnico	13 (43,3%)	30 (52,6%)	43 (49,4%)	
Curso Superior	2 (6,7%)	7 (12,3%)	9 (10,3%)	
Estado civil*				
Solteiro	14 (48,3%)	23 (40,4%)	37 (43,0%)	0,392 [‡]
Casado ou morando juntos	13 (44,8%)	24 (42,1%)	37 (43,0%)	
Separado/Divorciado/Viúvo	2 (6,9%)	10 (17,5%)	12 (14,0%)	
Renda				
< 1 salário mínimo	2 (6,7%)	6 (10,5%)	8 (9,2%)	0,617 [‡]
≥ 1 salário até < 2 salários mínimos	20 (66,7%)	32 (56,1%)	52 (59,7%)	
≥ 2 salários mínimos	8 (26,7%)	19 (33,3%)	27 (31,0%)	
Benefício social				
Não	11 (36,7%)	25 (43,9%)	36 (41,4%)	0,648 [‡]
Sim	19 (63,3%)	32 (56,1%)	51 (58,6%)	
Plano de saúde				
Não	22 (73,3%)	39 (68,4%)	61 (70,1%)	0,806 [‡]
Sim	8 (26,7%)	18 (31,6%)	26 (29,9%)	
Se trabalha				
Não	25 (83,3%)	45 (78,9%)	70 (80,5%)	0,779 [‡]
Sim	5 (16,7%)	12 (21,1%)	17 (19,5%)	

*Variáveis com observações removidas: Estado civil (n=86); [‡]Teste Exato de Fisher; [‡]Teste t; [‡]Test Chi-quadrado.

Em relação aos hábitos de higiene (Tabela 2), todos os pacientes alegaram tomar banho diariamente e a frequência geral de banhos variou de um, dois ou mais de dois banhos por dia (40,2%; 47,1%; e 12,6%, respectivamente). Dois banhos diários foram observados, sendo uma menor frequência para o grupo UP (40,0%), enquanto um e mais que dois banhos por dia as frequências foram maiores (43,3% e 16,7%, respectivamente) para esse mesmo grupo. Quase todos os pacientes afirmaram usar sabonete diariamente no banho, com exceção de um único paciente do grupo UP que informou uso esporádico (3,3%). No grupo UP, 79,3% dos pacientes faziam uso do sabonete do tipo comum e 72,4% (21/29) usavam hidratante corporal. Diferenças estatísticas significativas foram encontradas na comparação entre os grupos quanto ao uso de sabonete antisséptico, com maior uso relatado pelo grupo de pacientes com UP (37,0%; $p = 0,004$).

No grupo UP, 30,0% informaram já ter feito uso de cigarro alguma vez na vida e destes, um único paciente desse mesmo grupo alegou ter fumado nos últimos 15 dias (11,1%). Em relação ao álcool no grupo UP, 76,7% dos pacientes já fizeram consumo de álcool na vida, sendo que 26,1% destes consumiram algum tipo de bebida alcoólica nas duas últimas semanas.

Tabela 2. Hábitos de vida dos pacientes com DF com UP e sem o histórico de úlcera.

Características	Pacientes com DF		Total	Valor de p
	UP	CT		
	n = 30	n = 57	n = 87	
Banho diário				
Não	-	-	-	-
Sim	30 (100%)	57 (100%)	87 (100%)	-
Banhos por dia				
1 banho	13 (43,3%)	22 (38,7%)	35 (40,2%)	0,552 [‡]
2 banhos	12 (40,0%)	29 (50,9%)	41 (47,1%)	
Mais de 2 banhos	5 (16,7%)	6 (10,5%)	11 (12,6%)	
Uso de sabonete				
Não	-	-	-	0,345 [‡]
Sim	29 (96,7%)	57 (100%)	86 (98,9%)	
Às vezes	1 (3,3%)	-	1 (1,2%)	
Uso de sabonete comum*				
Não	6 (20,7%)	3 (5,3%)	9 (10,5%)	0,056 [‡]
Sim	23 (79,3%)	54 (94,7%)	77 (89,5%)	
Uso de sabonete antisséptico*				
Não	17 (63,0%)	44 (91,7%)	61 (81,3%)	0,004[‡]
Sim	10 (37,0%)	4 (8,3%)	14 (18,7%)	
Uso de hidratante*				
Não	4 (13,8%)	2 (3,5%)	6 (7,0%)	0,173 [‡]
Sim	25 (86,2%)	55 (96,5%)	80 (93,0%)	
Uso de cigarro alguma vez na vida				
Não	21 (70,0%)	38 (66,7%)	59 (67,8%)	0,813 [‡]
Sim	9 (30,0%)	19 (33,3%)	28 (32,2%)	
Uso de cigarro nos últimos 15 dias*				
Não	8 (88,9%)	15 (79,0%)	23 (82,1%)	1 [‡]
Sim	1 (11,1%)	4 (21,0%)	5 (17,9%)	
Uso de bebida alcoólica alguma vez na vida				
Não	7 (23,3%)	7 (12,3%)	14 (16,1%)	0,224 [‡]
Sim	23 (76,7%)	50 (87,7%)	73 (83,9%)	
Uso de bebida alcoólica nos últimos 15 dias*				
Não	17 (73,9%)	37 (74,0%)	54 (74,0%)	1 [‡]
Sim	6 (26,1%)	13 (26,0%)	19 (26,0%)	

*Variáveis com observações removidas: Uso de sabonete comum (n=86), Uso de sabonete antisséptico (n=75), Uso de hidratante (n=86), Uso de cigarro nos últimos 15 dias (n=28), Uso de bebida alcoólica nos últimos 15 dias (n=75); †Teste Exato de Fisher; ‡Test Chi-quadrado.

A avaliação das características de todos os pacientes UP (30) mostrou que 40% (12/30) dos pacientes apresentavam uma segunda úlcera (Tabela 3). No grupo de UP1, a maioria das feridas estavam ativas pelo período de um a cinco anos e maior que cinco anos atrás (30,0% e 36,7%, respectivamente). Os pacientes também relataram sentir dor frequente nas úlceras de pernas, sendo 66,7% no grupo UP1 e 91,7% o grupo de UP2.

Além disso, os pacientes informaram que o surgimento das úlceras aconteceu de forma espontânea na maior parte dos casos (82,8% e 58,3%; UP1 e UP2, respectivamente).

Quanto aos aspectos das úlceras, observamos que 56,7% das úlceras do grupo UP1 apresentaram perda total da pele envolvendo danos ou necrose do tecido subcutâneo, com complicações do tecido adjacente (Estágio II). Ainda nesse grupo, 36,7% apresentaram o Estágio I, com perda parcial da pele envolvendo a epiderme e/ou a derme, podendo a úlcera ser bolhosa, abrasiva ou de cratera rasa. Também no grupo UP1, uma pequena parcela (6,7%) apresentou o quadro mais severo das úlceras, apresentando a perda total da pele, com destruição extensa, podendo apresentar tecido necrótico ou danos aos músculos, ossos, articulações ou tendões (Estágio III). No grupo UP2, metade das úlceras também apresentaram o Estágio I, enquanto a outra metade apresentou danos do Estágio II.

O tamanho das úlceras do grupo UP1 variou entre 1,4 a 70,4 cm² (mediana=18,7 cm²), enquanto no UP2 o intervalo ficou entre 0,7 a 26 cm² (mediana=6,82 cm²). Em ambos os grupos de úlceras, as bordas foram irregulares na maioria dos casos (72,4% e 72,7%; UP1 e UP2, respectivamente) e a localização das feridas foram predominantes na região dos maléolos, sendo a frequência no maléolo lateral de 34,5% e 36,4% e no maléolo medial de 44,8% e 18,2% (UP1 e UP2, respectivamente).

Tabela 3. Características e aspectos clínicos das úlceras de perna em pacientes com DF.

Características	UP1		UP2	
	n ou mediana	% ou min-máx	n ou mediana	% ou min-máx
	n = 18		n = 12	
Duração				
0 a 3 meses	5	16,7%	4	33,3%
3 a 6 meses	2	6,7%	1	8,3%
6 a 12 meses	3	10,0%	1	8,3%
1 a 5 anos	9	30,0%	4	33,3%
> 5 anos	11	36,7%	2	16,7%
Dor				
Não	-	-	1	8,3%
Sim	20	66,7%	11	91,7%
Às vezes	10	33,3%	-	-
Etiologia*				
Acidente/Queda/Batida	3	10,3%	3	25,0%
Picada de inseto	1	3,5%	1	8,3%
Surgiu espontaneamente	24	82,8%	7	58,3%
Mordida de cachorro	1	3,5%	-	-
Surgiu uma verruga	-	-	1	8,3%

Aspecto				
Estágio I	11	36,7%	6	50,0%
Estágio II	17	56,7%	6	50,0%
Estágio III	2	6,7%	-	-
Tamanho - cm ² *	18,74	1,4-70,4	6,8	0,7-26
Borda*				
Regular	8	27,6 %	3	27,3%
Irregular	21	72,4%	8	72,7%
Localização*				
Calcâneo	-	-	1	9,1%
Calcâneo/Maléolo lateral	1	3,4%	-	-
Calcâneo/Antero superior	-	-	1	9,1%
Calcâneo/Tíbia anterior/Panturrilha	1	3,4%	-	-
Tíbia anterior	2	6,9%	1	9,1%
Tíbia anterior/Maléolo lateral	-	-	1	9,1%
Tíbia anterior/Panturrilha	1	3,4%	-	-
Tíbia anterior/Panturrilha/ Maléolo lateral e medial	1	3,4%	-	-
Tíbia medial	-	-	1	9,1%
Maléolo lateral	10	34,5%	4	36,4%
Maléolo medial	13	44,8%	2	18,2%

*Variáveis com observações removidas: Tamanho - cm² (n=24), Borda (n=29), Localização (n=29).

Todos os pacientes com UP realizaram algum tipo de curativo para o tratamento das feridas (Tabela 4). O uso de analgésico foi o medicamento mais utilizado (53,3%), seguido do uso de antibióticos (40,0%). Ainda sobre os tipos de tratamentos, dois pacientes (6,7%) estavam em regime de transfusão crônica (TC) e dez pacientes faziam uso da Hidroxiureia (HU) com 33,3%. No entanto, tanto a TC quanto a HU não foram indicações exclusivas para o tratamento das úlceras de perna como mostrado na Tabela 5.

Tabela 4. Tipos de cuidados e tratamentos para UP nos últimos 15 dias dos pacientes com DF.

Tipos de cuidados	UP	
	n = 30	%
Medicamentos		
Analgésicos	16	53,3%
Antibióticos	12	40,0%
Antialérgicos	2	6,7%
Antimicóticos	1	3,3%
Curativos	30	100%
Transfusão Crônica	2	6,7%
Hidroxiureia	10	33,3%

A avaliação da clínica progressa de ambos os grupos de pacientes com DF mostrou que a maioria deles não estava em regime de transfusão crônica com 83,3% para o grupo UP e 89,5% para o CT (Tabela 5). A indicação para o regime de TC no grupo UP foi 6,7% para a complicação Doença Vascular Cerebral. A maioria dos pacientes com DF faz uso de HU (63,3% e 79,0%; UP e CT, respectivamente) e a principal indicação desse tratamento foi para crise de dor com 26,7% para o grupo UP e 45,6% para o CT. História de osteomielite apresentou diferenças significativas na comparação entre os grupos, sendo maior frequência da complicação nos pacientes com úlcera (20,0% e 3,5%; UP e CT, respectivamente; $p=0,018$).

Dos parâmetros laboratoriais avaliados, observamos diferenças significativas apenas para reticulócitos e plaquetas, sendo encontradas medianas maiores para o grupo UP ($p=0,002$ e $p=0,003$, respectivamente). A análise da hemoglobina por eletroforese mostrou que o grupo CT apresentou maior mediana para a HbF (mediana=15,8), enquanto a HbS foi maior para o grupo UP (mediana=78,5), porém, diferenças significativas não foram observadas nessas comparações.

Tabela 5. História clínica dos pacientes com DF com e sem histórico de UP.

Características	Pacientes com DF		Total	Valor de p
	UP	CT		
	n (%) ou mediana (min-máx)/média (DV) n = 30	n (%) ou mediana (min-máx)/média (DV) n = 57		
Transfusão crônica (TC)				
Não	25 (83,3%)	51 (89,5%)	76 (87,4%)	0,502 [‡]
Sim	5 (16,7%)	6 (10,5%)	11 (12,6%)	
Indicação para TC				
Acidente Vascular Cerebral	1 (3,3%)	5 (8,8%)	6 (6,9%)	0,660 [‡]
Anemia Aguda Sintomática	1 (1,2%)	-	2 (2,3%)	0,345 [‡]
Doença Vascular Cerebral	2 (6,7%)	2 (3,5%)	4 (4,6%)	0,606 [‡]
Uso de Hidroxiureia (HU)				
Não	11 (36,7%)	12 (21,1%)	23 (26,4%)	0,132 [‡]
Sim	19 (63,3%)	45 (78,9%)	64 (73,6%)	
Indicação para HU				
Doença Vascular Cerebral	1 (3,3%)	4 (7,2%)	5 (5,7%)	0,656 [‡]

Síndrome Torácica				
Aguda	1 (3,3%)	6 (10,5%)	7 (8,1%)	0,412 [‡]
Hipertensão Pulmonar	1 (3,3%)	3 (3,5%)	3 (3,5%)	1 [‡]
Anemia Aguda Sintomática	2 (6,7%)	7 (12,3%)	9 (10,3%)	0,713 [‡]
Crise de dor Osteomielite progressa	8 (26,7%)	26 (45,6%)	34 (39,1%)	0,108 [‡]
Resultados laboratoriais				
Reticulócitos*	6,98 (1,1-14,7)	5,8 (2,1-22,1)	6,3 (1,1-22,1)	0,102•
Leucócitos*	10.100 (4.812-17.230)	7.934 (4.100-15.870)	8.552,5 (4.100-17.230)	0,002•
Plaquetas*	396.600 (165.500-510.000)	291.200 (111.100-717.700)	323.000 (111.100-717.700)	0,003•
Hemoglobina*	8,7 (±1,8)	9,17 (±1,6)	9,03 (±1,7)	0,276 ^a
VCM	105,5 (±13,93)	108,8 (±14,04)	107,7 (±14)	0,317 ^a
Ferritina	297,5 (29,3-1.446)	384,5 (19,4-2.808)	355,5 (19,4-2.808)	0,355•
Eletrforese de Hemoglobina nos últimos 12 meses				
HbF	13 (0,7-29,3)	15,75 (0,9-44,3)	15,3 (0,7-44,3)	0,070•
HbS	78,5 (40,6-94,3)	74,65 (33,4 -94)	75,1 (33,4-94,3)	0,614•
HbA	0 (0-55,4)	0 (0-60,1)	0 (0-60,1)	0,613•
HbA2	3,9 (3,3-5)	3,6 (2,6-6,4)	3,6 (2,6-6,4)	0,196•

*Variáveis com observações removidas: Reticulócitos (n=81), Leucócitos (n=84), Plaquetas (n=84), Hemoglobina (n=85); [‡]Teste Exato de Fisher; •Teste de Mann-Whitney; ^aTeste t.

5.2 Composição da microbiota da úlcera e pele

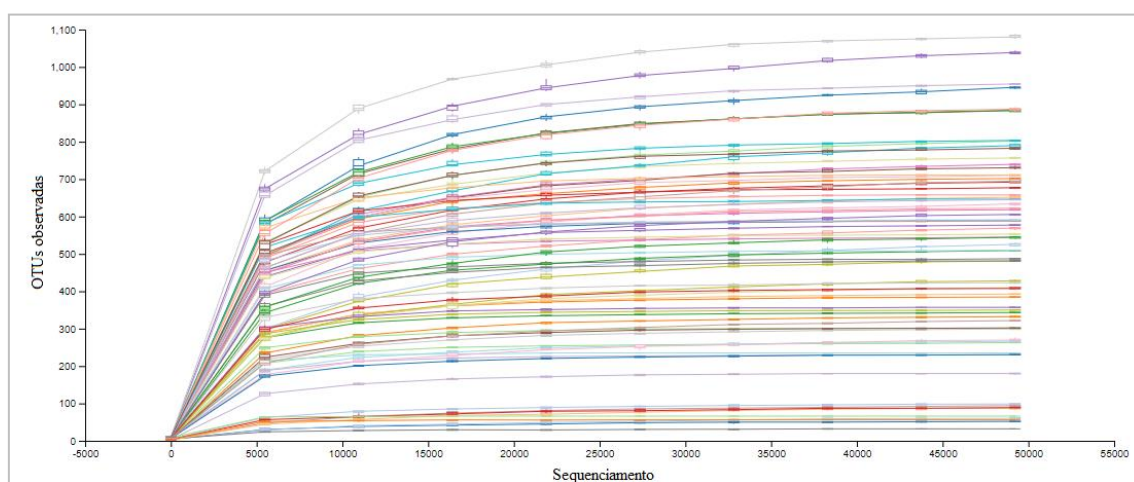


Figura 2. Curva de rarefação das sequências ASVs observadas por diversidade alfa para os quatro grupos avaliados (G1-G4).

