



Correlação entre a microbiota da pele e seu metaboloma com a cicatrização de feridas crônicas

Gabriel Luis Cavalcanti Valente*, Felipe Lopes Teixeira, Geraldo Renato de Paula

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil

Histórico do Artigo:

Recebido em: 21/12/2021

Aceito em: 05/12/2022

Palavras-chave:

metaboloma; microbioma; microbiota; ferida crônica; lesão por pressão; ferida por pressão; pé diabético; ferida diabética; úlcera varicosa; úlcera venosa; ferida varicosa

Keywords:

metabolome; microbiome; microbiota; chronic wound; pressure injury; pressure wound; diabetic foot; diabetic wound; varicose ulcer; venous ulcer; varicose wound

RESUMO

O objetivo deste artigo foi identificar as espécies bacterianas predominantes na microbiota de feridas crônicas, buscando compreender a sua correlação com a cicatrização dessas feridas. Foi realizada uma revisão integrativa de literatura, na base de dados *PubMed*. Foram selecionados artigos publicados na íntegra, no idioma inglês, publicados entre 2016 e 2021. Foram excluídos artigos que abordassem uso de medicamentos imunossupressores e/ou uso de antibióticos. Para a elaboração da questão do estudo, utilizou-se a estratégia PICO (acrônimo para *patient, intervention, comparison, outcomes*), que possibilita a identificação de descritores, os quais auxiliam na localização de estudos primários relevantes nas bases de dados. A questão de pesquisa delimitada: Existe correlação entre a microbiota da pele com a cicatrização de feridas crônicas? As palavras-chave foram selecionadas nos Descritores em Ciência da Saúde, BVS e MeSH Database, com operadores booleanos "AND" e "OR" para combinação dos termos. Vinte e oito artigos foram selecionados. Os principais gêneros de microrganismos encontrados em feridas crônicas de pele foram *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas* e *Enterococcus*. Não foram encontrados indicativos claros de correlação com a cicatrização de feridas no material utilizado. Enfatiza-se a importância de contribuir para a prevenção de complicações nas feridas crônicas, que podem ser ocasionadas por microrganismos infecciosos, e resultam, muitas vezes, em amputação ou morte.

Correlation between skin microbiota and its metabolome with chronic wound healing

ABSTRACT

The aim of this work was to identify the predominant microorganisms in the microbiota of chronic wounds, seeking to understand its correlation with the healing of those wounds. An integrative literature review was performed in the PubMed database. Articles published in full, in English, published between 2016 and 2021, were selected. Articles that addressed the use of immunosuppressive drugs and/or use of antibiotics were excluded. To elaborate the study question, the PICO strategy (acronym for patient, intervention, comparison, outcomes) was used, which allows the identification of descriptors, which help to locate relevant primary studies in the databases. The delimited research question is: Is there a correlation between skin microbiota and chronic wound healing? The keywords were selected from the Health Science Descriptors, BVS and MeSH Database, with Boolean operators "AND" and "OR" for combination of terms. Twenty-eight articles were selected in three thematic categories. The main genera of microorganisms found in chronic skin wounds were *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas* and *Enterococcus*. No indications of correlation with wound healing were found in the material analyzed. It is an important matter to contribute to the prevention of complications in chronic wounds, which can be caused by infectious microorganisms, and often result in amputation or death.

1. Introdução

As feridas crônicas se manifestam, em maior frequência, em pacientes idosos e diabéticos e geralmente são resultantes de problemas com os mecanismos celulares e

* Autor correspondente: gabrielvalente303@gmail.com (Valente, G.L.C.)

moleculares de reparo da ferida. Essas feridas podem resultar em incapacitação, amputação e elevada morbidade (3), tornando-as um sério problema de saúde pública. Estima-se que estas feridas afetem de 1% a 2% da população mundial e o custo com o tratamento nos Estados Unidos, por exemplo, é de cerca de 25 bilhões de dólares por ano, sendo grande parte desse custo relacionada ao uso de antimicrobianos (4).

A pele é um ecossistema dinâmico e complexo, habitado por diversos microrganismos. Essa microbiota é fundamental para fisiologia e imunidade da pele, e sua interação com o hospedeiro pode oscilar consideravelmente, desde uma interação benéfica de mutualismo até o parasitismo (51). A sua composição pode impactar diretamente a cicatrização de uma ferida, processo altamente coordenado e complexo, que pode gerar consequências devastadoras caso seja interrompido. Acredita-se que uma combinação de fatores do hospedeiro e microrganismos presentes na ferida, pode não apenas dificultar a cicatrização, mas levar à evolução para feridas crônicas (1,2).

Autores afirmam que, frequentemente, a diminuição da carga microbiana de feridas crônicas, a níveis inferiores aos característicos de infecção, facilita o controle dos mediadores inflamatórios locais e sistêmicos, reduzindo a inflamação (5). Além disso, o aumento na identificação de bactérias multirresistentes em feridas crônicas (6,7), demonstra que pode limitar as opções terapêuticas das feridas que apresentem diagnóstico de infecção.

Isso ocorre graças às moléculas geradas como produto do metabolismo, tanto das células do hospedeiro, quanto das que compõem a microbiota. Essas moléculas formam um arcabouço químico que pode então exercer uma série de funções e que são críticas para o desenvolvimento das comunidades microbianas que recobrem a pele. (8,9,10,11).