O sequenciamento do 16S RNAr realizado em 22 amostras de úlcera (G1) e 17 de pele íntegra de paciente com úlcera (G2), 23 de pele íntegra de paciente DF sem história de úlcera (G3) e a 22 pele íntegra do controle sem doença crônica (G4) gerou 15.279.295 sequências com média de 177.385 sequências por amostra. A qualidade das sequências geradas foi analisada através da curva de rarefação das ASVs observadas por diversidade alfa, que verificou a cobertura e a profundidade necessárias para identificação e classificação taxonômicas de comunidades bacterianas (Figura 2).

Tabela 6. Comparações da diversidade alfa entre os quatro grupos avaliados (G1-G4).

Índices	Comparação de índices da diversidade alfa entre grupos (FDR)*					
	G1 e G2	G1 e G3	G1 e G4	G2 e G3	G2 e G4	G3 e G4
ASVs observadas	<0,001	<0,001	<0,001	0,651	0,017	0,017
Shannon	<0,001	<0,001	<0,001	0,902	0,053	0,052
Simpson	<0,001	<0,001	<0,001	0,435	0,073	0,013
Chao1	<0,001	<0,001	<0,001	0,671	0,016	0,016

*Teste de Benjamini & Hochberg (valor de q)

Os índices utilizados para descrever a diversidade alfa avaliaram propriedades de riqueza e uniformidade dos táxons constituintes de uma única amostra. Diferenças estatísticas significativas foram encontradas para os táxons observados (ASVs observadas), Simpson, Chao1 e Shannon com menor diversidade para G1 em comparações com os demais grupos (G2-G4) utilizando o método de Kruskal-Wallis (Figura 3). Nas comparações pareadas entre os grupos, as diferenças estatísticas significativas ($q < 0,05$) permaneceram após o critério de FDR (*False Discovery Rate*), exceto entre G2 e G3 para todos os índices avaliados, entre G2 e G4 para os índices de Shannon e Simpson e entre G3 e G4 para Simpson (Tabela6).

Tabela 7. Comparações da diversidade beta entre os quatro grupos avaliados (G1-G4).

Índices	Comparação da diversidade alfa entre grupos (FDR)*					
	G1 e G2	G1 e G3	G1 e G4	G2 e G3	G2 e G4	G3 e G4
Bray-Curtis	0,002	0,002	0,002	0,167	0,003	0,004
Jaccard	0,001	0,001	0,001	0,025	0,001	0,001
Unifrac ponderada	0,002	0,002	0,002	0,608	0,023	0,026
Unifrac não ponderada	0,001	0,001	0,001	0,237	0,001	0,001

*Teste de Benjamini & Hochberg (valor de q)

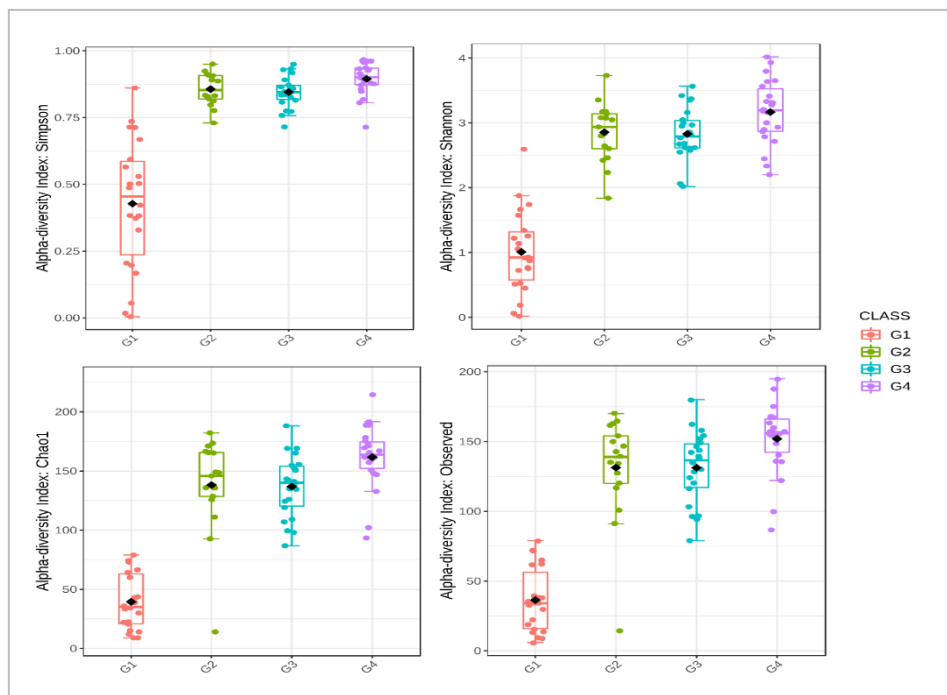


Figura 3. Índices da diversidade alfa: Chao 1 ($p < 0,001$), ASVs Observadas ($p < 0,001$), Shannon ($p < 0,001$) e Simpson ($p < 0,001$) para os quatro grupos (G1-G4).

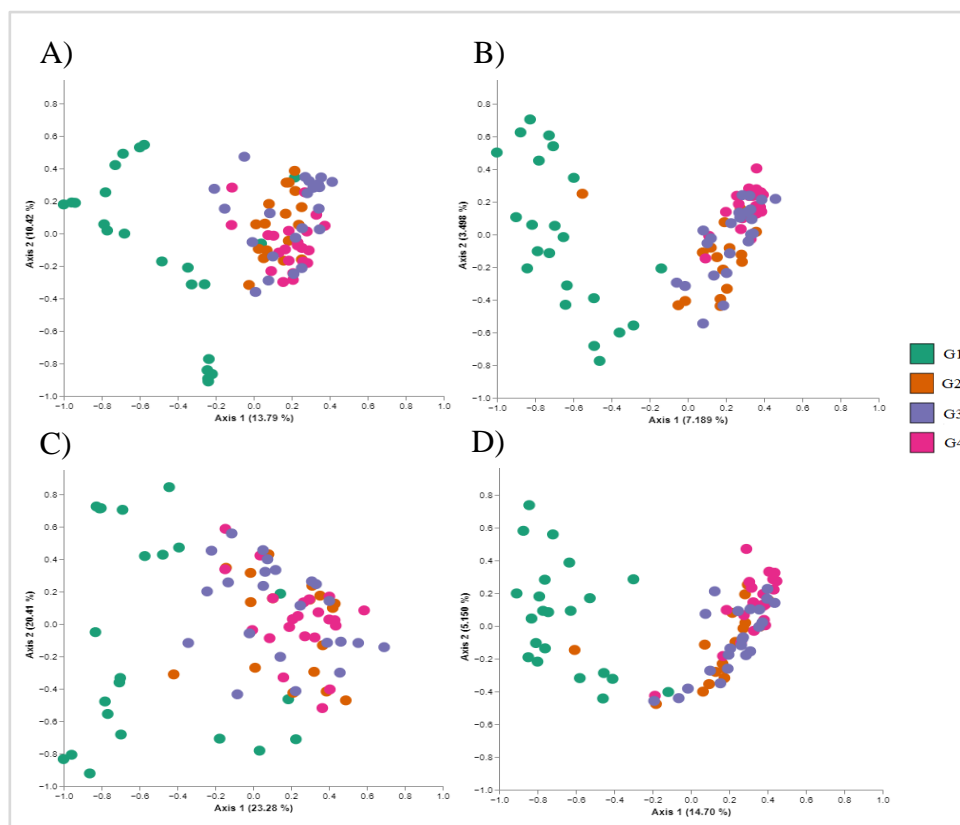


Figura 4. Índices da diversidade beta por Análise de Coordenadas Principais (PCoA): A) Bray-Curtis ($p = 0,001$), B) Jaccard ($p = 0,001$) e C) Unifrac ponderada ($p = 0,001$) e D) não ponderada ($p = 0,001$) para os grupos (G1-G4).

Na diversidade beta, os índices de Jaccard, Bray-Curtis e UniFrac ponderada e não ponderada foram utilizados para avaliar a similaridade e a distância entre as amostras estudadas. Diferenças estatísticas significativas foram encontradas empregando o teste de PERMANOVA nas comparações entre todos os grupos estudados (G1-G4), como mostrado no gráfico de Análise de Componente Principal – PcoA (Figura 4). O ajuste de significância por FDR após as comparações pareadas permaneceu com diferenças estatísticas entre os grupos com significância $q < 0,05$, exceto entre G2 e G3 para os índices Bray-curtis, Unifrac ponderada e não ponderada (Tabela 7).



Figura 5. Frequência relativa da abundância por amostra entre os grupos (G1-G4). Gráfico de histograma para demonstrar a distribuição da classificação taxonômica à nível de filo.

A abundância dos filos bacterianos predominantes nos grupos estudados está detalhada no histograma (Figura 5). Firmicutes (51%), Proteobactéria (41%) e Actinobactéria (8%) foram os filos com maior abundância nas úlceras (G1), enquanto os

filos Proteobactéria (35%), Actinobactéria (34%), Firmicutes (27%) apresentaram uma distribuição mais homogênea na pele íntegra desses mesmos pacientes (G2). Frequências similares foram encontradas para os grupos G3 e G4, com os filoss Proteobactéria (41% e 39%), Actinobactéria (31% em ambos) e Firmicutes (21% e 24%), respectivamente. O filo Bacteroidetes seguiu com a menor abundância para os grupos de pele íntegra (3%, 6%, e 6%; G2-G4, respectivamente).

A abundância mediana obteve maiores registros para os filoss Firmicutes e Proteobactérias em G1 (40,4 e 33,5) e G2 (24,2 e 41,5), respectivamente, porém, diferenças significativas não foram observadas entre os grupos (Tabela 8). Actinobactéria também apresentou maior abundância mediana em G2 (25,1) e diferenças significativas foram encontradas entre os grupos amostrados (G1 e G2), bem como aos demais filoss dos 41 identificados, são eles: Euryarchaeota, Acidobactéria, Actinobactérias, Bacteroidetes, Chlamydiae, Chloroflexi, Cyanobactéria, Fusobactéria, Gemmatimonadetes, Planctomycetes, TM7, Verrucomicrobia e Thermi com significância $<0,05$.

Tabela 8. Comparação das abundâncias dos táxons à nível taxonômico de filo entre úlcera e pele íntegra (G1 e G2) dos pacientes com UP ativa.

Filos	Comparação da abundância entre grupos		Valor de p [†]
	G1*	G2	
	Mediana - DI**		
Archeae			
Crenarchaeota	0 (0)	0 (0,002)	0,294
Euryarchaeota	0 (0)	0 (0,004)	0,036
Parvarchaeota	0 (0)	0 (0)	NA
Bacteria			
AD3	0 (0)	0 (0)	NA
Acidobacteria	0,01 (0,033)	0,12 (0,075)	<0,001
Actinobacteria	0,73 (8,962)	25,07 (23,449)	0,004
Aquificae	0 (0)	0 (0)	NA
Armatimonadetes	0 (0)	0 (0,009)	0,295
BRC1	0 (0)	0 (0)	1
Bacteroidetes	0,07 (0,504)	2,05 (2,047)	0,002
Chlamydiae	0 (0)	0,01 (0,010)	0,020
Chlorobi	0 (0)	0 (0)	0,181
Chloroflexi	0 (0)	0,10 (0,106)	<0,001
Cyanobacteria	0 (0,031)	0,20 (0,208)	0,002
Elusimicrobia	0 (0)	0 (0)	1
FBP	0 (0)	0 (0)	NA
Firmicutes	40,36 (58,006)	24,16 (18,724)	0,145
Fusobacteria	0 (0)	0,09 (0,0254)	0,003
GN02	0 (0)	0 (0)	0,181
Gemmatimonadetes	0 (0)	0,02 (0,060)	0,004
Lentisphaerae	0 (0)	0 (0)	NA

MVP-21	0 (0)	0 (0)	NA
NKB19	0 (0)	0 (0)	NA
Nitrospirae	0 (0,003)	0 (0,016)	0,308
OD1	0 (0)	0 (0)	0,589
OP11	0 (0)	0 (0)	0,371
OP3	0 (0)	0 (0)	NA
OP8	0 (0)	0 (0)	1
Planctomycetes	0 (0,031)	0,12 (0,115)	<0,001
Proteobacteria	33,46 (60,886)	41,45 (26,106)	0,644
SBR1093	0 (0)	0 (0)	1
SR1	0 (0)	0 (0,003)	0,059
Spirochaetes	0 (0)	0 (0,010)	0,058
Synergistetes	0 (0)	0 (0)	1
TM6	0 (0)	0 (0)	0,100
TM7	0 (0)	0,16 (0,156)	0,001
Tenericutes	0 (0)	0 (0)	0,100
Verrucomicrobia	0 (0,003)	0,01 (0,025)	0,037
WPS-2	0 (0)	0 (0)	0,371
WS3	0 (0)	0 (0)	NA
Thermi	0 (0,003)	0,08 (0,468)	<0,001

*Observações removidas; **Diferença Interquartilica (DI); †Teste de Wilcoxon.

Os filos Firmicutes e Proteobactéria mantiveram com maiores registros entre os grupos (G1, G3 e G4), no entanto, as diferenças não foram significativas ($p > 0,05$), tabela 9. Enquanto, o filo Actinobactéria apresentou menor abundância mediana em G1 (1,1) comparado às medianas em G3 e G4 (23,5 e 30,3; $p < 0,001$, respectivamente). Ainda, os filos Crenarchaeota, Euryarchaeota, Parvarchaeota, Acidobactéria, Actinobactérias, Armatimonadetes, Bacteroidetes, Chlamydiae, Chloroflexi, Cyanobactéria, FBP, Fusobactéria, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Nitrospirae, OPD1, OP3, Planctomycetes, SBR1093, Spirochaetes, TM6, TM7, Tenericutes, Verrucomicrobia, WPS-2 e Thermi apresentaram significância estatística $< 0,05$ entre os grupos.

Tabela 9. Comparação das abundâncias dos táxons à nível taxonômico de filo entre úlcera (G1) e pele íntegra dos pacientes DF sem histórico de úlceras de perna e voluntários sem doenças crônicas (G3 e G4).