Esperamos que uma maior compreensão a respeito da variedade microbiômica de feridas possa no futuro ajudar a entender melhor o seu processo de cicatrização e, assim, contribuir para o manejo adequado da ferida e para o desenvolvimento de novas estratégias de controle microbiológico de feridas. Compreender esses mecanismos é crucial para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas efetivas, para reverter falhas no processo de cicatrização (52).

Buscou-se com esse trabalho identificar os microrganismos predominantes na microbiota de feridas crônicas, procurando compreender a sua correlação com a cicatrização dessas feridas. Espera-se que essa identificação possa nortear e facilitar pesquisas a respeito das feridas crônicas.

2. Material e métodos

Trata-se de uma revisão integrativa de literatura, realizada no portal da MEDLINE, na base de dados PubMed. Para elaboração da questão de pesquisa, utilizou-se a estratégia PICO (acrônimo para *Patient, Intervention, Comparison, Outcomes*), que possibilita a identificação de descritores, os quais auxiliam na localização de estudos primários relevantes nas bases de dados (12).

Quadro 1 – Elaboração da pergunta de pesquisa – estratégia PICO.

Estratégia PICO	
P	Pacientes portadores de feridas crônicas.
I	Cicatrização de feridas crônicas.
Co	Correlação entre a microbiota da pele com a cicatrização de feridas crônicas.

Fonte: Elaboração própria.

A **questão de pesquisa** delimitada é: Existe correlação entre a microbiota da pele com a cicatrização de feridas crônicas? As palavras-chave foram selecionadas nos

Descritores em Ciência da Saúde da BVS e MeSH Database, com operadores booleanos “AND” e “OR” para combinação dos termos: Metaboloma (*Metabolome*); Microbioma (*Microbiome*); Microbiota (*Microbiota*); Ferida crônica (*Chronic wound*); Lesão por pressão (*Pressure Ulcer*); Ferida por pressão (*Pressure wound*); Pé diabético (*Diabetic Foot*); Ferida diabética (*Diabetic wound*); Úlcera Varicosa (*Varicose Ulcer*); Úlcera venosa (*Venous ulcer*); Ferida varicosa (*Varicose wound*).

O tipo de amostragem foi em sequência, que consiste no recrutamento de todas as produções acessíveis, que atendam aos critérios de elegibilidade, ao longo de um intervalo de tempo específico (13), delimitada por conveniência. Critérios de inclusão: aderência ao objetivo e ao tema proposto, artigos publicados na íntegra, no idioma inglês e estudos realizados com humanos e camundongos. Estudos realizados com humanos de todas as faixas etárias em ensaios clínicos e de controle, de ambos os sexos e etnias, com recorte temporal de publicações dos anos de 2016 a 2021. Critérios de exclusão: artigos de revisão bibliográfica e os que abordam uso de medicamentos imunossupressores e/ou uso de antimicrobianos.

A descrição das buscas e a seleção dos artigos baseou-se no *Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analyses* (PRISMA), conforme fluxograma a seguir (Figura 1).

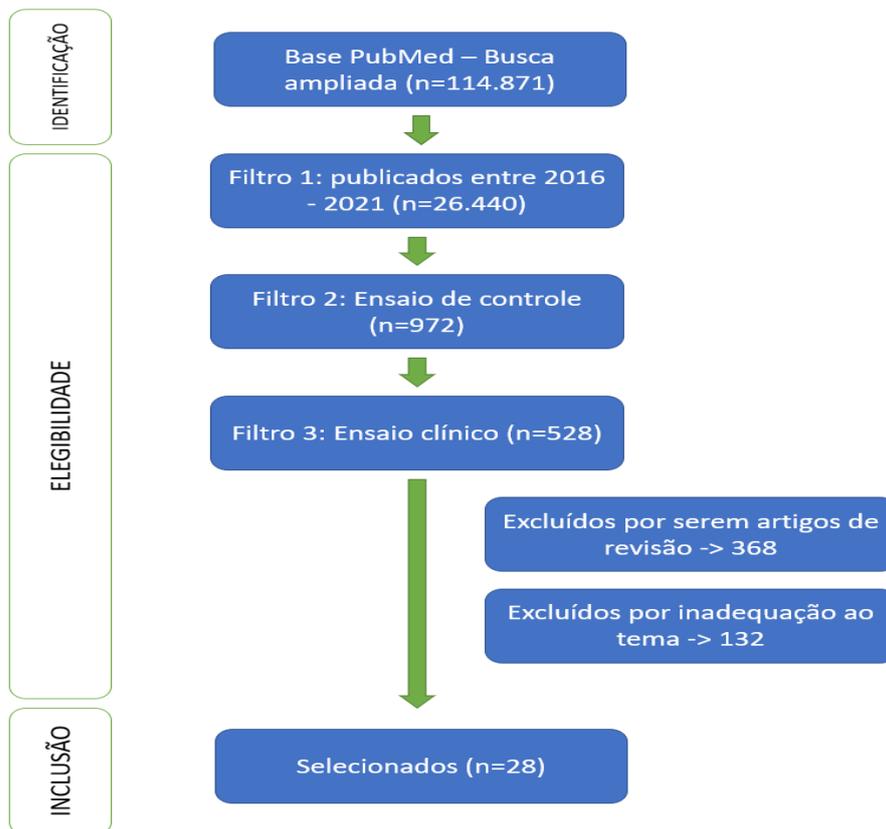


Figura 1 – Fluxograma de seleção dos artigos

3. Resultados e discussão

Os resultados iniciais da busca ampliada apresentaram n=114.871 produções (figura 1). Após a aplicação do primeiro filtro, elegeram-se n=26.440 artigos, publicados no recorte temporal de 2016-2021; no que concerne ao tipo de pesquisa, restaram n=972 ao ser aplicado filtro quanto a ensaios do tipo controle e então n=528 do tipo ensaio clínico.