Filos	Comparação da abundância entre grupos			Valor de p^{\dagger}
	G1	G3	G4	
	Mediana - DI**			
Archeae				
Crenarchaeota	0 (0)	0 (0)	0 (0,006)	0,026
Euryarchaeota	0 (0)	0 (0,009)	0 (0,002)	0,015
Parvarchaeota	0 (0-0)	0,01 (0,010)	0,01 (0,010)	<0,001
Bacteria				
AD3	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,157
Acidobacteria	0,01 (0,033)	0,24 (0,290)	0,17 (0,281)	<0,001
Actinobacteria	1,06 (8,962)	23,51 (22,972)	30,32 (13,683)	<0,001

Aquificae	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,360
Armatimonadetes	0 (0)	0 (0,021)	0 (0,012)	0,001
BRC1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,225
Bacteroidetes	0,08 (0,504)	2,3 (2,242)	4,43 (5,259)	<0,001
Chlamydiae	0 (0)	0 (0,033)	0,01 (0,012)	0,003
Chlorobi	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,238
Chloroflexi	0 (0)	0,12 (0,115)	0,16 (0,209)	<0,001
Cyanobacteria	0 (0,031)	0,29 (0,342)	0,17 (0,350)	<0,001
Elusimicrobia	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,351
FBP	0 (0)	0 (0)	0 (0,003)	0,013
Firmicutes	45,28 (58,006)	18,76 (17,940)	22,10 (11,055)	0,076
Fusobacteria	0 (0)	0,08 (0,254)	0,07 (0,176)	<0,001
GN02	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,134
Gemmatimonadetes	0 (0)	0,03 (0,080)	0,03 (0,060)	<0,001
Lentisphaerae	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,042
MVP-21	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,384
NKB19	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,360
Nitrospirae	0 (0,003)	0,02 (0,052)	0,02 (0,038)	<0,001
OD1	0 (0)	0 (0,005)	0 (0,012)	0,009
OP11	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,360
OP3	0 (0)	0 (0,001)	0 (0)	0,009
OP8	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA
Planctomycetes	0 (0,031)	0,19 (0,182)	0,17 (0,177)	<0,001
Proteobacteria	32,71 (60,886)	43,25 (27,927)	38,53 (8,492)	0,903
SBR1093	0 (0)	0 (0,010)	0 (0,007)	0,001
SR1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,069
Spirochaetes	0 (0)	0 (0,019)	0 (0,012)	0,002
Synergistetes	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,359
TM6	0 (0)	0 (0,010)	0 (0,008)	0,008
TM7	0 (0)	0,07 (0,085)	0 (0,008)	<0,001
Tenericutes	0 (0)	0 (0,007)	0 (0,016)	0,002
Verrucomicrobia	0 (0,003)	0,03 (0,043)	0,03 (0,052)	<0,001
WPS-2	0 (0)	0 (0,012)	0 (0,009)	0,001
WS3	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,609
Thermi	0 (0,003)	0,17 (0,429)	0,34 (0,645)	<0,001

**Diferença Interquartilica; †Teste de Kruskal-Wallis.

Quanto ao nível taxonômico de gênero dos quinze mais abundantes, *Staphylococcus* ssp. apresentou a maior abundância mediana nas úlceras (16,4%) comparado a pele íntegra dos pacientes DF com úlceras ativa (6,8%), enquanto, os gêneros *Ralstonia* e *Corynebacterium* tiveram abundância mediana maior em G2 (11,0% e 13,1%, respectivamente), tabela 10 e figura 6. A maioria dos gêneros apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) em sua abundância na comparação entre grupos (G1 e G2), com exceção dos gêneros *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* e *Anaerococcus*.

Tabela 10. Comparação de quinze táxons à nível taxonômico de gênero com maior abundância nas úlceras e nas peles íntegras dos pacientes com UP ativa (G1 e G2).

Gêneros	Comparação da abundância entre grupos		Valor de p [‡]
	G1*	G2	
	Mediana - DI**		
<i>Staphylococcus</i> ssp.	16,39 (66,467)	6,81 (6,386)	0,020
<i>Ralstonia</i> ssp.	1,51 (3,469)	11,03 (18,706)	0,064
<i>Corynebacterium</i> ssp.	0,22 (2,033)	13,06 (15,225)	0,003
<i>Acinetobacter</i> ssp.	0,09 (0,307)	1,53 (1,584)	0,014
<i>Pseudomonas</i> ssp.	0,06 (22,348)	0,67 (1,108)	0,963
<i>Streptococcus</i> ssp.	0,01 (0,569)	1,39 (2,883)	0,093
<i>Micrococcus</i> ssp.	0 (0)	1,44 (2,078)	<0,001
<i>Enhydrobacter</i> ssp.	0 (0,007)	0,36 (0,480)	<0,001
<i>Burkholderia</i> ssp.	0,09 (0,677)	1,26 (1,427)	0,009
<i>Propionibacterium</i> ssp.	0,02 (0,039)	0,99 (1,030)	<0,001
<i>Paracoccus</i> ssp.	0 (0)	0,72 (0,592)	<0,001
<i>Lactobacillus</i> ssp.	0 (0,005)	0,32 (0,869)	0,002
<i>Anaerococcus</i> ssp.	0 (0,005)	0,82 (1,207)	0,093
<i>Bacillus</i> ssp.	0 (0,028)	0,22 (0,501)	0,006
<i>Gardnerella</i> ssp.	0 (0)	0,01 (0,997)	0,025

*Observações removidas; **Diferença Interquartilica (DI); †Wilcoxon.

Tabela 11. Comparação de quinze táxons à nível taxonômico de gênero com maior abundância nas úlceras (G1) e nas peles íntegras dos pacientes DF sem histórico de úlceras de perna e dos voluntários sem doenças crônicas (G3 e G4).

Gêneros	Comparação da abundância entre grupos			Valor de p [‡]
	G1	G3	G4	
	Mediana - DI**			
<i>Staphylococcus</i> ssp.	24,61 (65,007)	3,41 (5,292)	4,75 (6,341)	0,076
<i>Ralstonia</i> ssp.	1,48 (8,837)	13,60 (23,014)	5,61 (6,264)	0,002
<i>Corynebacterium</i> ssp.	0,27 (3,722)	7,92 (8,583)	7,40 (18,874)	<0,001
<i>Acinetobacter</i> ssp.	0,09 (0,267)	2,03 (3,791)	2,37 (5,784)	<0,001
<i>Pseudomonas</i> ssp.	0,05 (3,392)	0,41 (0,509)	0,99 (1,632)	0,024
<i>Streptococcus</i> ssp.	0,01 (0,480)	1,79 (4,055)	1,71 (3,739)	<0,001
<i>Micrococcus</i> ssp.	0 (0,020)	1,93 (4,318)	1,07 (4,124)	<0,001
<i>Enhydrobacter</i> ssp.	0 (0,009)	0,49 (1,598)	1,10 (1,560)	<0,001
<i>Burkholderia</i> ssp.	0,11 (0,724)	1,77 (2,891)	1,34 (1,563)	<0,001
<i>Propionibacterium</i> ssp.	0,02 (0,050)	0,49 (1,420)	0,75 (1,359)	<0,001
<i>Paracoccus</i> ssp.	0 (0)	0,58 (1,495)	1,08 (4,447)	<0,001
<i>Lactobacillus</i> ssp.	0 (0,001)	0,10 (0,278)	0,35 (3,265)	<0,001
<i>Anaerococcus</i> ssp.	0 (0,510)	0,53 (0,524)	0,51 (0,836)	0,002
<i>Bacillus</i> ssp.	0 (0,067)	0,26 (0,381)	0,17 (0,628)	<0,001
<i>Gardnerella</i> ssp.	0 (0)	0,01 (0,081)	0,01 (0,060)	<0,001

**Diferença Interquartilica; †Teste de Kruskal-Wallis.

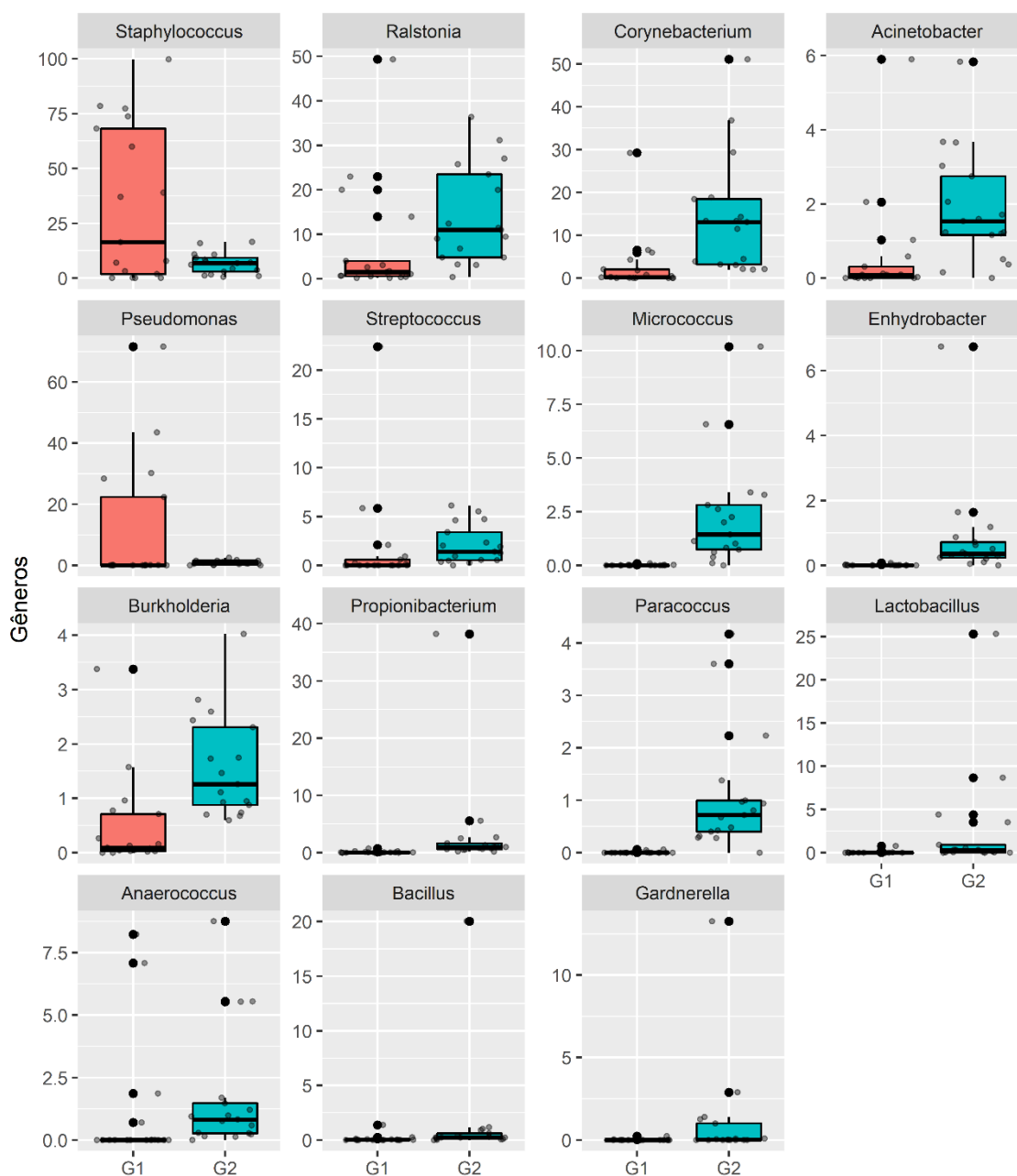


Figura 6. Boxplot dos quinze gêneros mais abundantes entre as úlceras e peles íntegras dos pacientes DF com UP ativa (G1 e G2).

A abundância mediana do gênero *Staphylococcus* em G3 e G4 (3,4% e 4,8%; respectivamente) foi relativamente menor da registrada em amostras de úlceras (24,6%), tabela 11 e figura 7. Entretanto, o contrário foi observado para o gênero *Ralstonia* com maior abundância mediana em G3 (13,6%) seguido de G4 (5,6%), sendo G1 registrado com a menor mediana de 1,48. *Corynebacterium* e *Acinetobacter* também apresentaram maiores medianas em G3 (7,9% e 2,0%) e G4 (7,4% e 2,4%) e menor em G1 (0,03% e

0,1%), respectivamente. As diferenças estatísticas significativas foram registradas em todas as comparações entre grupos (G1, G3 e G4), exceto para o gênero *Staphylococcus*.

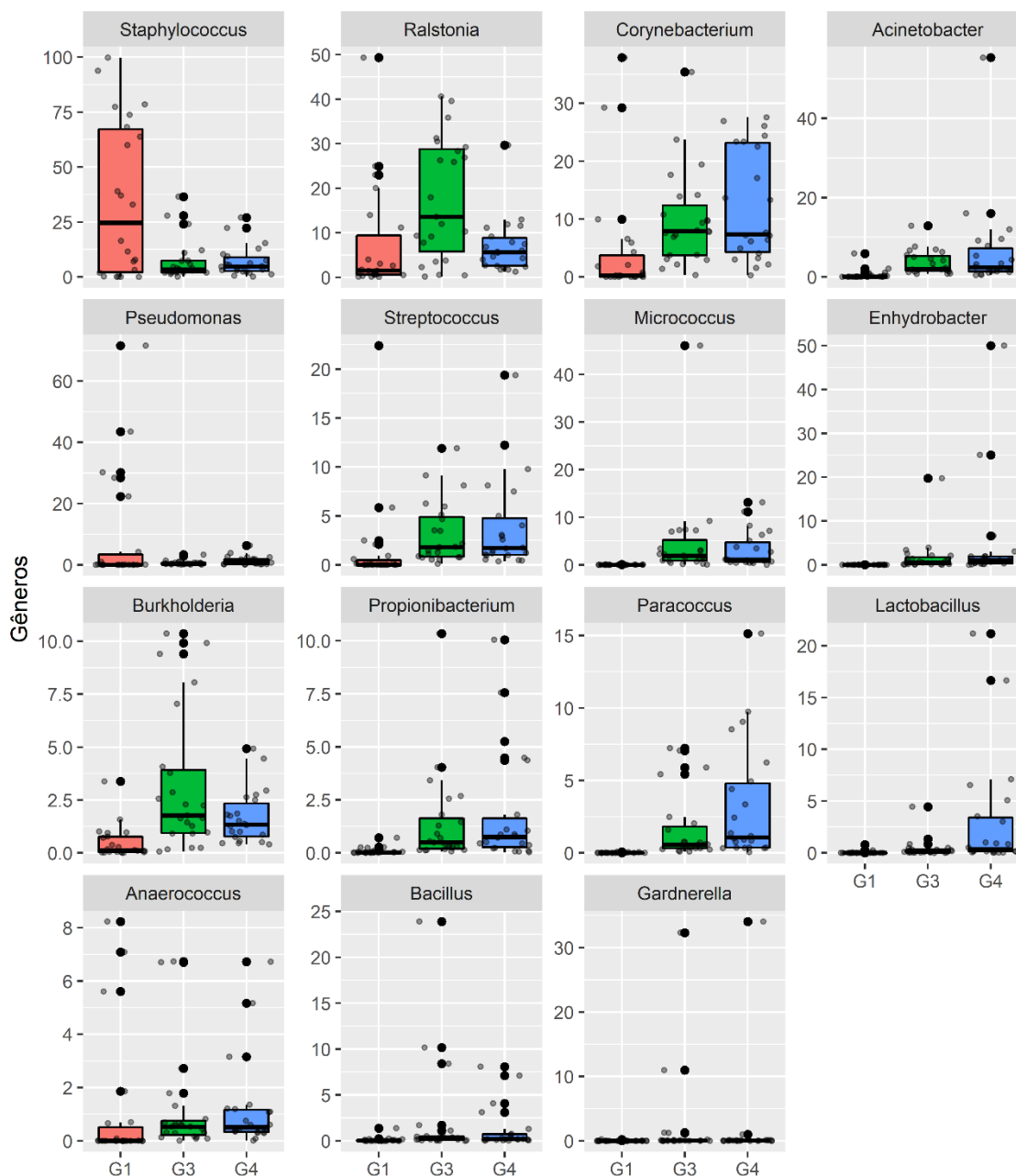


Figura 7. Boxplot dos quinze gêneros mais abundantes entre as úlceras (G1) e peles íntegras dos pacientes DF sem histórico de UP (G3) e dos voluntários sem doenças crônicas (G4).

A análise de diferenças nas abundâncias entre os grupos (G1-G4) pelo teste ANCOM (análise da composição da microbiota) mostrou que dos 27 táxons encontrados com presença de diferenças estatísticas significativas, 15 deles tiveram confiança >97% (ANEXO1). Comamonadaceae, Intrasporangiaceae e Burkholderiaceae foram as famílias

identificadas com 99% de confiança, enquanto os gêneros *Corynebacterium*, *Enhydrobacter*, *Acinetobacter*, *Streptococcus* e *Aerococcus* apresentaram 99% de confiança, exceto o gênero *Micrococcus* com 97% de confiança. A espécie *Paracoccus marcusii* também foi identificada por ANCOM com diferenças em sua abundância entre os grupos, com 97% de confiança.

6 DISCUSSÃO

Cada vez mais estudos comprovam o importante papel da microbiota, isto é, a somatória de todos os micro-organismos que povoam o corpo humano, no seu equilíbrio e na origem de doenças humanas. O desenvolvimento de metodologias de análise e sequenciamento genético permitem atualmente medir a quantidade, qualidade e função das bactérias nos diversos locais do corpo humano. No entanto, a microbiota das úlceras de perna na DF ainda é pouco estudada, necessitando de estudos mais amplos. Em nosso estudo, pudemos analisar a microbiota da pele em um número expressivo de pacientes portadores de DF com UP e compará-los com pacientes sem úlcera e pessoas sem DF.