Dentre estes, foram excluídos 368 artigos por serem artigos de revisão e 132 por inadequação ao tema. Desses, um dos principais fatores relacionados à sua exclusão foi pelo fato de serem artigos que tratam da microbiota intestinal, o que indica que quando se trata de buscas a respeito da microbiota humana, a presença de trabalhos que abordem a microbiota da pele ou de feridas ainda é escassa, o que se mostra como mais um fator que ressalta a importância de se realizar pesquisas com foco nesse tema. Dessa forma, restaram 28 artigos potenciais para a análise.

Dentre os artigos analisados, em 23 deles foram realizados métodos de identificação dos microrganismos presentes em feridas crônicas, alguns utilizando mais de um método, sendo eles: sequenciamento do gene 16S do rRNA (20; 77%); ensaios de cultura microbiológica (4; 15%); testes bioquímicos (1; 4%); e sequenciamento metagenômico *shotgun* (1; 4%). Nesses, 13 artigos eram relacionados exclusivamente a pacientes com DFUs, 3 apresentando pacientes relacionados exclusivamente a lesão por pressão, enquanto 8 abordaram pacientes com diferentes tipos de feridas crônicas.

Há um evidente consenso na literatura mundial acerca das Úlceras do pé diabético (DFUs) como uma das principais causas de alta morbidade, principalmente entre os idosos acamados. O diabetes tipo II é uma condição crônica de saúde que está associada a doenças de pele, incluindo úlceras crônicas nos pés e um aumento da incidência de infecções de pele. Em associação com a falta de sensibilidade, artérias enrijecidas, resposta imunológica do hospedeiro comprometida e recorrência de úlceras, especialmente colonizadas por organismos multirresistentes, frequentemente colocam os pacientes com pé diabético em maior risco de úlceras que não cicatrizam (14).

Estudos anteriores, (15-16), mostravam que a maioria das DFIs são polimicrobianas com uma predominância de cocos Gram-positivos, especialmente *S. aureus* e *Streptococcus spp.* No entanto, estudos recentes (17-18), indicaram a predominância de patógenos Gram-negativos em infecções monomicrobianas, particularmente membros da família *Enterobacteriaceae* e gênero *Pseudomonas*. A utilização prolongada de antimicrobianos para lesões não infectadas ou feridas cicatrizadas, longa permanência hospitalar e medidas cirúrgicas, podem predispor os pacientes à colonização e infecção por patógenos resistentes aos medicamentos e resultados adversos associados. Microrganismos multirresistentes, como MRSA, metalo-beta-lactamases (MBL), produtores de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e produtores de beta-lactamases resistentes à ampicilina (AmpC) podem contribuir para a ocorrência de amputação (19,20,21,22).

Para caracterizar bactérias comuns em feridas de pé diabético, explorar o padrão de sensibilidade a drogas de microrganismos identificados e análise da alteração da etiologia de DFUs, um estudo prospectivo foi desenvolvido com 90 pacientes diabéticos tipo 2 com úlceras nos pés, numa enfermaria de endocrinologia. 70 pacientes com DFUs infectados foram incluídos. Foi demonstrada a existência de uma diversidade de microrganismos em DFUs após análise clínica dos aspirados de pus ou amostras de tecidos moles, que foram coletados no dia da internação, limpeza adequada da ferida diabética com soro fisiológico, seguido de desbridamento dos exsudatos de tecidos superficiais e processados para identificação bacteriana aeróbia (23).

Evidenciou-se (23), que o domínio emergente de aeróbios Gram-negativos substituindo bactérias Gram-positivas em feridas de pé diabético infectado pode impor um sério problema de saúde na cura de úlceras. Portanto, os antimicrobianos prescritos devem ser ampliados, cobrindo patógenos Gram-negativos e Gram-positivos para melhorar o estado de cicatrização do pé diabético. Os antimicrobianos prescritos também devem ter como alvo as cepas multirresistentes, que são um problema agravante no tratamento da infecção do pé diabético e complicações associadas. Além disso, uma análise clínica adequada,

incluindo a presença de neuropatia e doença vascular, e a pesquisa de histórico de ulcerações deve ser feita rotineiramente em diabéticos.

Outro estudo (24), objetivou quantificar a viabilidade da microbiota da ferida, classificar a dispersão de microrganismos viáveis da ferida e determinar se a microbiota humana da ferida pode produzir uma ferida crônica em um modelo animal. Microbiotas de feridas como unidades (várias espécies microbianas agindo como um agente infeccioso) foram obtidas de feridas crônicas humanas bem definidas e semeadas em feridas de excisão cirúrgica de camundongos, para produzir feridas cronicamente infectadas, que se assemelhavam às feridas crônicas observadas nos hospedeiros originais. Foi demonstrado que a microbiota da ferida se dissemina ativamente a partir da ferida crônica, por forças e mecanismos intrínsecos à ferida.

A carga microbiana de feridas crônicas (25), desempenha um papel importante na cicatrização prejudicada e no desenvolvimento de complicações relacionadas à infecção. Avaliou-se sistematicamente a dinâmica temporal da microbiota que coloniza DFUs, sua associação com complicações clínicas e de cura. A instabilidade da comunidade da microbiota foi associada a uma cura mais rápida e melhores resultados. A utilização de antibióticos sistêmicos desestabilizou a microbiota da ferida, em vez de alterar a diversidade geral ou a abundância relativa de táxons específicos.

Nessa perspectiva (26), traçou-se o perfil do microbioma DFUs infectadas. A microbiota foi correlacionada a parâmetros clínicos e resultados de tratamento para determinar se a terapia antimicrobiana dirigida com base em culturas microbiológicas convencionais é relevante com base na análise genômica. Pacientes com 18 anos ou mais apresentando uma nova DFI que não receberam antimicrobianos tópicos ou orais nas duas semanas anteriores à apresentação foram elegíveis para o estudo. Biópsias de tecido foram obtidas de DFUs infectadas para análise.

Trinta e nove pacientes foram recrutados ao longo de doze meses (26). Todas as DFUs de duração mais curta (menos de seis semanas) tinham uma espécie bacteriana dominante ($n = 5$ de 5, 100%, $p < 0,001$), *Staphylococcus aureus* em três casos e *Streptococcus agalactiae* em dois. As DFUs de duração mais longa (\geq seis semanas) foram diversamente polimicrobianas ($p < 0,01$) com uma média de 63 (intervalo 19-125) espécies bacterianas. Sendo assim, a duração de um DFU pode ser útil como um guia para direcionar a terapia antimicrobiana.

A infecção bacteriana polimicrobiana é um fator importante que contribui para a cronicidade da ferida. Dessa forma, adotou-se uma abordagem de tratamento de feridas baseada em biofilme, na qual as feridas são tratadas, utilizando informações de sequenciamento de DNA sobre comunidades microbianas. (27) Procedeu-se a análise temporal em três pontos de amostragem conduzida para 167 feridas crônicas. Ao longo dos intervalos, as comunidades de feridas dos mesmos pacientes mudaram de composição e, mais comumente, compartilharam menos de 50% das espécies observadas. Houve uma relação significativa entre a semelhança da comunidade e o tempo entre a amostragem. Classificando feridas em tipos de estado, descobriu-se que as comunidades frequentemente transitavam de uma composição dominada pelos gêneros *Pseudomonas* ou *Staphylococcus*, para um tipo de estado altamente variável.

Dentre as possibilidades de tratamento (28), enfatiza-se como a Medicina Tradicional Chinesa (TCM) regula as bactérias da ferida. O estudo coletou amostras de feridas de 35 pacientes e analisou a variação das bactérias antes e depois do tratamento com TCM por sequenciamento de rRNA 16s. A conclusão do estudo evidenciou um efeito positivo após o tratamento com TCM (pomada para produção de pele). Mecanicamente, TCM ajudou a promover a cicatrização de feridas, regulando a microbiota da ferida.

Quanto à relação entre a microbiota e a inflamação (29), analisou-se a microbiota na

pele normal e tecido de DFU do mesmo indivíduo e suas funções com base nas características clínicas. A diversidade da microbiota da pele foi maior do que a dos tecidos DFW, juntamente com diferenças de composição. Além disso, diferentes microrganismos foram associados a características clínicas. Os resultados indicaram que a microbiota na pele normal, está relacionada aos microrganismos colonizadores no tecido DFW de acordo com as características clínicas e os diferentes microrganismos podem desempenhar papéis importantes no prognóstico.

Sobre a existência de redes metabólicas que contribuem para a formação de comunidades estáveis (30), traçou-se o perfil do microbioma de uma série de amostras longitudinais de 28 pessoas com diabetes e DFUs do calcanhar, na tentativa de melhor caracterizar a relação entre cicatrização, infecção e o microbioma. No total, foram analisadas 237 amostras, coletadas em intervalos quinzenais por 6 meses ou até a cicatrização. Perfis de microbioma foram gerados por análise de sequência de gene 16S rRNA, complementada por sequenciamento de genoma inteiro. Os resultados demonstraram que DFUs que não curaram durante o período pesquisado (20/28, 71,4%) foram mais propensos a ser colonizados de forma persistente com uma comunidade heterogênea de microrganismos, incluindo anaeróbios e *Enterobacteriaceae*. (30).

O perfil bacteriano pode interferir na cicatrização de feridas crônicas. Um estudo de coorte da cicatrização e etiologia de feridas (WE-HEAL), incluindo comorbidades subjacentes menos comumente estudadas no contexto de feridas crônicas, como doenças autoimunes, investigou possíveis relações da microbiota com tendências de cura clínica. Foram examinados os espécimes de feridas crônicas de 60 pacientes, coletados por meio do Estudo WE-HEAL usando o sequenciamento do gene 16S do rRNA (31).