Inicialmente, avaliamos as características da população com e sem úlcera, verificando que as mesmas eram mais comuns em pacientes de aproximadamente 40 anos, do sexo feminino e cor de pele preta. Os pacientes com úlcera possuíam também em sua maioria como escolarização máxima o ensino médio, renda de um salário mínimo, sendo que a maior parte deles (83%) relatou não estar desenvolvendo nenhuma atividade remunerada, corroborando com achados na população de pacientes DF com UP no Brasil (53, 54). Isso nos sugere a pensar que a UP na DF pode ser um fator limitante das atividades laborais e do dia-a-dia desses pacientes, refletindo no nível de escolaridade e na condição financeira.

O uso de sabonete antisséptico durante o banho e o histórico clínico de osteomielite foram significativamente associados à presença das úlceras de perna da DF. O frequente uso de sabonete antisséptico nos sugere ser uma consequência da busca de manter a pele sempre livre de patógenos que possam prejudicar o processo de cicatrização dessas feridas. No entanto, existe a recomendação que o tratamento da ferida utilize apenas água e sabão ou solução fisiológica para a limpeza e que se deve evitar produtos antissépticos, pois os mesmos podem gerar irritação nas úlceras (55, 56). Assim como a UP, a osteomielite também é uma das complicações da DF que pode ter como causa as infecções, principalmente por *Staphylococcus aureus* e a coexistência dessas complicações contribui para a piora das úlceras nessa população (13, 57), sugerindo relevância clínica dessa combinação no quadro das úlceras de pernas na DF.

No presente estudo, verificamos também que os níveis de leucócitos e plaquetas aumentados foram associados às úlceras de perna, confirmando resultados descritos anteriormente na literatura (58). A inflamação promove o recrutamento de células do sistema imunológico como os leucócitos (13) e seu aumento foi relacionado a algumas

complicações severas da DF como morte prematura, distúrbios vasculares como infartos, derrames e síndrome torácica aguda (59). As plaquetas também são importantes moduladores do sistema imunológico por atuarem tanto na homeostase do organismo quanto na sustentação de vias inflamatórias de pacientes com DF, as quais foram observadas em níveis elevados no estado estável da DF e em níveis ainda maiores em quadros de crises vaso-oclusiva (VOC) da doença (59). Um modelo experimental *in vitro* demonstrou que no processo de vaso-oclusão ocorre agregação plaquetária aos neutrófilos, promovendo a formação de agregados em microcanais sintéticos. Os autores sugerem que o mesmo evento pode ocorrer na microcirculação *in vivo*, o que prejudicaria o fluxo sanguíneo em microrregiões do corpo (60). Nesse mesmo experimento, Jimenez e colaboradores (2016) observaram que a agregação e o tempo de interação foram superiores entre neutrófilos e plaquetas do sangue de pacientes de genótipo SS da DF foram eventos mais frequentes do que no sangue dos controles de hemoglobina AA e esses episódios foram potencializados significativamente com endotoxinas, como o lipopolissacarídeo (LPS).

A microbiota compreende uma estrutura formada por diferentes microorganismos que constituem um determinado ambiente e seu conhecimento aprofundado foi possível com o surgimento do sequenciamento de última geração que alavancou a compreensão sobre a diversidade de comunidades microbianas (61, 62). Nesse sentido, nossa avaliação identificou diferenças significativa na estrutura composicional bacteriana com menor diversidade alfa para as amostras coletadas em úlceras de perna da DF em relação à pele adjacente às úlceras e à pele íntegra dos controles com DF sem histórico de úlceras de perna e dos participantes sem doenças crônicas. Esses achados foram convergentes ao único estudo que explorou o conhecimento da microbiota em úlceras de perna na DF, o qual avaliou amostras do leito da UP, região da borda da ferida e pele intacta desses pacientes e foi observado que a diversidade se alterava do leito das feridas em sentido à pele íntegra e em sentido contrário demonstrando associação negativa entre essas regiões (36).

Análise do GWAS mostrou associação significativa da diversidade alfa de feridas crônicas com os SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) *rs8031916* e *rs7236481*, sugerindo influência de fenótipos na seleção de linhagens bacterianas que constituem a diversidade da microbiota. Igualmente, o genótipo *rs8031916* foi relacionado com a diversidade beta (63). Em nossa análise, a diversidade beta das amostras de úlcera

mostrou significância em relação aos demais grupos avaliados, de forma consistente com os resultados obtidos em um estudo que avaliou a diversidade em diferentes feridas de traumas de acordo com as regiões no corpo, extremidades superiores e inferiores, e observaram diferenças entre essas regiões (64). Menor diversidade (alfa e beta) também foi encontrada num estudo de acompanhamento de úlceras de pé de diabéticos comparado à pele controle (35).

A análise da abundância relativa dos táxons em nosso estudo revelou predominância do filo Firmicutes, seguido de Proteobacteria e Actinobacteria nas úlceras perna dos pacientes com DF, consistente com os achados em úlceras de pressão crônicas e feridas (31, 65). Nas úlceras de pé de diabéticos e úlceras não relacionadas ao diabetes a abundância elevada foi do filo Proteobacteria (66). O filo Actinobacteria foi identificado em nosso estudo com a maior predominância na pele íntegra adjacente às úlceras e nos controles, compatível com os relatos da literatura para o microbioma de pele (61, 67-69).

Entre os táxons de maior abundância encontrados em nosso estudo, *Staphylococcus*, que pertence ao filo Firmicutes foi o gênero mais representativo encontrado nas úlceras de perna da DF, no entanto, nossa taxa ficou abaixo (35%) da relatada num levantamento realizado com úlceras de perna na DF que foi de 52%, enquanto a espécie *Staphylococcus aureus* assumiu a dominância no gênero representando 80% entre os estáfilos identificados nas feridas (36). Na análise filogenética não encontramos leituras do sequenciamento que identificassem a espécie *Staphylococcus aureus* em nossas amostras. A abundância de *Staphylococcus* nas úlceras foi significativamente maior nas úlceras em comparação com a pele íntegra adjacente. Em contrapartida, a abundância dos gêneros *Ralstonia* (Proteobacteria), *Corynebacterium* (Actinobacteria) e *Acinetobacter* (Proteobacteria) na pele íntegra adjacente dos pacientes com úlcera foi significativamente maior do que nas úlceras, exceto para o gênero *Ralstonia*. Nossos resultados foram consistentes com a mudança na diversidade relatada entre a pele íntegra e a dermatite atópica, em que os gêneros *Corynebacterium* e *Acinetobacter* apresentam redução da abundância na região das lesões e aumento de *Staphylococcus* (70).

O gênero *Staphylococcus* é um agente comensal abundante na microbiota de mucosa nasal humana que possui inúmeras espécies e subespécies, no entanto, dentre essas, a espécie *Staphylococcus aureus* é uma oportunista de importância clínica por estar envolvida em diversas condições crônicas de saúde (71). O *Staphylococcus aureus* foi

associado significativamente com a progressão de lesões da pele para carcinoma de células escamosas cutâneas, que é a segunda forma mais comum de câncer de pele (72). Cepas de *Staphylococcus aureus* também foram associadas negativamente às feridas, entre elas as lesões da dermatite atópica, por possuírem genes de resistência e/ou genes codificantes de endotoxinas que modulam a resposta imune inflamatória exacerbada com a ativação de células T que implicam no retardo da cicatrização de ferida (28, 73). Algumas cepas de *Staphylococcus aureus* também foram associadas significativamente na persistência das úlceras de pé em diabéticos (74).

Nos relatos de trabalhos que estudaram o leito das úlceras de perna da DF há presença dominante de micro-organismos anaeróbios facultativos com a predominância do gênero *Staphylococcus*, em especial a espécie *Staphylococcus aureus*, seguido de *Corynebacteria* e *Streptococcus*, além de anaeróbios obrigatórios como *Fingoldia*, *Propionibacterium*, *Porphyromonas* e *Anaerococcus* (36). O aeróbio *Alcaligenes* não foi identificado em nossas amostras, embora já tenha sido relatado nas úlceras de perna da DF, porém, em menor abundância, mas em abundância consistente nas úlceras de pé de diabéticos e úlceras não diabéticas (36, 66). *Corynebacterium striatum* assim como *Alcaligenes faecalis* são bactérias oportunistas presentes nas úlceras de pé de diabéticos, mas com características comensal e ambiental, respectivamente, sendo *Alcaligenes faecalis* considerada um contaminante nessas feridas e, apesar da considerável abundância nas úlceras de pé de diabéticos, *Corynebacterium striatum* e *Alcaligenes faecalis* não são comumente identificadas por métodos dependentes de cultura, fazendo a necessidade de uso de métodos moleculares (74).

Kalan e colaboradores observaram a influência dos isolados *Alcaligenes faecalis* e *Corynebacterium striatum* nas úlceras de pé de diabético na produção de biomarcadores como resposta inflamatória e revelaram que *Alcaligenes faecalis* em suas duas formas, as estruturas semelhantes a biofilme formada em cultivo *in vitro* e a fase planctônica induziram significativamente a expressão da citocina IL-8. No entanto, o aumento de G-CSF, GM-CSF, IL-6, TGF- α , TNF- α e IP-10 foi mais evidente na forma de biofilme do que na fase planctônica de *Alcaligenes faecalis*. Ambas as fases de *Alcaligenes faecalis* associadas à fase planctônica de *Corynebacterium striatum* foram responsáveis pelo aumento na expressão do fator de crescimento de plaquetas (PDGF-AB:BB), enquanto *Corynebacterium striatum* planctônico foi associado significativamente com a expressão de IL-1 α and IL-1RA (74).

Os biofilmes são frequentemente encontrados em feridas crônicas correspondendo a uma prevalência de 78% entre elas (75). A constituição dos biofilmes resume basicamente em estruturas poliméricas de componentes como lipídios, polissacarídeos, proteínas e glicoproteínas, e essas complexas estruturas podendo ser formadas por uma única espécie bacteriana ou fúngica, ou por uma vasta comunidade de micro-organismos comuns em feridas crônicas (76, 77). Com isso, biofilmes de outras espécies também foram correlacionadas com a não cicatrização de feridas como demonstrado no pioneiro experimento com modelos de camundongos com dislipidemia diabética, no qual tanto biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* quanto de *Staphylococcus aureus* estavam associados com o lento processo de cicatrização das feridas (78). Entretanto, o impacto negativo na cicatrização de feridas não se atribui exclusivamente ao biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*, pois estruturas de virulência podem também estar envolvidas nesse processo (78).

Pseudomonas foi o quinto gênero com maior abundância entre os táxons identificados em nossa análise, e na pele adjacente ele foi encontrado em maior abundância do que nas úlceras de perna na DF, embora sem significância. O gênero *Pseudomonas* abriga uma ampla diversidade genética que o caracteriza como um dos maiores gêneros bacterianos, constituído por centenas de espécies já descritas (79). A espécie *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno oportunista de relevância nosocomial, pois, além da sua capacidade de síntese de biofilme, ainda possui resistência a diversas drogas (80). A abundância de *Pseudomonas aeruginosa*, assim como a de *Staphylococcus epidermidis* em feridas crônicas foram relacionadas significativamente ao genótipo rs8031916, sendo notado uma diferença na composição estrutural da microbiota, com menor diversidade observada para *Pseudomonas aeruginosa* e diversidade mais heterogênea para *Staphylococcus epidermidis* (63).

Alguns patógenos da microbiota das úlceras de perna foram associados significativamente a alguns desfechos clínicos importantes da DF, como é o exemplo do gênero *Porphyromonas* que teve sua abundância correlacionada negativamente com os níveis de hemoglobina, bem como *Fingoldia* esteve para a contagem de células B nessas feridas, enquanto a abundância dos gêneros *Anaerococcus*, *Corynebacterium* e *Porphyromonas* estiveram associadas às feridas de maior tamanho da DF (36). O gênero *Bacteroides* também foi associado com feridas de amputação de membro inferior em pacientes diabéticos e, além disso, a maior abundância de *Staphylococcus*, *Prevotella* e

Bilophila também foram associados às úlceras de pé de diabéticos de menor tamanho (81). A maior abundância do filo Actinobacteria no estado glicêmico também foi relatado para feridas não diabéticas, embora não tenha encontrado diferenças na diversidade entre os estados, glicêmico e não glicêmico (66). Diante desses relatos da literatura sobre feridas, ressalta-se a necessidade de estudos futuros explorando a associação de comunidades bacterianas e os desfechos clínicos da Doença Falciforme

Apesar de propormos um universo amostral mínimo probabilístico para a avaliação dos objetivos, o delineamento amostral foi uma das limitações encontradas no presente estudo, pois não foram previstas as perdas que aconteceram durante a recuperação do genoma bacteriano. As perdas levaram à redução do número amostral e, conseqüentemente, o poder estatístico da análise para identificar associações. Além disso, encontramos somente um estudo prévio de microbiota das úlceras de perna da população de pacientes com DF, e portanto baseamos comparações dos nossos resultados com estudos de feridas em outras populações, sobretudo as úlceras do pé de diabético, que possui extensa literatura, com uma compreensão robusta da microbiota desses casos.

Por outro lado, a avaliação por metagenômica, que não foi feita no presente trabalho, proporciona análise taxonômica aprofundada por dispor de leituras longas no sequenciamento, sendo possível a diferenciação em espécies, como é o exemplo do gênero *Staphylococcus*, visto que ele foi o gênero mais abundante nas úlceras de perna da DF e na pele, além de sua relevância clínica relacionada à resistência aos antimicrobianos. Outros componentes comumente identificados na metagenômica são os vírus, os fungos e os fagos, sendo esse último fundamental, pois alteram a composição e abundância de comunidades bacterianas (82). Acrescentamos ainda que a metabolômica, que também não foi objeto do estudo atual, complementa a compreensão de estudos acerca do microbioma, pois investiga a relação de micro-organismos com os metabólitos identificados, direcionando vias ou funções especializadas no ambiente das úlceras de perna da DF. Portanto, estudos posteriores que contemplem estes aspectos serão essenciais para uma investigação detalhada do microbioma em úlceras de perna da DF, pois contribuirão para a compreensão e fornecerão informações sobre as funções que exercem esses micro-organismos no desenvolvimento e manutenção dessa complicação.

Por outro lado, este é o primeiro estudo que compara a microbiota das úlceras de perna de pacientes com DF à pele íntegra de controles. Os nossos resultados fornecem informações mais aprofundadas da microbiota nas úlceras de perna nesses pacientes, a

partir de técnicas moleculares, e ainda poderá subsidiar informações para estudos direcionados na identificação de biomarcadores relacionados a essa complicação na DF.

Concluimos com os resultados obtidos no presente estudo que há diferenças significativas na diversidade alfa e beta entre as úlceras de perna da DF e a pele íntegra dos controles. A abundância de *Staphylococcus* foi significativamente maior nas úlceras em relação à pele íntegra adjacente, enquanto a abundância de *Ralstonia*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter* e *Pseudomonas* foi significativamente menor nas úlceras em relação a pele íntegra dos controles. Ainda, há associação significativa do maior uso do sabonete antisséptico, aumento dos marcadores laboratoriais leucócitos e plaquetas, além de história de osteomielite para os pacientes com úlceras de perna em relação aos pacientes DF sem histórico de úlceras. Acreditamos que os achados do presente estudo podem contribuir para melhorias nos protocolos de prevenção, diagnóstico e tratamento das úlceras de perna nos pacientes DF.

7 REFERÊNCIAS

1. Herrick JB. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. 1910. *Yale J Biol Med.* 2001;74(3):179-84.
2. EMMEL VE. A STUDY OF THE ERYTHROCYTES IN A CASE OF SEVERE ANEMIA WITH ELONGATED AND SICKLE-SHAPED RED BLOOD CORPUSCLES. *Arch Intern Med*1917. p. 586-NP.
3. Pauling L, Itano HA, et al. Sickle cell anemia, a molecular disease. *Science.* 1949;109(2835):443.
4. Savitt TL, Goldberg MF. Herrick's 1910 case report of sickle cell anemia. The rest of the story. *Jama.* 1989;261(2):266-71.
5. Perutz MF, Mitchison JM. State of haemoglobin in sickle-cell anaemia. *Nature.* 1950;166(4225):677-9.
6. Ingram VM. A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin. *Nature.* 1956;178(4537):792-4.
7. INGRAM VM. Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. *Nature.* 1957;180(4581):326-8.
8. Perutz RR, Liquori AM, Eirich F. X-ray and solubility studies of the haemoglobin of sickle-cell anaemia patients. *Nature.* 1951;167(4258):929-31.
9. Döbler J, Bertles JF. The physical state of hemoglobin in sickle-cell anemia erythrocytes in vivo. *J Exp Med.* 1968;127(4):711-4.
10. Piel FB, Steinberg MH, Rees DC. Sickle Cell Disease. *N Engl J Med.* 2017;376(16):1561-73.
11. Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, et al. Sickle cell disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2018;4:18010.
12. Gonçalves MS, Queiroz IL, Cardoso SA, Zanetti A, Strapazoni AC, Adorno E, et al. Interleukin 8 as a vaso-occlusive marker in Brazilian patients with sickle cell disease. *Braz J Med Biol Res.* 2001;34(10):1309-13.
13. Minniti CP, Eckman J, Sebastiani P, Steinberg MH, Ballas SK. Leg ulcers in sickle cell disease. *Am J Hematol.* 2010;85(10):831-3.
14. Koshy M, Entsuaeh R, Koranda A, Kraus AP, Johnson R, Bellvue R, et al. Leg ulcers in patients with sickle cell disease. *Blood.* 1989;74(4):1403-8.
15. AlDallal SM. Mini review: leg ulcers - a secondary complication of sickle cell disease. *Int J Gen Med.* 2019;12:279-82.
16. Gouveia ME, Soares NB, Santoro MSA, de Azevedo FCM. Hyperhemolysis syndrome in a patient with sickle cell anemia: case report. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy.* 2015;37(4):266-8.
17. Bowler PG, Duerden BI, Armstrong DG. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(2):244-69.
18. Belisário AR, Mendes-Oliveira F, de Souza VR, Bolina-Santos E, Mendes FG, Moreno EC, et al. Association between inflammatory molecules, nitric oxide metabolites and leg ulcers in individuals with sickle cell anemia. *Hematol Transfus Cell Ther.* 2022;44(2):169-76.
19. Ladizinski B, Bazakas A, Mistry N, Alavi A, Sibbald RG, Salcido R. Sickle cell disease and leg ulcers. *Adv Skin Wound Care.* 2012;25(9):420-8.
20. Raffetto JD, Ligi D, Maniscalco R, Khalil RA, Mannello F. Why Venous Leg Ulcers Have Difficulty Healing: Overview on Pathophysiology, Clinical Consequences, and Treatment. *J Clin Med.* 2020;10(1).

21. Cumming V, King L, Fraser R, Serjeant G, Reid M. Venous incompetence, poverty and lactate dehydrogenase in Jamaica are important predictors of leg ulceration in sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 2008;142(1):119-25.
22. Olatunya OS, Albuquerque DM, Adekile AD, Costa FF. Evaluation of sociodemographic, clinical, and laboratory markers of sickle leg ulcers among young nigerians at a tertiary health institution. *Niger J Clin Pract*. 2018;21(7):882-7.
23. Neto JP, Lyra IM, Reis MG, Goncalves MS. The association of infection and clinical severity in sickle cell anaemia patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2011;105(3):121-6.
24. Haftek M, Roy DC, Liao IC. ARTICLE: Evolution of Skin Barrier Science for Healthy and Compromised Skin. *J Drugs Dermatol*. 2021;20(4):s3-s9.
25. Chen YE, Fischbach MA, Belkaid Y. Skin microbiota-host interactions. *Nature*. 2018;553(7689):427-36.
26. Mueller NT, Bakacs E, Combellick J, Grigoryan Z, Dominguez-Bello MG. The infant microbiome development: mom matters. *Trends Mol Med*. 2015;21(2):109-17.
27. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(26):11971-5.
28. Byrd AL, Belkaid Y, Segre JA. The human skin microbiome. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(3):143-55.
29. Dorrestein PC, Gallo RL, Knight R. Microbial Skin Inhabitants: Friends Forever. *Cell*. 2016;165(4):771-2.
30. Lax S, Sangwan N, Smith D, Larsen P, Handley KM, Richardson M, et al. Bacterial colonization and succession in a newly opened hospital. *Sci Transl Med*. 2017;9(391).
31. Verbanic S, Kim CY, Deacon JM, Chen IA. Improved single-swab sample preparation for recovering bacterial and phage DNA from human skin and wound microbiomes. *BMC Microbiol*. 2019;19(1):214.
32. Cheng J, Hata T. Dysbiosis of the Skin Microbiome in Atopic Dermatitis. *Skin Microbiome Handbook2020*. p. 185-201.
33. Travis J, Malone M, Hu H, Baten A, Johani K, Huygens F, et al. The microbiome of diabetic foot ulcers: a comparison of swab and tissue biopsy wound sampling techniques using 16S rRNA gene sequencing. *BMC Microbiol*. 2020;20(1):163.
34. Jneid J, Lavigne JP, La Scola B, Cassir N. The diabetic foot microbiota: A review. *Human Microbiome Journal*. 2017;5-6:1-6.
35. Gardiner M, Vicaretti M, Sparks J, Bansal S, Bush S, Liu M, et al. A longitudinal study of the diabetic skin and wound microbiome. *PeerJ*. 2017;5:e3543.
36. Byeon J, Blizinsky KD, Persaud A, Findley K, Lee JJ, Buscetta AJ, et al. Insights into the skin microbiome of sickle cell disease leg ulcers. *Wound Repair Regen*. 2021;29(5):801-9.
37. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Author Correction: Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol*. 2019. p. 1091.
38. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*. 2016;13(7):581-3.

39. Janssen S, McDonald D, Gonzalez A, Navas-Molina JA, Jiang L, Xu ZZ, et al. Phylogenetic Placement of Exact Amplicon Sequences Improves Associations with Clinical Information. *mSystems*. 2018;3(3).
40. Mirarab S, Nguyen N, Warnow T. SEPP: SATé-enabled phylogenetic placement. *Pac Symp Biocomput*. 2012:247-58.
41. Faith DP. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biological Conservation*. 1992;61(1):1-10.
42. Lozupone CA, Hamady M, Kelley ST, Knight R. Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(5):1576-85.
43. Lozupone C, Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(12):8228-35.
44. Shannon CE. A Mathematical Theory of Communication. *Bell System Technical Journal*. 1948;27(3):379-423.
45. Simpson EH. Measurement of Diversity. *Nature*. 1949;163(4148):688-.
46. Chao A. Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. *Scandinavian Journal of Statistics*. 1984;11(4):265-70.
47. Bray JR, Curtis JT. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs*. 1957;27(4):325-49.
48. Navas-Molina JA, Peralta-Sánchez JM, González A, McMurdie PJ, Vázquez-Baeza Y, Xu Z, et al. Advancing our understanding of the human microbiome using QIIME. *Methods Enzymol*. 2013;531:371-444.
49. Bokulich NA, Kaehler BD, Rideout JR, Dillon M, Bolyen E, Knight R, et al. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*. 2018;6(1):90.
50. McDonald D, Price MN, Goodrich J, Nawrocki EP, DeSantis TZ, Probst A, et al. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *Isme j*. 2012;6(3):610-8.
51. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*. 1995;57(1):289-300.
52. Mandal S, Van Treuren W, White RA, Eggesbø M, Knight R, Peddada SD. Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. *Microb Ecol Health Dis*. 2015;26:27663.
53. Spira JAO, Borges EL, Guedes ACM, Andrade PGR, Lima V. Prevalence of people with sickle cell disease and leg ulcers in Brazil: Socioeconomic and clinical overview. *PLoS One*. 2022;17(9):e0274254.
54. Lacerda FKL, Ferreira SL, Nascimento ER, Costa DO, Cordeiro RC. Déficits de autocuidado em mulheres com úlceras de perna e doença falciforme. *Rev Bras Enferm* 2018. p. 78-85.
55. Khatib AME, Hayek SN. Leg ulcers in sickle cell patients: management challenges. *Chronic Wound Care Management and Research*; 2016. p. 157–61.
56. Monfort JB, Senet P. Leg Ulcers in Sickle-Cell Disease: Treatment Update. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2020;9(6):348-56.
57. Al Farii H, Zhou S, Albers A. Management of Osteomyelitis in Sickle Cell Disease: Review Article. *J Am Acad Orthop Surg Glob Res Rev*. 2020;4(9):e20.00002-10.

58. Babalola OA, Ogunkeyede A, Odetunde AB, Fasola F, Oni AA, Babalola CP, et al. Haematological indices of sickle cell patients with chronic leg ulcers on compression therapy. *Afr J Lab Med*. 2020;9(1):1037.
59. Zhang D, Xu C, Manwani D, Frenette PS. Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. *Blood*. 2016;127(7):801-9.
60. Jimenez MA, Kato GJ, Sundd P. Neutrophil-Platelet Aggregation Enables Vaso-Occlusion in Sickle Cell Disease. *Blood*. 2016;128(22):1295.
61. Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*. 2011;9(4):244-53.
62. De Pessemier B, Grine L, Debaere M, Maes A, Paetzold B, Callewaert C. Gut-Skin Axis: Current Knowledge of the Interrelationship between Microbial Dysbiosis and Skin Conditions. *Microorganisms*. 2021;9(2).
63. Tipton CD, Wolcott RD, Sanford NE, Miller C, Pathak G, Silzer TK, et al. Patient genetics is linked to chronic wound microbiome composition and healing. *PLOS Pathogens*. 2020;16(6):e1008511.
64. Hannigan GD, Hodkinson BP, McGinnis K, Tyldsley AS, Anari JB, Horan AD, et al. Culture-independent pilot study of microbiota colonizing open fractures and association with severity, mechanism, location, and complication from presentation to early outpatient follow-up. *J Orthop Res*. 2014;32(4):597-605.
65. Ammons MC, Morrissey K, Tripet BP, Van Leuven JT, Han A, Lazarus GS, et al. Biochemical association of metabolic profile and microbiome in chronic pressure ulcer wounds. *PLoS One*. 2015;10(5):e0126735.
66. Jnana A, Muthuraman V, Varghese VK, Chakrabarty S, Murali TS, Ramachandra L, et al. Microbial Community Distribution and Core Microbiome in Successive Wound Grades of Individuals with Diabetic Foot Ulcers. *Appl Environ Microbiol*. 2020;86(6).
67. Johnson TR, Gómez BI, McIntyre MK, Dubick MA, Christy RJ, Nicholson SE, et al. The Cutaneous Microbiome and Wounds: New Molecular Targets to Promote Wound Healing. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9).
68. Carmona-Cruz S, Orozco-Covarrubias L, Sáez-de-Ocariz M. The Human Skin Microbiome in Selected Cutaneous Diseases. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12:834135.
69. Kim J-H, Son S-M, Park H, Kim BK, Choi IS, Kim H, et al. Taxonomic profiling of skin microbiome and correlation with clinical skin parameters in healthy Koreans. *Scientific Reports*. 2021;11(1):16269.
70. Kim JE, Kim HS. Microbiome of the Skin and Gut in Atopic Dermatitis (AD): Understanding the Pathophysiology and Finding Novel Management Strategies. *J Clin Med*. 2019;8(4).
71. Lee AS, de Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4:18033.
72. Wood DLA, Lachner N, Tan JM, Tang S, Angel N, Laino A, et al. A Natural History of Actinic Keratosis and Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Microbiomes. *mBio*. 2018;9(5).
73. Ortega E, Abriouel H, Lucas R, Gálvez A. Multiple roles of *Staphylococcus aureus* enterotoxins: pathogenicity, superantigenic activity, and correlation to antibiotic resistance. *Toxins (Basel)*. 2010;2(8):2117-31.
74. Kalan LR, Meisel JS, Loesche MA, Horwinski J, Soaita I, Chen X, et al. Strain- and Species-Level Variation in the Microbiome of Diabetic Wounds Is Associated with Clinical Outcomes and Therapeutic Efficacy. *Cell Host Microbe*. 2019;25(5):641-55.e5.

75. Malone M, Bjarnsholt T, McBain AJ, James GA, Stoodley P, Leaper D, et al. The prevalence of biofilms in chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of published data. *J Wound Care*. 2017;26(1):20-5.
76. Monroe D. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLOS Biology*. 2007;5(11):e307.
77. Percival SL, McCarty SM, Lipsky B. Biofilms and Wounds: An Overview of the Evidence. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2015;4(7):373-81.
78. Pouget C, Dunyach-Remy C, Pantel A, Schuldiner S, Sotto A, Lavigne JP. Biofilms in Diabetic Foot Ulcers: Significance and Clinical Relevance. *Microorganisms*. 2020;8(10).
79. Girard L, Lood C, Höfte M, Vandamme P, Rokni-Zadeh H, van Noort V, et al. The Ever-Expanding *Pseudomonas* Genus: Description of 43 New Species and Partition of the *Pseudomonas putida* Group. *Microorganisms*. 2021;9(8).
80. Qin S, Xiao W, Zhou C, Pu Q, Deng X, Lan L, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2022;7(1):199.
81. Mudrik-Zohar H, Carasso S, Gefen T, Zalmanovich A, Katzir M, Cohen Y, et al. Microbiome Characterization of Infected Diabetic Foot Ulcers in Association With Clinical Outcomes: Traditional Cultures Versus Molecular Sequencing Methods. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2022;12.
82. de Jonge PA, Wortelboer K, Scheithauer TPM, van den Born B-JH, Zwinderman AH, Nobrega FL, et al. Gut virome profiling identifies a widespread bacteriophage family associated with metabolic syndrome. *Nature Communications*. 2022;13(1):3594.

8 APÊNDICE A – FORMULÁRIOS I AO IV

FORMULÁRIO I – Informações demográficas					
Nº Questão	Pergunta	Nome da Variável	Variável	Opções de resposta	Intervalo
1	Identificação do paciente	ID	Texto com letra maiúscula	-	1-60
2	Prontuário	PRONTUARIO	Numérica	-	-
3	Telefone	TEL	Numérica	-	-
4	Sexo	SEXO	Número	0. Feminino 1. Masculino	0-1
5	Data de nascimento	DATANASC	Data	-	-
6	Idade	IDADE	Numérica	-	-
7	Na sua opinião, qual a cor da sua pele?	COR	Numérica	0. Branca 1. Preta/Negra 2. Asiática/Amarelo 3. Parda/Morena 4. Indígena 7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-4; 7, 8, 9
8	Até que ano você estudou ou está estudando?	SERIESTUD	Numérica	0. Nunca fui à escola 1. Alfabetização de adultos 2. Ensino Fundamental básico (1ª a 5ª) 3. Ensino Fundamental (6ª a 9ª) 4. Ensino Médio 5. Curso Técnico 6. Curso Superior 7. Pós-graduação 77. Não sabe 88. Não quis responder 99. Não se aplica	0-7; 77, 88, 99
9	Qual é seu estado civil atual?	ESTADCVIL	Numérica	0. Solteiro 1. Casado ou morando juntos 2. Separado / Divorciado / Viúvo 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-2; 8, 9
10	Qual é a renda mensal da sua família?	RENDA	Numérica	0. Menos que 1 salário mínimo (até R\$880,00) 1. Entre 1 salário mínimo a 2 salários mínimos (até R\$1.760,00)	0-4; 7, 8, 9