Um grupo de anaeróbios obrigatórios co-ocorrentes foi identificado a partir de análises taxonômicas guiadas pela modelagem de misturas multinomiais de Dirichlet (DMM). Inclui membros dos cocos anaeróbios Gram-positivos (GPAC) do filo *Firmicutes* (*Anaerococcus*, *Finegoldia* e *Peptoniphilus*) e anaeróbios estritos adicionais (*Porphyromonas* e *Prevotella*). O grupo co-ocorrente, não apenas coexiste com espécies de feridas comumente identificadas (como *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas sp.*, *Corynebacterium sp.* e *Streptococcus sp.*), mas também pode predominar na microbiota da ferida.

Para investigar o papel da microbiota colonizadora na cicatrização de feridas diabéticas, resultados clínicos e resposta às intervenções (32), realizou-se um estudo longitudinal prospectivo de pacientes com DFU. O sequenciamento metagenômico por *shotgun* revelou que a variação no nível de cepa de *S. aureus* e as assinaturas genéticas da formação de biofilme foram associadas a resultados ruins.

Os genes de resistência aos antibióticos foram generalizados e o desbridamento, em vez do tratamento com antibióticos, alterou significativamente a microbiota DFU em pacientes com resultados mais favoráveis. Esses achados sugerem que a microbiota DFU pode ser um marcador para desfechos clínicos e resposta a intervenções terapêuticas. Quanto à relação da microbiota da ferida com o desbridamento, uma intervenção realizada por uma equipe de enfermagem, destinada a remover tecido necrótico, determinou que uma redução significativa na diversidade de Shannon (índice de diversidade em dados) ocorreu após o desbridamento, em feridas que cicatrizaram em 12 semanas.

Quando se examinou a composição da comunidade nesses momentos, observou-se que a abundância relativa de bactérias aeróbias como *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Pseudomonas aeruginosa* não mudou. No entanto, bactérias anaeróbias mistas, como *Anaerococcus lactolyticus*, *Porphyromonas somerae*, *Prevotella melaninogenica* e *Veillonella dispar* foram reduzidas após o desbridamento em feridas que cicatrizaram, mas não em feridas não curadas. Tais investigações aprofundadas do microbioma das

DFUs, juntamente com a modelagem funcional *in vitro* e *in vivo*, aumentam a compreensão das influências microbianas nas vias de reparo de tecidos, sugerem alvos diagnósticos e/ou prognósticos terapêuticos e têm o potencial de superar desafios para melhorar os resultados dos pacientes (32).

Analisou-se *swabs* ou amostras de desbridamento de feridas, quanto ao crescimento microbiano por cultura ou através de técnicas moleculares, usadas para determinar o microbioma da ferida. Os patógenos foram avaliados de acordo com a proporção de diferentes espécies e relacionados a diferentes fatores como tipo e localização da ferida, doença e doenças subjacentes. Em comparação com os métodos convencionais de detecção microbiológica, o microbioma da ferida analisado por técnicas moleculares compreende muito mais tipos e quantidades de espécies. Nesse contexto, opções modernas de tratamento antimicrobiano, por meio de novos antibióticos, além da quimioterapia convencional, como a modulação da colonização, tornam-se possíveis. (33)

O microbioma inicial da amostra da ferida pode fornecer informações prognósticas importantes sobre o eventual resultado clínico da terapia de salvamento dos pés - FST. Pode servir como uma ferramenta clínica importante para o aconselhamento do paciente e tomada de decisão cirúrgica de buscar salvamento do pé, versus amputação. Dessa forma, rastrear mudanças na prevalência de patógenos em DFUs pode ser uma ferramenta clínica para monitorar a resposta ao tratamento para a FST e prognosticar a necessidade de intervenção cirúrgica adicional (34).

As feridas crônicas dos diabéticos são caracterizadas por altos níveis de estresse oxidativo (OS) e são, frequentemente, colonizadas por bactérias formadoras de biofilme que comprometem gravemente a cicatrização e podem resultar em amputação. No entanto, pouco se sabe sobre o papel da microbiota da pele na cicatrização e no desenvolvimento de feridas crônicas. Assim, partindo da hipótese de que altos níveis de OS levam ao desenvolvimento de feridas crônicas, promovendo a colonização de bactérias formadoras de biofilme sobre bactérias comensais, descobriu-se que as feridas em cicatrização foram colonizadas por um microbioma bacteriano diverso e dinâmico, que nunca desenvolveu biofilmes, embora bactérias formadoras de biofilme estivessem presentes (35).

As DFU representam um desafio significativo, porque frequentemente demonstram crescimento polimicrobiano, tornam-se resistentes à terapia antibiótica preferida e não informam os provedores sobre o prognóstico em longo prazo. Além disso, o rendimento da cultura convencional pode ser afetado pelo tempo de administração do antibiótico e coleta de tecido para análise. Isso pode levar à administração de antibióticos abaixo do ideal ou amputações debilitantes. O microbioma de DFU é uma nova fronteira para melhor compreender as interações entre organismos hospedeiros e organismos patogênicos. (36)

Os leitos da ferida DFU são colonizados por um número maior de filotipos bacterianos distintos, em comparação com a borda da ferida ou pele fora da ferida. No entanto, nenhuma mudança significativa na diversidade do microbioma ocorreu nos locais da ferida após uma semana de tratamento padrão. O aumento da abundância inicial de cocos anaeróbios Gram-positivos (GPAC), especialmente *Peptoniphilus sp.*, foi associado com cicatrização prejudicada; assim, a abundância de GPAC poderia ser um preditor do resultado da cicatrização de feridas (37).