				2. Maior que 2 salários mínimos até 4 salários mín. (até R\$3.520,00) 3. Maior que 4 salários mínimos até 8 salários mín. (até 7.040,00) 4. Maior 8 salários mínimos (acima de R\$7.040,00) 7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	
11	Você recebe algum tipo de benefício social?	BENESOCIAL	Numérica	0. Não 1. Sim 7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-1; 7, 8, 9
12	Quantas pessoas moram na sua casa, incluindo você	PESSOACASA	Numérica	77. Não sabe 88. Não quis responder 99. Não se aplica	7, 8, 9
13	Você tem plano de saúde?	PLANOSAUDE	Numérica	0. Não 1. Sim 7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-1; 7, 8, 9
14	Atualmente você está trabalhando?	TRABALHAND	Numérica	0. Não 1. Sim 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-1; 8, 9
15	Nos últimos 30 dias, faltou ao trabalho por causa da úlcera de perna?	FALTOURAB	Numérica	0. Não 1. Sim 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-1; 8, 9
16	Nos últimos 30 dias, quantos dias faltou ao trabalho por causa da úlcera de perna?	DIASTRAB	Numérica	99. Não se aplica	1-30;99
17	Atualmente você está estudando?	ESTUDANDO	Numérica	0. Não 1. Sim 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-1; 8, 9
18	Nos últimos 30 dias, faltou a escola por causa da úlcera de perna?	FALTOUSCOL	Numérica	0. Não 1. Sim 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-1; 8, 9
19	Nos últimos 30 dias, quantos dias	DIASESCOL	Numérica	99. Não se aplica	1-30;99

	faltou a escola por causa da úlcera de perna?				
20	Você toma banho todos os dias da semana?	BANHOTODOS	Numérica	0. Não 1. Sim 7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-1; 7, 8, 9
21	Se sim, quantos banhos em média você toma por dia?	BANHPORDIA	Numérica	0. 1 banho 1. 2 banhos 2. Mais de 2 banhos 7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-2; 7, 8, 9
22	Quantos banhos em média você toma por semana?	BANHSEMANA	Numérica	0. Menos de 7 banhos 1. 7 a 10 banhos 2. 11 a 14 banhos 3. Mais de 14 banhos 7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-3; 7, 8, 9
23	Você utiliza sabonete para o banho?	SABONBAHO	Numérica	0. Não 1. Sim (sempre) 2. Às vezes 7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-2; 7, 8, 9
<i>Se sim, qual (is) tipos (s) de sabonete (s)?</i>					
24	Comum	COMUM	Numérica	0. Não 1. Sim 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-1; 8, 9
25	Antisséptico	ANTISSEPT	Numérica	0. Não 1. Sim 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-1; 8, 9
26	Outros	OUTROS	Texto	-	
27	Nos últimos 15 dias, quantos dias você usou sabonete no banho?	DIASSABON	Numérica	77. Não sabe 88. Não quis responder 99. Não se aplica	1-15;99
28	Você utiliza hidratante corporal?	UTIHIDRAT	Numérica	0. Não 1. Sim (sempre) 2. Às vezes 7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-1; 7, 8, 9
<i>Se sim, qual (is) tipo(s) de hidratante(s)</i>					
29	Comum	COMUMHID	Numérica	0. Não 1. Sim 8. Não quis responder	0-1; 9

				9. Não se aplica	
30	Outros	OUTROSHID	Texto	-	
31	Nos últimos 15 dias, quantos dias você usou hidratante corporal?	HIDRAT	Numérica	77. Não sabe 88. Não quis responder 99. Não se aplica	1-15;99
Para maiores de 18 anos					
32	Você já fumou alguma vez na vida?	FUMOU	Numérica	0. Não 1. Sim (sempre) 2. Às vezes 7. Não sabe 8. Não quis responder	0-2; 7, 8,
33	Você já fumou pelo menos 100 cigarros na vida?	CIGARROS	Numérica	0. Não 1. Sim (sempre) 2. Às vezes 7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-2; 7, 8, 9
34	Nos últimos 15 dias, quantos dias você fumou cigarros?	DIASFUMOU	Numérica	77. Não sabe 88. Não quis responder 99. Não se aplica	1-15; 77, 88, 99
35	Você já consumiu bebida alcoólica alguma vez na vida?	BEBIDA	Numérica	0. Não 1. Sim (sempre) 2. Às vezes 7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-2; 7, 8,
36	Nos últimos 15 dias, quantos dias você consumiu bebida alcoólica?	DIABEBIDA	Numérica	77. Não sabe 88. Não quis responder 99. Não se aplica	1-15; 77, 88, 99
37	Data da entrevista	DATAENTREV	Data	-	-
FORMULÁRIO II – Histórico das úlceras					
1	Identificação	ID	Texto com letra maiúscula	-	-
2	Você tem úlcera de perna, atualmente?	TEMULCER	Numérica	0. Não 1. Sim	0-1
3	No momento, quantas úlceras de	QUANT	Numérica	-	1-3;7

	perna você tem?				
<i>Há quanto tempo você está com essa úlcera?</i>					
4	Úlcera 1	TEMP1	Numérica	0. Menos de 1 mês 1. 1-3 meses 2. 3-6 meses 3. 6-12 meses 4. 1-5 anos 5. Mais de 5 anos 7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-5-; 7, 8, 9
5	Úlcera 2	TEMP2	Numérica	0. Menos de 1 mês 1. 1-3 meses 2. 3-6 meses 3. 6-12 meses 4. 1-5 anos 5. Mais de 5 anos 7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-5, 7, 8, 9
6	Úlcera 3	TEMP3	Numérica	0. Menos de 1 mês 1. 1-3 meses 2. 3-6 meses 3. 6-12 meses 4. 1-5 anos 5. Mais de 5 anos 7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-5, 7, 8, 9
7	Úlcera 1	DOR1	Numérica	0. Não 1. Sim (sempre) 2. Às vezes 7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-2, 7, 8, 9
8	Úlcera 2	DOR2	Numérica	0. Não 1. Sim (sempre) 2. Às vezes 7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-2, 7, 8, 9
9	Úlcera 3	DOR3	Numérica	0. Não 1. Sim (sempre) 2. Às vezes 7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-2, 7, 8, 9
<i>O que causou a úlcera?</i>					
10	Úlcera 1	CAUSOU1	Numérica	0. Acidente/Queda/Batida 1. Picada de inseto 2. Surgiu espontaneamente 3. Calçados 4. Outros	0-4, 7, 8, 9

				7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	
11	Úlcera 2	CAUSOU2	Numérica	0. Acidente/Queda/Batida 1. Picada de inseto 2. Surgiu espontaneamente 3. Calçados 4. Outros 7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-4, 7, 8, 9
12	Úlcera 3	CAUSOU3	Numérica	0. Acidente/Queda/Batida 1. Picada de inseto 2. Surgiu espontaneamente 3. Calçados 4. Outros 7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-4, 7, 8, 9
<i>Se outros, especificar:</i>					
13	Úlcera 1	OUTRCAUSA1	Texto	9. Não se aplica	9
14	Úlcera 2	OUTRCAUSA2	Texto	9. Não se aplica	9
15	Úlcera 3	OUTRCAUSA3	Texto	9. Não se aplica	9
16	Nos últimos 15 dias, você usou algum medicamento para tratar da úlcera?	USOUMEDIC	Numérica	0. Não 1. Sim 7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-1; 7, 8, 9
<i>Se sim, qual (is) o (s) nome (s) do (s) medicamento (s)?</i>					
17	Medicamento 1	NOMEUSOU1	Texto	7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	7, 8, 9
18	Medicamento 2	NOMEUSOU2	Texto	7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	7, 8, 9
19	Qual tipo de medicamento você utilizou?	TIPOMEDIC1	Numérica	0. Via oral 1. Na veia 2. Uso Tópico 7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-2; 7, 8, 9
20	Qual tipo de medicamento você utilizou?	TIPOMEDIC2	Numérica	0. Via oral 1. Na veia 2. Uso Tópico 7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-2; 7, 8, 9

21	Nos últimos 15 dias, você precisou procurar atendimento médico para se medicar por causa da úlcera de perna?	ATENDMEDIC	Numérica	0. Não 1. Sim 7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-1; 7, 8, 9
22	Se sim, onde procurou atendimento?	ONDEATEND	Numérica	0. Posto de saúde 1. Unidade de Pronto Atendimento 2. Hemominas 3. Outros 7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-3; 7, 8, 9
23	Se outros, especificar	OUTROLOCAL	Texto	7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	7, 8, 9
24	O médico prescreveu medicação?	MEDICOPRESC	Numérica	0. Não 1. Sim 7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-1; 7, 8, 9
<i>O médico prescreveu medicação?</i>					
25	Medicamento 1	MEDICAMEN1	Texto	7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	7, 8, 9
26	Medicamento 2	MEDICAMEN2	Texto	7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	7, 8, 9
27	Medicamento 3	MEDICAMEN3	Texto	7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	7, 8, 9
28	Qual foi o tipo de medicamento prescrito pelo médico?	MED1	Numérica	0. Via oral 1. Na veia 2. Uso tópico (Pomada ou creme) 7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-2; 7, 8, 9
29	Qual foi o tipo de medicamento prescrito pelo médico?	MED2	Numérica	0. Via oral 1. Na veia 2. Uso tópico (Pomada ou creme) 7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-2; 7, 8, 9
30	Qual foi o tipo de medicamento prescrito pelo médico?	MED3	Numérica	0. Via oral 1. Na veia 2. Uso tópico (Pomada ou creme) 7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-2; 7, 8, 9

31	Nos últimos 15 dias, você utilizou receita caseira para tratar a úlcera?	RECEITACAS	Numérica	0. Não 1. Sim 7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-1; 7, 8, 9
<i>Se sim, especificar:</i>					
32	Especificar 1	CASEIRA1	Texto	7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	7, 8, 9
33	Especificar 2	CASEIRA2	Texto	7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	7, 8, 9
<i>A partir de agora, vamos considerar apenas úlceras passadas</i>					
34	Você já teve alguma outra úlcera de perna?	TEVEUL	Numérica	0. Não 1. Sim	0-1
35	Se sim, a úlcera antiga surgiu em qual região da perna?	ANTIREGIA	Numérica	0. Calcâneo 1. Tibial anterior 2. Tibial anterior + Panturrilha (Perna distal) 3. Maléolo lateral 4. Maléolo medial 5. Antero superior (Dorso do pé) 6. Outros 7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-6; 7, 8, 9
36	Se outros, especificar	OUTRAREGIA	Texto	7. Não sabe 9. Não se aplica	7, 9
37	Há quanto tempo você teve a última úlcera de perna?	TEMPOULTIM		0. Menos de 3 mês 1. 3-6 meses 2. 6-12 meses 3. Mais de 1 ano 7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-3; 7, 8, 9
38	Quanto tempo durou a última úlcera de perna?	DUROUULTIM	Numérica	0. Menos de 3 meses 1. 3-6 meses 2. 6-12 meses 3. Mais de 1 ano 7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-3; 7, 8, 9
39	Data da entrevista	DATAENTREV	Data	-	-
FORMULÁRIO III – Características das úlceras					
1	Identificação do paciente	ID	Texto com letra maiúscula	-	1-60

2	Iniciais	INICIAIS	Texto com letra maiúscula	-	-
3	Prontuário	PRONTUARIO	Numérica	-	-
4	Número de úlceras atuais	NULCER	Numérica	1-3 9. Não se aplica	1-3; 9
5	Identificação da amostra da pele íntegra	IDAPE1	Texto	-	-
5.1		IDAPE2	Texto	-	-
5.2		IDAPE3	Texto	-	-
6	Identificação da amostra da úlcera de perna	IDAUL1	Texto	-	-
6.1		IDAUL2	Texto	-	-
6.2		IDAUL3	Texto	-	-
<i>Qual perna se encontra a úlcera?</i>					
7	Úlcera 1	PERNAULC1	Numérica	0. Direita 1. Esquerda 9. Não se aplica	1-0; 9
8	Úlcera 2	PERNAULC2	Numérica	0. Direita 1. Esquerda 9. Não se aplica	1-0; 9
9	Úlcera 3	PERNAULC3	Numérica	0. Direita 1. Esquerda 9. Não se aplica	1-0; 9
<i>Qual é o tipo de úlcera?</i>					
10	Úlcera 1	TIPOUL1	Numérica	0. Sem perda de pele: Eritema de pele escurecida que pode apresentar calor, edema e até endurecimento do local. 1. Perda da pele parcial envolvendo a epiderme e/ou a derme. A úlcera pode ser bolhosa, abrasiva ou cratera rasa. 2. Perda total da pele envolvendo danos ou necrose do tecido subcutâneo podendo apresentar complicações do tecido adjacente. 3. Perda total da pele com destruição extensa, com tecido	0-3; 9

				necrótico ou danos aos músculos, ossos, articulações ou tendões. 9. Não se aplica	
11	Úlcera 2	TIPOUL2	Numérica	0. Sem perda de pele: Eritema de pele escurecida que pode apresentar calor, edema e até endurecimento do local. 1. Perda da pele parcial envolvendo a epiderme e/ou a derme. A úlcera pode ser bolhosa, abrasiva ou cratera rasa. 2. Perda total da pele envolvendo danos ou necrose do tecido subcutâneo podendo apresentar complicações do tecido adjacente. 3. Perda total da pele com destruição extensa, com tecido necrótico ou danos aos músculos, ossos, articulações ou tendões. 9. Não se aplica	0-3; 9
12	Úlcera 3	TIPOUL3	Numérica	0. Sem perda de pele: Eritema de pele escurecida que pode apresentar calor, edema e até endurecimento do local. 1. Perda da pele parcial envolvendo a epiderme e/ou a derme. A úlcera pode ser bolhosa, abrasiva ou cratera rasa. 2. Perda total da pele envolvendo danos ou necrose do tecido subcutâneo podendo apresentar complicações do tecido adjacente. 3. Perda total da pele com destruição extensa, com tecido necrótico ou danos aos músculos, ossos, articulações ou tendões. 9. Não se aplica	0-3; 9
<i>Qual o tamanho da úlcera (comprimento X largura)</i>					
13	Tipo de borda úlcera 1	TAMANHO1	Numérica	-	-

14	Tipo de borda úlcera 2	TAMANHO2	Numérica	-	-
15	Tipo de borda úlcera 3	TAMANHO3	Numérica	-	-
<i>Qual é o tipo de borda?</i>					
16		TIPÓBORDA1	Numérica	0. Regular 1. Irregular 9. Não se aplica	0-1; 9
17		TIPÓBORDA2	Numérica	0. Regular 1. Irregular 9. Não se aplica	0-1; 9
18		TIPÓBORDA3	Numérica	0. Regular 1. Irregular 9. Não se aplica	0-1; 9
<i>A úlcera está localizada em qual região da perna?</i>					
19	Localização úlcera 1	LOCUL1	Numérica	0. Calcâneo 1. Tibial anterior 2. Tibial anterior + Panturrilha (Perna distal) 3. Maléolo lateral 4. Maléolo medial 5. Antero superior (Dorso do pé) 6. Outros 7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-9
20	Localização úlcera 2	LOCUL2	Numérica	0. Calcâneo 1. Tibial anterior 2. Tibial anterior + Panturrilha (Perna distal) 3. Maléolo lateral 4. Maléolo medial 5. Antero superior (Dorso do pé) 6. Outros 7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-9
21	Localização úlcera 3	LOCUL3	Numérica	0. Calcâneo 1. Tibial anterior 2. Tibial anterior + Panturrilha (Perna distal) 3. Maléolo lateral 4. Maléolo medial 5. Antero superior (Dorso do pé) 6. Outros 7. Não sabe 8. Não quis responder 9. Não se aplica	0-9
<i>Se outros, especifique qual:</i>					

22	Úlcera 1	ULCERA1	Texto	9. Não se aplica	9
23	Úlcera 2	ULCERA2	Texto	9. Não se aplica	9
24	Úlcera 3	ULCERA3	Texto	9. Não se aplica	9
<i>Foi realizado registro fotográfico da úlcera?</i>					
25	Foto úlcera 1	FOTO1	Numérica	0. Não 1. Sim 9. Não se aplica	0-1; 9
26	Foto úlcera 2	FOTO2	Numérica	0. Não 1. Sim 9. Não se aplica	0-1; 9
27	Foto úlcera 3	FOTO3	Numérica	0. Não 1. Sim 9. Não se aplica	0-1; 9
28	Data da Entrevista	DATAENTREV	Data	dd/mm/aaaa	-
FORMULÁRIO IV – História clínica					
1	Paciente	ID	Texto com letra maiúscula	-	1-60
2	Prontuário	PRONTUARIO	Numérica	-	-
3	Diagnóstico	DIAG	Texto com letra maiúscula	-	-
4	O paciente usou algum medicamento para a úlcera de perna nos últimos 12 meses?	MED12	Numérica	0. Não 1. Sim 9. Não se aplica	0-1,9
5	Se sim, qual (is) o (s) nome (s) do (s) medicamento (s)?	QUALMED	Texto	9. Não se aplica	9
6	O paciente usou algum medicamento para a úlcera de perna nos últimos 30 dias?	MED30	Numérica	0. Não 1. Sim 9. Não se aplica	0-1; 9
7	Se sim, qual (is) o (s) nome (s) do (s) medicamento (s)?	NOMEMED	Texto	9. Não se aplica	9
8	O paciente usou algum	MEDNUL12	Numérica	0. Não 1. Sim	0-1; 9

	medicamento que não fosse para a úlcera de perna nos últimos 12 meses?			9. Não se aplica	
9	Se sim, qual (is) o (s) nome (s) do (s) medicamento (s)?	QMED	Texto	9. Não se aplica	9
10	O paciente usou algum medicamento que não fosse para a úlcera de perna nos últimos 30 dias?	MEDNUL30	Numérica	0. Não 1. Sim 9. Não se aplica	0-1; 9
11	Se sim, qual (is) o (s) nome (s) do (s) medicamento (s)?	NOMMED	Texto	9. Não se aplica	9
12	O paciente precisou de transfusão de sangue nos últimos 12 meses?	TRANSF12	Numérica	0. Não 1. Sim	0-1
13	Se sim, por qual motivo?	QUALMOT	Numérica	0. AVC (derrame) 1. Síndrome Torácica Aguda 2. Hipertensão pulmonar 3. Úlcera de perna 4. Anemia Aguda Sintomática 5. Sequestro Esplênico 6. Crise Aplástica 7. Preparação pré-operatório 8. Transfusão crônica 9. Crise de dor/Crise Álgica 10. Outros 99. Não se aplica	0-10; 99
14	Se outros, especificar	ESPECIF	Texto	9. Não se aplica	9
15	O paciente precisou de transfusão de sangue nos últimos 30 dias?	TRANSF30	Numérica	0. Não 1. Sim 9. Não se aplica	0-1,9
16	Se sim, por qual motivo?	QMOT	Numérica	0. AVC (derrame) 1. Síndrome Torácica Aguda 2. Hipertensão pulmonar	0-10; 99

				3. Úlcera de perna 4. Anemia Aguda Sintomática 5. Sequestro Esplênico 6. Crise Aplástica 7. Preparação pré-operatório 8. Transfusão crônica 9. Crise de dor/Crise Álgica 10. Outros 99. Não se aplica	
17	Se outros, especificar	ESPEC	Texto	9. Não se aplica	9
18	O paciente está em tratamento com transfusão crônica?	TRANSFCRON	Numérica	0. Não 1. Sim 9. Não se aplica	0-1,9
19	Se sim, por qual motivo?	INDICTRAT	Numérica	0. AVC (derrame) 1. Síndrome Torácica Aguda 2. Hipertensão pulmonar 3. Úlcera de perna 4. Anemia Aguda Sintomática 5. Sequestro Esplênico 6. Crise Aplástica 7. Preparação pré-operatório 8. Transfusão crônica 9. Crise de dor/Crise Álgica 10. Outros 99. Não se aplica	0-10; 99
20	Se outros, especificar	ESPECIFIC	Texto	9. Não se aplica	9
21	O paciente está em tratamento com Hidroxiuréia?	TRATHIDROX	Numérica	0. Não 1. Sim	0-1
22	Se sim, qual foi a indicação para o início do tratamento?	INDICTRAT	Numérica	0. AVC (derrame) 1. Doença vascular cerebral 2. Síndrome Torácica Aguda 3. Hipertensão pulmonar 4. Úlcera de perna 5. Anemia Aguda Sintomática 6. Crise de dor/Crise Álgica 7. Doppler transcraniano alterado 8. Outros 9. Não se aplica	0-9

23	Se outros, especificar	ESPECIFICA	Texto	9. Não se aplica	9
24	Há quanto tempo o paciente faz uso da Hidroxiuréia?	TEMPHID	Numérica	0. Menos de 30 dias 1. 1 a 6 meses 2. 6 a 12 meses 3. 1 a 3 anos 4. Mais de 3 anos 9. Não se aplica	0-4; 9
25	O paciente tem histórico de osteomielite?	HISTOST	Numérica	0. Não 1. Sim	0-1
26	Se sim, quando foi o último diagnóstico?	QUANDO	Data	-	-
27	O paciente teve diagnóstico de osteomielite nos últimos 12 meses?	DIAGOST12	Numérica	0. Não 1. Sim	0-1
28	Se sim, quando foi o último diagnóstico?	QDIAG	Data	-	-
29	O paciente realizou hemograma nos últimos 12 meses?	HEMOG12	Numérica	0. Não 1. Sim	0-1
<i>Se sim, descreva o último resultado:</i>					
30	Reticulócitos	RETIC	Texto com letra maiúscula	-	-
31	Leucócitos	LEUC	Texto com letra maiúscula	-	-
32	Plaquetas	PLAC	Texto com letra maiúscula	-	-
33	Hemoglobina	HEMOG	Texto com letra maiúscula	-	-
34	VCM	VCM	Texto com letra maiúscula	-	-
35	Último resultado de Ferritina do paciente (0ng/dL a 500ng/dL)	RFERRIT	Texto com letra maiúscula	-	-
36	Último resultado de Ferro do paciente	RFERRO	Texto com letra maiúscula	-	-

	(0mg/dL a 300mg/dL)				
37	O paciente realizou o exame de Eletroforese de Hemoglobina, no estado estável, nos últimos 12 meses?	ELETHEM12	Numérica	0. Não 1. Sim	0-1
<i>Se sim, descreva o resultado:</i>					
38	Hemoglobina fetal	HBF	Texto com letra maiúscula	-	-
39	Hemoglobina S	HBS	Texto com letra maiúscula	-	-
40	Hemoglobina A	HBA	Texto com letra maiúscula	-	-
41	Hemoglobina A2	HBA2	Texto com letra maiúscula	-	-
42	Hemoglobina C	HBC	Texto com letra maiúscula	-	-
43	Hemoglobina D	HBD	Texto com letra maiúscula	-	-
44	Hemoglobina G	HBG	Texto com letra maiúscula	-	-
45	Hemoglobina H	HBH	Texto com letra maiúscula	-	-
46	Hemoglobina Variantes	HBVARI	Texto com letra maiúscula	-	-
47	Qual foi o resultado sorológico mais recente do paciente para HCV?	RHCV	Numérica	0. Negativo 1. Positivo 2. Indeterminado 9. Não se aplica	-
48	Data do resultado sorológico para HCV	DHCV	Data	-	-
49	Qual foi o resultado sorológico mais recente do paciente para HCV (NAT)?	RHCVNAT	Numérica	0. Negativo 1. Positivo 2. Indeterminado 9. Não se aplica	0-2; 9

50	Data do resultado sorológico para HCV (NAT)	DHACVNAT	Data	-	-
51	Qual foi o resultado sorológico mais recente do paciente para Anti-HBc?	RANTIHBC	Numérica	0. Negativo 1. Positivo 2. Indeterminado 9. Não se aplica	0-2; 9
52	Data do resultado sorológico para Anti-HBc	DANTIHBC	Data	-	-
53	Qual foi o resultado sorológico mais recente do paciente para HBs-Ag?	RHBSAG	Numérica	0. Negativo 1. Positivo 2. Indeterminado 9. Não se aplica	0-2; 9
54	Data do resultado sorológico para HBs-Ag	DANTIHBC	Data	-	-
55	Qual foi o resultado sorológico mais recente do paciente para Anti-HBs-Ag?	RANTIHBS	Numérica	0. Negativo 1. Positivo 2. Indeterminado 9. Não se aplica	0-2; 9
56	Data do resultado sorológico para Anti-HBs-Ag	DANTHBS	Data	-	-
57	Qual foi o resultado sorológico mais recente do paciente para HBV (NAT)?	RHBVNAT	Numérica	0. Negativo 1. Positivo 2. Indeterminado 9. Não se aplica	0-2; 9
58	Data do resultado sorológico para HBV (NAT)	DHBVNAT	Data	-	-
59	Qual foi o resultado sorológico mais recente do paciente para Sífilis (ELISA)?	RSIFIEL	Numérica	0. Negativo 1. Positivo 2. Indeterminado 9. Não se aplica	0-2; 9

60	Data do resultado sorológico para Sífilis (ELISA)	DSIFIEL	Data	-	-
61	Qual foi o resultado sorológico mais recente do paciente para Sífilis (VDRL)?	RSIFIVDRL	Numérica	0. Negativo 1. Positivo 2. Indeterminado 9. Não se aplica	0-2; 9
62	Data do resultado sorológico para Sífilis (VDRL)	DVDRL	Data	-	-
63	Qual foi o resultado sorológico mais recente do paciente para HIV (ELISA 1)?	RHIVEL1	Numérica	0. Negativo 1. Positivo 2. Indeterminado 9. Não se aplica	0-2; 9
64	Data do resultado sorológico para HIV (ELISA 1)	DHIVEL1	Data	-	-
65	Qual foi o resultado sorológico mais recente do paciente para HIV (ELISA 2)?	RHIVEL2	Numérica	0. Negativo 1. Positivo 2. Indeterminado 9. Não se aplica	0-2; 9
66	Data do resultado sorológico para HIV (ELISA 2)	DHIVEL2	Data	-	-
67	Qual foi o resultado sorológico mais recente do paciente para HIV (WB)?	RHIVWB	Numérica	0. Negativo 1. Positivo 2. Indeterminado 9. Não se aplica	0-2; 9
68	Data do resultado sorológico para HIV (WB)	DHIVWB	Data	-	-
69	Qual foi o resultado sorológico mais recente do paciente	RHIVNAT	Numérica	0. Negativo 1. Positivo 2. Indeterminado 9. Não se aplica	0-2; 9

	para HIV (NAT)?				
70	Data do resultado sorológico para HIV (NAT)	DHIVNAT	Data	-	-
71	Qual foi o resultado sorológico mais recente do paciente para HTLV?	RHTLV	Numérica	0. Negativo 1. Positivo 2. Indeterminado 9. Não se aplica	0-2; 9
72	Data do resultado sorológico para HTLV	DHTLV	Data	-	-
73	Data da entrevista	DATAENTREV	Data	-	-

9 APÊNDICE B – FORMULÁRIO V

FORMULÁRIO V – Informações gerais dos participantes sem doença falciforme (DF)	
Participante: _____	1. ID _____
2. Endereço: _____	2. ENDE _____
E-mail: _____	
3. Sexo: 0. () Feminino 1. () Masculino	3. () SEXO
Informações do participante	
4. Você já teve alguma ferida que demorou mais de um mês para cicatrizar? 0. () Não 1. () Sim <i>(Finalizar a entrevista)</i>	4. () CICATRI
5. Nos últimos 12 meses, você usou algum medicamento? 0. () Não 1. () Sim 7. () Não sabe 8. () Não quis responder 9. () Não se aplica	5. () MED12
Se sim, qual (is) o (s) nome (s) do (s) medicamento (s)? _____	
6. Nos últimos 30 dias, você usou algum medicamento? 0. () Não 1. () Sim 7. () Não sabe 8. () Não quis responder 9. () Não se aplica	6. () MED30
Se sim, qual (is) o (s) nome (s) do (s) medicamento (s)? _____	
7. Nos últimos 15 dias, você usou algum medicamento? 0. () Não 1. () Sim 7. () Não sabe 8. () Não quis responder 9. () Não se aplica	7. () MED15
Se sim, qual (is) o (s) nome (s) do (s) medicamento (s)? _____	
8. Nos últimos 12 meses você precisou de transfusão de sangue? 0. () Não 1. () Sim	8. () TRANSF12
Se sim, por qual motivo? _____	
9. Nos últimos 30 dias você precisou de transfusão de sangue? 0. () Não 1. () Sim	9. () TRANSF30

Se sim, por qual motivo? _____	
10. Você possui alguma doença de pele (como, por exemplo, dermatites e micoses)? 0. () Não 1. () Sim	10. () DOEPELE
Se sim, por qual motivo? _____	
11. Você possui alguma doença crônica (como, por exemplo, diabetes e hipertensão)? 0. () Não 1. () Sim	11. () DOECRON
Se sim, por qual motivo? _____	
12. Você é alérgico? 0. () Não 1. () Sim	12. () ALERG
Se sim, por qual motivo? _____	
13. Você apresentou febre nos últimos 30 dias? 0. () Não 1. () Sim	13. () FEBRE30
Se sim, qual a causa da febre? _____	
14. Você apresentou alguma infecção nos últimos 30 dias (gripe, resfriado, dor de garganta, por exemplo)? 0. () Não 1. () Sim	14. () INFEC30
Se sim, qual foi o tipo de infecção? _____	
15. Como você está se sentindo hoje? 0. () Normal 1. () Dor 2. () Febre 3. () Problemas para respirar 4. () Gripe ou resfriado 5. () Dor de cabeça 6. () Outros: _____ 7. () Não sabe 8. () Não quis responder 9. () Não se aplica	15. () SESENT
16. Data da entrevista: ____/____/_____ Entrevistador: _____	16. ____/____/_____ DATAENTREV

10 ANEXO A – BIORREPOSITÓRIO

TERMO DE CONSTITUIÇÃO DE BIORREPOSITÓRIO

O presente acordo estabelece as normas para operacionalização, compartilhamento e utilização do material biológico humano coletado e armazenado em Biorrepositório, vinculado ao Projeto de Pesquisa “Caracterização do microbioma em úlcera de perna e análise de biomarcadores inflamatórios em pacientes com Doença Falciforme” a ser gerenciado pelo(a) pesquisador(a) Anna Bárbara de Freitas Carneiro Proietti com participação do Hemocentro de Belo Horizonte da Fundação Hemominas, localizada na Alameda Ezequiel Dias, 321, Santa Efigênia, Belo Horizonte, e da(o) Instituto de Medicina Tropical Universidade de São Paulo, Unidade de Ensino e Pesquisa da Universidade de São Paulo, Universidade pública, localizada na Av. Doutor Enéas Carvalho de Aguiar, 470, São Paulo, conforme definido na legislação competente, atendendo, em especial, ao disposto na Resolução CNS 441/11 e na Resolução CNS 466/12.

1. O Biorrepositório, constituído por 60 amostras de sangue total (8 ml de cada paciente) e 90 amostras de esfregaço de pele dos pacientes, sendo 30 amostras da ferida e 60 amostras da pele saudável, atenderá às normas do Regimento Institucional de Biorrepositório da instituição depositária e será sediado e armazenado no(a) Laboratório de Pesquisa do Hemocentro de Belo Horizonte, da Fundação Hemominas, inscrito(a) no CNPJ sob o nº 26388330/0019-19 e situado(a) na Alameda Ezequiel Dias, 321, Santa Efigênia, Belo Horizonte, e no Laboratório do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, inscrito(a) no CNPJ sob o nº 63025530004100 e situado(a) em na Av. Doutor Enéas Carvalho de Aguiar, 470, São Paulo.
2. O material biológico constituinte do Biorrepositório será mantido em freezers menos 20 e 80 graus centígrados, da seguinte forma: as amostras de sangue ficarão estocadas no Laboratório de Pesquisa da Fundação Hemominas; as amostras de esfregaço de pele serão fracionadas em volumes iguais, permanecendo uma parte no Laboratório de Pesquisa da Fundação Hemominas e outra no Laboratório do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo.
3. O prazo de armazenamento do Biorrepositório será o mesmo definido no cronograma do projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas.
4. As instituições acordantes, devidamente representadas, poderão ter acesso aos dados e materiais obtidos em decorrência da execução do projeto, durante sua vigência, mediante solicitação aos membros da equipe do projeto.
5. A solicitação de acesso a dados e materiais do Biorrepositório somente poderá ser feita por meio dos membros da equipe do projeto de pesquisa, devidamente cadastrados na Plataforma



Brasil, dentro dos parâmetros estabelecidos pelo projeto de pesquisa e mediante aprovação da análise ética.

6. O Biorrepositório estará sob a responsabilidade do pesquisador, competindo aos acordantes o cumprimento das disposições aqui constantes e observância das normas contidas no Regulamento de Biorrepositório;

7. A requisição de amostras durante a vigência da pesquisa deverá ser feita por escrito e não poderá causar prejuízo ao regular desenvolvimento do projeto de pesquisa;

8. Havendo a retirada ou desistência por parte do participante de pesquisa, referente à amostra coletada e armazenada, deverá o pesquisador e a instituição que mantém a guarda disponibilizarem a amostra, nos termos da regulamentação vigente. Nesse caso será facultado ao participante de pesquisa requerer a amostra ou solicitar que ela seja destruída pelo pesquisador;

9. Em caso de dissolução da parceria entre as instituições durante a vigência do projeto, a partilha e destinação dos dados e materiais que compõem o Biorrepositório serão objeto de novo acordo, que deverá ser submetido à análise ética dos Comitês de Ética Institucionais.

10. Em caso de encerramento do projeto de pesquisa, havendo interesse de uso futuro das amostras do Biorrepositório e quando autorizado pelo participante da pesquisa em Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, o pesquisador responsável pelo projeto deverá manifestar seu interesse por escrito e assinado pelos pesquisadores e instituições parceiras. A partilha e destinação dos dados e materiais que compõem o Biorrepositório serão objeto de novo acordo entre as instituições, que deverá ser submetido à análise ética dos Comitês de Ética em Pesquisa envolvidos;

11. Para uso futuro das amostras em nova pesquisa, em atendimento ao disposto na Resolução 441/2011, deverá haver submissão de novo projeto de pesquisa ao sistema CEP/CONEP;

12. Todos os materiais armazenados no Biorrepositório serão destruídos ao final do projeto de pesquisa, caso não haja manifestação nos termos da cláusula 10;

13. Os casos não contemplados pelo presente Termo serão submetidos à análise conjunta dos acordantes e resolvidos de comum acordo pelas partes envolvidas.