A imunidade prejudicada e alterações no microambiente em pacientes com diabetes podem influenciar a composição do microbioma cutâneo (38). No entanto, os dados sobre o microbioma cutâneo desses pacientes são escassos. Um estudo que comparou os componentes fúngicos e bacterianos do microbioma da pele entre pacientes com DM2 e indivíduos saudáveis, com amostras de esfregaço de pele do antepé plantar de 17

pacientes com DM2 e 18 indivíduos saudáveis para conduzir um estudo transversal, observou um microbioma cutâneo diferencial, principalmente para fungos, em pacientes com diabetes tipo 2 em comparação com controles saudáveis. *Trichophyton rubrum* foi mais abundante nas amostras. Os resultados sugerem que deve-se prestar atenção a fungos e bactérias e fornecer estratégias adequadas de prevenção e terapêutica para complicações cutâneas diabéticas, incluindo DFUs.

A patogênese dos DFUs é governada por um ambiente complexo de fatores ambientais e do hospedeiro e o tratamento empírico é inicialmente baseado na gravidade da ferida, uma vez que a cultura e o perfil da sensibilidade aos antibióticos de microrganismos associados à ferida são demorados. (39)

Uma análise de escalonamento dimensional não pode discriminar claramente as amostras com base nos níveis de hemoglobina glicada. A abordagem de sequenciamento revelou a presença das principais espécies cultiváveis, mesmo em amostras sem crescimento bacteriano na abordagem baseada em cultura. Assim, indica que (i) a composição da comunidade microbiana central varia com a gravidade da ferida, (ii) a distribuição das espécies polimicrobianas é individual específica e (iii) a suscetibilidade aos antibióticos varia de acordo com os indivíduos. Portanto, há uma necessidade de detecção rápida e precisa dessas comunidades polimicrobianas, para o gerenciamento eficaz de feridas. Isso pode reduzir a morbidade e mortalidade associadas às DFUs, ao mesmo tempo que impede o surgimento de microrganismos multirresistentes (40).

Para demonstrar se existem alterações na composição do microbioma cutâneo da pele não afetada entre pacientes com úlcera por pressão, em comparação com aqueles sem úlcera por pressão, (41) analisou-se o microbioma cutâneo da pele não afetada de 15 pacientes com úlceras de pressão sacrais, em comparação com 15 pacientes sem úlceras de pressão. O estudo demonstrou que a variação interindividual da microbiota cutânea de pacientes com úlcera por pressão foi significativamente maior.

A infecção e a formação de biofilme são dois dos principais impedimentos da cicatrização de feridas, sugerindo um papel importante para o microbioma dessas feridas. O conteúdo bacteriano da superfície da ferida de 20 pacientes ambulatoriais com feridas crônicas, antes e imediatamente após o desbridamento, bem como a pele sã, não expressou nenhuma diferença entre o microbioma da superfície da ferida original e aquele exposto por um único episódio de desbridamento acentuado, sugerindo que este não alterou diretamente o microbioma da ferida.

No entanto, aeróbios e, especialmente, anaeróbios facultativos, foram significativamente associados a feridas que não cicatrizaram em 6 meses. O gênero anaeróbio facultativo *Enterobacter* foi significativamente associado à falta de cicatrização. Os resultados sugerem que a abundância de anaeróbios facultativos é um fator prognóstico negativo no microbioma de feridas crônicas, possivelmente devido ao aumento da robustez dessas comunidades a diferentes ambientes metabólicos (42).

Em contrapartida (43), comparou-se dois métodos, cultivo e sequenciamento de rRNA 16S, para a caracterização de populações bacterianas em *swabs* e tecidos de biópsia obtidos de 45 feridas crônicas. O sequenciamento provou ser vantajoso em comparação com o cultivo, principalmente no caso de comunidades microbianas altamente diversas, onde pode-se, adicionalmente, detectar numerosas bactérias anaeróbias obrigatórias e facultativas de gêneros *Anaerococcus*, *Finegoldia*, *Porphyromonas*, *Morganella* e *Providencia*.

Em um estudo, (44) que teve como objetivo usar o sequenciamento de alto rendimento do gene 16S rRNA para investigar as alterações no microbioma da pele do pé de 52 pacientes com diabetes mellitus, divididos em 4 grupos de estudo: controles saudáveis (n = 13); pacientes com diabetes de curto prazo (<2 anos; n=13); pacientes com diabetes de

médio prazo (5-8 anos; n = 13); e pacientes com diabetes de longa duração (>10 anos; n=13), os esfregaços foram analisados da pele intacta do arco do pé, usando sequenciamento de rRNA16S.

A diversidade filogenética do microbioma variou significativamente entre os grupos de estudo, mas foram semelhantes dentro do mesmo grupo. Em pacientes com DM, os filos microbianos dominantes da pele foram *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Bacteroidetes*. O sequenciamento do gene 16S rRNA mostrou mudanças dinâmicas no microbioma da pele do pé durante a progressão do diabetes mellitus. Esses achados reforçam a importância de compreender o papel da microbiota da pele na patogênese da DFU (44).