Assinaturas:


Pesquisador Principal do Projeto



Nínia Guimarães Mourão Cioffi
MASP. 1050157-5
Presidente
FUNDAÇÃO HEMOMINAS


Representante Legal Fundação Hemominas


Chefia do Serviço de Pesquisa


Diretora do Instituto de Medicina Tropical

REGIMENTO INSTITUCIONAL DE BIORREPOSITÓRIO

O presente regimento estabelece as normas para formação e operacionalização do Biorrepositório vinculado ao Projeto de Pesquisa "Caracterização do microbioma em úlcera de perna e análise de biomarcadores inflamatórios em pacientes com Doença Falciforme" a ser gerenciado pelo(a) pesquisador(a) Anna Bárbara de Freitas Carneiro Proietti com participação do Hemocentro de Belo Horizonte da Fundação Hemominas, conforme definido na legislação competente, atendendo, em especial, ao disposto na Resolução CNS 441/11 e na Resolução CNS 466/12.

1. O Biorrepositório, constituído por constituído por 60 amostras de sangue total (8 ml de cada paciente) e 90 amostras de esfregaço de pele dos pacientes, sendo 30 amostras da ferida e 60 amostras da pele saudável, atenderá às normas do Regimento Institucional de Biorrepositório da instituição depositária e será sediado e armazenado no(a) Laboratório de Pesquisa do Hemocentro de Belo Horizonte, da Fundação Hemominas, situado(a) na Alameda Ezequiel Dias, 321, Santa Efigênia, Belo Horizonte.
2. O material biológico constituinte do Biorrepositório será mantido em freezers menos 80 graus centígrados.
3. O prazo de armazenamento do Biorrepositório será o mesmo definido no cronograma do projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas.
4. O Biorrepositório estará sob a responsabilidade do pesquisador e poderá ser supervisionado pelo Serviço de Pesquisa a qualquer momento;
5. Havendo a retirada ou desistência por parte do participante de pesquisa, referente à amostra coletada e armazenada, deverão o pesquisador e a Fundação Hemominas disponibilizarem a amostra, nos termos da regulamentação vigente. Nesse caso será facultado ao participante de pesquisa requerer a amostra ou solicitar que ela seja destruída pelo pesquisador;
6. Em caso de encerramento do projeto de pesquisa, havendo interesse de uso futuro das amostras do Biorrepositório e quando autorizado pelo participante da pesquisa em Termo de

Consentimento Livre e Esclarecido, o pesquisador responsável pelo projeto deverá manifestar seu interesse por escrito e assinado pelos pesquisadores;

7. Para uso futuro das amostras em nova pesquisa, em atendimento ao disposto na Resolução 441/2011, deverá haver submissão de novo projeto de pesquisa ao sistema CEP/CONEP;

8. Todos os materiais armazenados no Biorrepositório deverão ser destruídos ao final do projeto de pesquisa, caso não haja manifestação nos termos da cláusula 6;

Assinaturas:

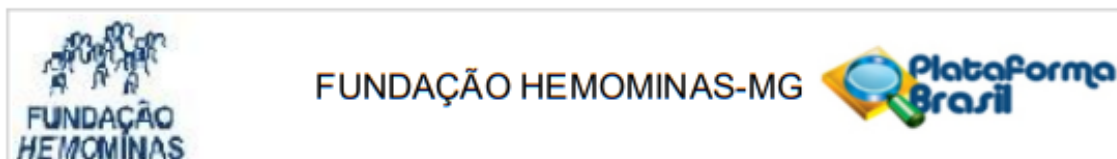
Pesquisador Principal do Projeto

Júnia Guimarães Mourão Cioffi
MASP. 1050157-5
Presidente
FUNDAÇÃO HEMOMINAS

Representante Legal Fundação Hemominas

Chefia do Serviço de Pesquisa

11 ANEXO B – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização do microbioma em úlcera de perna e análise de biomarcadores inflamatórios em pacientes com Doença Falciforme

Pesquisador: Anna Bárbara de Freitas Cameiro Proietti

Área Temática:

Versão: 12

CAAE: 51185415.0.0000.5118

Instituição Proponente: FUND CENTRO HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Final

Detalhe:

Justificativa:

Data do Envio: 06/08/2021

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.960.173

Apresentação da Notificação:

Foi encaminhada a notificação para análise do CEP devido à submissão de relatório final. As informações elencadas nos campos "Apresentação do projeto", "Objetivo da notificação" e "Avaliação de riscos e benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas do Projeto (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1614254_E5.pdf e/ou do 05_437_Final_3_versao_6_Ago_2021.pdf)

Resumo: As úlceras de perna são danos no tegumento que podem ocorrer por meio de traumas. Ela também é uma manifestação clínica da Doença Falciforme (DF) relativamente comum, geralmente dolorosa e incapacitante na maioria dos casos, podendo limitar a vida pessoal e profissional desses pacientes. A incidência dos casos de úlcera de perna nos pacientes com DF são escassos e variam muito de acordo com as diferentes regiões geográficas. Desse modo, novos estudos são necessários para gerar dados que possam contribuir na reformulação de novas

Endereço: Alameda Ezequiel Dias, 321

Bairro: Santa Efigênia

CEP: 30.130-110

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3768-4689

Fax: (31)3768-4600

E-mail: cep@hemominas.mg.gov.br



FUNDAÇÃO HEMOMINAS-MG



Continuação do Parecer: 4.960.173

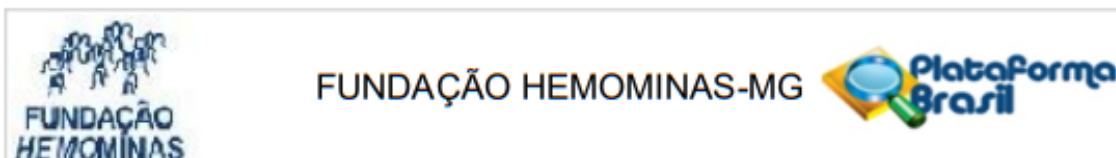
técnicas de prevenção, diagnóstico e tratamento para a úlcera de perna. O presente estudo tem o objetivo de identificar e caracterizar a microbiota presente nas úlceras de perna dos pacientes com DF do Hemocentro de Belo Horizonte (HBH), Fundação Hemominas. Este será um estudo de caso-controle que visa comparar a microbiota entre os grupos selecionados: 30 pacientes com DF que apresentarem úlcera de perna ativa; 60 pacientes que nunca tiveram histórico de úlcera de perna; 30 participantes saudáveis. Estes, serão entrevistados, terão amostras biológicas coletadas do sangue, ferida e pele normal, e os dados do prontuário médico dos pacientes serão registrados. As entrevistas com os participantes acontecerão em um local privativo, na companhia do responsável, se houver. As entrevistas quanto os dados do prontuário serão registrados em formulários e analisados subsequentes. As amostras biológicas serão analisadas em dois momentos: o primeiro momento será no Laboratório de Pesquisa, da Fundação Hemominas, em Belo Horizonte; o segundo momento as análises acontecerão no Instituto de Medicina Tropical (IMT), da Universidade de São Paulo, na cidade de São Paulo. Nesse estudo esperam-se: identificar os agentes bacterianos que possam estar associados à presença de úlcera de perna em pacientes com DF, do HBH; encontrar diferenças entre os agentes da microbiota da úlcera de perna e da pele normal em pacientes do grupo caso; encontrar diferenças entre os agentes da microbiota da úlcera de perna (caso) e da pele normal (controles); Identificar os fatores demográficos, aspectos da história da doença atual, história pregressa e hábitos pessoais associados à presença de úlcera de perna nesses pacientes; e analisar os biomarcadores inflamatórios associadas à úlcera de perna.

Hipótese: A composição do microbioma da úlcera de perna e os níveis de biomarcadores inflamatórios circulantes no sangue estão relacionados com a presença de úlcera de perna.

Critério de Inclusão: Caso - pacientes portadores da Doença Falciforme; pacientes que apresentarem úlcera de perna; pacientes com idade 10 de idade. Controle - pacientes portadores da Doença Falciforme; pacientes que nunca tiveram histórico de úlcera de perna; pacientes com idade maior que 10 anos. Controle - participantes saudáveis sem a Doença Falciforme; pacientes com idade maior que 10 anos.

Critério de Exclusão: Caso - pacientes que não forem portador da Doença Falciforme; pacientes que não apresentarem úlcera de perna ativa; pacientes com idade maior que 10 anos. Controle - pacientes que não forem portador da Doença Falciforme; pacientes que já tiveram úlcera de perna alguma vez na vida; pacientes com idade maior que 10 anos.

Endereço: Alameda Ezequiel Dias, 321
Bairro: Santa Efigênia **CEP:** 30.130-110
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3768-4689 **Fax:** (31)3768-4600 **E-mail:** cep@hemominas.mg.gov.br



Continuação do Parecer: 4.960.173

Objetivo da Notificação:

Apresentar relatório final da pesquisa.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: O presente estudo irá apresentar riscos mínimos para o participante. O questionário e a coleta de dados serão realizados pela equipe do estudo que está preparado para lidar com estas questões e disponível para orientá-los. Se o questionário causar ao participante algum tipo de desconforto ou constrangimento, ele terá a opção de não responder às perguntas que não quiser. A qualquer momento o participante pode solicitar a exclusão da sua inscrição do estudo. Uma pequena amostra de sangue será coletada por meio de uma seringa, e isso poderá causar uma leve dor ao participante. No local em que a agulha for introduzida também poderá apresentar um pequeno hematoma, mas normalmente estes sintomas não permanecerão por muito tempo. Em casos muito raros pode haver um pequeno ferimento ou infecção no local onde a agulha foi inserida. Durante a coleta da úlcera de perna também poderá haver dor no local onde iremos passar o cotonete e o risco de causar prejuízo ou induzir infecção na ferida é mínimo. Geralmente a passagem do cotonete na pele normal não gera dor ao paciente.

Benefícios: O benefício do participante no estudo será a identificação dos agentes patogênicos presentes na úlcera de perna através do sequenciamento. Tal resultado poderá ajudar no tratamento do paciente a nível individual, além de contribuir para o melhor entendimento da "úlcera de perna" na doença falciforme e contribuir para o aprimoramento de estratégias alternativas de prevenção, tratamento e reabilitação dessa ferida.

Não foram apresentados riscos ou benefícios adicionais por ocasião da apresentação da notificação.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações"

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não são apresentados novos termos por ocasião da submissão da notificação.

Endereço: Alameda Ezequiel Dias, 321
Bairro: Santa Efigênia **CEP:** 30.130-110
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3768-4689 **Fax:** (31)3768-4600 **E-mail:** cep@hemominas.mg.gov.br



FUNDAÇÃO HEMOMINAS-MG



Continuação do Parecer: 4.960.173

Recomendações:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações"

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram evidenciados óbices éticos na Notificação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Final	05_437_Final_3_versao_6_Ago_2021.pdf	06/08/2021 15:54:56	Franciane Mendes de Oliveira	Postado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 09 de Setembro de 2021

Assinado por:
Daniel Gonçalves Chaves
(Coordenador(a))

Endereço: Alameda Ezequiel Dias, 321**Bairro:** Santa Efigênia**CEP:** 30.130-110**UF:** MG**Município:** BELO HORIZONTE**Telefone:** (31)3768-4689**Fax:** (31)3768-4600**E-mail:** cep@hemominas.mg.gov.br

12 ANEXO C – ANÁLISE POR ANCOM

Feature ID	Taxon	Confidence	W	Reject null hypothesis
f31c4a5448cd65219532490d5efe989	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Badilli; o__Lactobacillales; f__Streptococcaceae; g__Streptococcus	0.999998979	2779	True
75fb41d67285a14d1eaf7c3986aa1a84	k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Pseudomonadales; f__Moraxellaceae; g__Enhydrobacter	0.999974088	2810	True
2302ef4d7a8c79f5dcf6fe9096a9bed3	k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Pseudomonadales; f__Moraxellaceae; g__Enhydrobacter	0.999968521	2784	True
bd35fabd39bb3c31c1f0205d1b7faac9	k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Pseudomonadales; f__Moraxellaceae; g__Acinetobacter	0.999907095	2794	True
bdd4a24949efa41d0e69bef1891faf34	k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Pseudomonadales; f__Moraxellaceae; g__Acinetobacter	0.999555736	2735	True
298a29f4ad6d23ce4b8b3608236461a6	k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Betaproteobacteria; o__Burkholderiales; f__Comamonadaceae	0.99945418	2767	True
686b852f275106f9a6f72b41b1803	k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; o__Actinomycetales; f__Intrasporangiaceae	0.998789923	2653	True
7bb48c9949294dd026825879ed629760	k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; o__Actinomycetales; f__Corynebacteriaceae; g__Corynebacterium	0.998264319	2827	True
d2172f6fc28d35b2799d148b9f73103d	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Badilli; o__Lactobacillales; f__Aerococcaceae; g__Aerococcus; s__	0.994759985	2650	True
3160f7cb2d09e84a33785db0510241a	k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Betaproteobacteria; o__Burkholderiales; f__Burkholderiaceae	0.992965757	2651	True
9f9be5768a9cfe0c4c825311aae235a	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Badilli; o__Lactobacillales; f__Streptococcaceae; g__Streptococcus; s__	0.992134549	2755	True
475e18c2b23a593c93d283e6b7e482db	k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; o__Actinomycetales; f__Corynebacteriaceae; g__Corynebacterium; s__	0.989299339	2792	True
df6ab9607dc3dcf5917286e01cc88473	k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; o__Actinomycetales; f__Corynebacteriaceae; g__Corynebacterium; s__	0.985869302	2798	True
3ceb68931612c0096e34c49ac0e6ad69	k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; o__Actinomycetales; f__Micrococcaceae; g__Micrococcus	0.973578395	2870	True
7297489ec652cee1a0fb4712deidd02b4	k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Alphaproteobacteria; o__Rhodobacterales; f__Rhodobacteriaceae; g__Paracoccus; s__marcusii	0.965888622	2663	True
ae7890959d3844207e1e440af746e59	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Badilli; o__Lactobacillales; f__Streptococcaceae; g__Streptococcus; s__	0.933459739	2591	True
e94448f2c2f8b72937b964aa5cd9a5d1	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Badilli; o__Bacillales; f__Staphylococcaceae; g__Staphylococcus	0.9140304	2716	True
ede2349d75e60260601e8d3ee041fb2b	k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; o__Actinomycetales; f__Dermabacteraceae; g__Brachybacterium	0.892150743	2718	True
68abd5cb8ba2b9f49f1c454fb4d5ee5fb	k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Pseudomonadales; f__Moraxellaceae; g__Acinetobacter; s__	0.883485338	2581	True
fff11c60b027f9e9ae595c9134473741	k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Alphaproteobacteria; o__Caulobacterales; f__Caulobacteriaceae; g__Brevundimonas	0.87703642	2800	True
d675e6ee5ddac4c9ffe62d1b9fae107c9	k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; o__Actinomycetales; f__Dermabacteraceae; g__Brachybacterium	0.868056643	2831	True
5c85b72dc11e080b7d8cf95d8ddc2527	k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Pseudomonadales; f__Moraxellaceae; g__Acinetobacter; s__	0.8422785	2724	True
693d3ff4847382a22320c70399ab73dff	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Badilli; o__Bacillales; f__Staphylococcaceae; g__Staphylococcus	0.838955809	2646	True
21dae82aebf7c226100854a5ea2687c	k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; o__Actinomycetales; f__Corynebacteriaceae; g__Corynebacterium; s__	0.787162447	2860	True
fad9c1e4986eab2bb0078221ceef5c	k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Badilli; o__Gemellales; f__Gemellaceae; g__s__	0.765663617	2673	True
7804771cd903de061ecd8b72659392b2	k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; o__Actinomycetales; f__Micrococcaceae; g__Kocuria; s__palustris	0.729951421	2778	True
de7644f65bf5c16f49a96d79a092e34a	k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Pseudomonadales; f__Moraxellaceae; g__Acinetobacter; s__johnsonii	0.726700752	2669	True