Assim, a obtenção de amostras adequadas de DFUs, onde há suspeita de infecção, é de grande importância. Neste sentido, *swabs* pareados e biópsias de tecido foram coletados de DFUs e ambas as técnicas de amostragem foram comparadas, usando sequenciamento do gene 16S rRNA. A abundância bacteriana média determinada por qPCR foi significativamente menor nas biópsias de tecido. As biópsias de tecido exibiram uma maior diversidade geral de bactérias em relação aos esfregaços. No entanto, com base em uma análise de presença/ausência de todas as amostras emparelhadas, a frequência de ocorrência de bactérias de gêneros de patógenos conhecidos e potenciais, foi geralmente maior em esfregaços de feridas, do que em biópsias de tecido (45).

Os estudos atuais têm mostrado que a comunidade microbiana na superfície da pele deve ter um estado ideal, que pode efetivamente regular a tolerância imunológica e ajudar a evitar a invasão de bactérias patogênicas externas, então o corpo pode estar em um estado relativamente saudável. Assim, a teoria da disbiose da microbiota da pele pode nos ajudar a entender melhor o mecanismo de formação de feridas e os problemas encontrados no tratamento de feridas, incluindo as feridas crônicas que não cicatrizam.

Sobre esse aspecto, (46) a prevenção de lesões por pressão recorrentes (RPIs) é um dos desafios importantes enfrentados na área de saúde, mas os fatores de risco dos RPIs não foram totalmente revelados. A hidratação da pele mais baixa e/ou o aumento de *Staphylococcus* pode ter um potencial para ser usado como um biomarcador para a previsão de RPIs, ou pode ser um ponto de intervenção para a prevenção de RPIs por, por exemplo, limpeza da pele com cuidados hidratantes. (47)

Nesse contexto, (48) afirma-se que a DFU cicatriza mal quando a terapia padrão de tratamento é aplicada. Na verdade, a cicatrização de feridas ocorre apenas aproximadamente 30% em 12 semanas e apenas 45% independentemente do tempo em que o tratamento padrão é utilizado. Da mesma forma, as DFIs ocorrem em metade de todas as DFU e as culturas microbiológicas convencionais podem levar vários dias para serem processadas antes que o resultado seja conhecido. As DFU representam um desafio significativo a esse respeito, porque as DFU, frequentemente, demonstram crescimento polimicrobiano, tornam-se resistentes à terapia antibiótica preferida e não informam os provedores sobre o prognóstico em longo prazo.

Em um estudo observacional prospectivo, (49) para avaliar a riqueza e diversidade de bactérias em amostras de DFIs, usando uma abordagem de culturômica, os achados da cultura bacteriana de amostras de feridas foram analisados, juntamente com as características clínicas e os resultados do tratamento. No referido estudo, a maioria das amostras eram polimicrobianas (N=38; 88,3%). De todas as espécies isoladas, as mais prevalentes foram: *S. aureus* (N=28; 52,8%), *Enterococcus faecalis* (N = 24; 45,2%), *E. cloacae* (N=12; 22,6%), *Staphylococcus lugdunensis* (N = 10; 18,7%), *S. epidermidis* (N =6; 11,3%), *Proteus mirabilis* (N = 6; 11,3%) e *Finogoldia magna* (N =5; 9,4%). O único fator associado à melhora da ferida, após um acompanhamento de 1 mês, foi a presença de *E. faecalis* quando comparado com pacientes sem melhora da ferida.

Em comunidades sem um ou ambos os patógenos dominantes, relações mutualísticas, incluindo *Staphylococcus sp./Acinetobacter sp.*, *Pseudomonas sp./Serratia sp.* e *Streptococcus sp./Enterococcus sp.* foram previstas. Prevê-se que as interações mutualísticas sejam impulsionadas pela alimentação cruzada de ácidos orgânicos, álcoois e aminoácidos, que podem ser potencialmente interrompidos, para retardar a progressão da doença em feridas crônicas. (50).

Observou-se um maior número de bactérias relacionadas ao intestino, menos comensais, maior pH da pele e menor TEWL na pele sacral de pacientes mais velhos acamados, do que na de indivíduos mais velhos ou jovens ambulatoriais. Esses achados implicam em funções distintas do microbioma e das funções fisiológicas da pele em pacientes idosos acamados, em comparação com indivíduos saudáveis, e podem sugerir a necessidade de limpeza mais rigorosa da pele de pacientes idosos acamados, devido à proximidade da pele e do microbioma da ferida.

Principais gêneros de microrganismos encontrados nos estudos:

Tendo em vista a busca realizada, 23 dos 28 artigos apresentam métodos de identificação dos microrganismos presentes em feridas crônicas. Dessa forma, apresentam-se na Tabela 1 a seguir os principais microrganismos evidenciados nos estudos selecionados a nível de gênero.

Tabela 1 – Principais gêneros encontrados e métodos de identificação utilizados, de acordo com os respectivos tipos de feridas apresentados pelos pacientes do estudo.

Tipo de ferida	Nº de pacientes	Método de identificação (método de amostragem)	Principais gêneros de microrganismos encontrados	Referência
DFU	8	Sequenciamento da região V4 do gene 16S do RNA ribossomal (swab da lesão e tecido de desbridamento).	<i>Staphylococcus</i> , <i>Acinetobacter</i> e <i>Corynebacterium</i> .	Gardiner M. et al. 2017.
	70	Cultura microbiológica e testes bioquímicos (aspirados de pus ou amostra de tecidos moles).	<i>Escherichia</i> , <i>Staphylococcus</i> e <i>Pseudomonas</i> .	Noor, S. et al. 2016.
	100	Sequenciamento das regiões V1 a V3 do gene 16S do RNA ribossomal (swab da lesão).	<i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> e <i>Corynebacterium</i> .	Loesche, et al. 2017.
	39	Sequenciamento do gene 16S do RNA ribossomal (biópsia da lesão).	<i>Staphylococcus</i> , <i>Corynebacterium</i> e <i>Finegoldia</i>	Malone M. et al. 2017.
	43	MALDI-TOF e Sequenciamento do gene 16S do RNA ribossomal (raspado e swab da lesão).	<i>Staphylococcus</i> , <i>Enterococcus</i> e <i>Enterobacter</i> .	Jneid J. et al. 2018.
	20	Sequenciamento das regiões V1 a V3 do gene 16S do RNA ribossomal (tecido de desbridamento).	<i>Pseudomonas</i> , <i>Bacteroides</i> e <i>Enterococcus</i> .	Park et al. 2019.
	28	Sequenciamento do gene 16S do RNA ribossomal (swab da lesão).	<i>Corynebacterium</i> , <i>Staphylococcus</i> e <i>Enterobacteriaceae</i>	Sloan T.J. et al. 2019.

	100	Sequenciamento metagenômico shotgun.	<i>Staphylococcus</i> , <i>Corynebacterium</i> e <i>Pseudomonas</i> .	Kalan L.R. et al. 2019.
	23	Sequenciamento das regiões V1 a V3 do gene 16S do RNA ribossomal (biópsia da lesão).	<i>Bacteroides</i> , <i>Streptococcus</i> e <i>Staphylococcus</i> .	MacDonald A. et al. 2019.
	10	Sequenciamento do gene 16S do RNA ribossomal (tecido de desbridamento).	<i>Staphylococcus</i> , <i>Corynebacterium</i> e <i>Arthrobacter</i> .	Min K.R. et al. 2020.
	122	Sequenciamento do gene 16S do RNA ribossomal (swab da lesão).	<i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> e <i>Staphylococcus</i> .	Jnana A. et al. 2020.
	20	Sequenciamento do gene 16S do RNA ribossomal (swab da lesão e biópsia do tecido lesionado).	<i>Streptococcus</i> , <i>Corynebacterium</i> e <i>Staphylococcus</i> .	Travis, J. et al. 2020.
	353	Cultura microbiológica (swab da lesão).	<i>Staphylococcus</i> , <i>Enterococcus</i> e <i>Pseudomonas</i> .	Dörr S. et al. 2021.
Lesão por pressão	31	Sequenciamento das regiões V3 e V4 do gene 16S do RNA ribossomal (swab da lesão e curativos).	<i>Escherichia</i> , <i>Corynebacterium</i> e <i>Staphylococcus</i> .	Nagase, S. et al. 2020.
	15	Sequenciamento do gene 16S do RNA ribossomal (swab da lesão).	<i>Staphylococcus</i> , <i>Enterococcus</i> e <i>Corynebacterium</i> .	de Wert L.A. et al. 2020.
	30	Sequenciamento das regiões V3 e V4 do gene 16S do RNA ribossomal (fita aderida à lesão).	<i>Staphylococcus</i> , <i>Corynebacterium</i> e <i>Delftia</i> .	Shibata K. et al. 2021.
Diversos tipos de feridas	43	Sequenciamento por PCR da região 16S (disco de filtro de papel com curativo).	<i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus</i> e <i>Achromobacter</i> .	Wolcott, et al. 2016.
	167	Sequenciamento do gene 16S do RNA ribossomal (tecido de desbridamento).	<i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus</i> e <i>Corynebacterium</i>	Tipton C.D. et al. 2017.
	35	Sequenciamento do gene 16S do RNA ribossomal (swab da lesão).	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas</i> e <i>Enterococcus</i> .	Wu, M. et al. 2018.
	60	Sequenciamento do gene 16S do RNA ribossomal (swab da lesão).	<i>Staphylococcus</i> , <i>Corynebacterium</i> e <i>Pseudomonas</i> .	Choi Y. et al. 2019.
	2.963	Sequenciamento do gene 16S do RNA ribossomal (diversos métodos utilizados).	<i>Staphylococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> e <i>Corynebacterium</i> .	Phalak P., Henson M.A. 2019.
	20	Sequenciamento das regiões V1 a V3 do gene 16S do RNA ribossomal (swab da lesão).	<i>Staphylococcus</i> , <i>Corynebacteria</i> e <i>Propionibacteria</i> .	Verbanic, S. et al. 2020.
	45	Cultura microbiológica e sequenciamento do gene 16S do RNA ribossomal (swab da lesão e biópsia do tecido lesionado).	<i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus</i> e <i>Enterococcus</i> .	Mahnic A. et al. 2021.

Dessa forma, conforme demonstrado no Quadro 1 temos, em ordem decrescente, os gêneros mais prevalentes nos estudos revisados, com suas respectivas frequências e porcentagens de citações como microrganismos mais presentes em feridas crônicas, frente ao total de artigos incluídos para a presente categoria. São eles: *Staphylococcus* (21 de 23; 91%), *Corynebacterium* (14 de 23; 61%), *Pseudomonas* (11 de 23; 48%), *Enterococcus* (6 de 23; 26%), *Streptococcus* (3 de 23; 13%), *Enterobacter* (3 de 23; 13%), dentre outros, conforme apresentado na figura 2 abaixo.

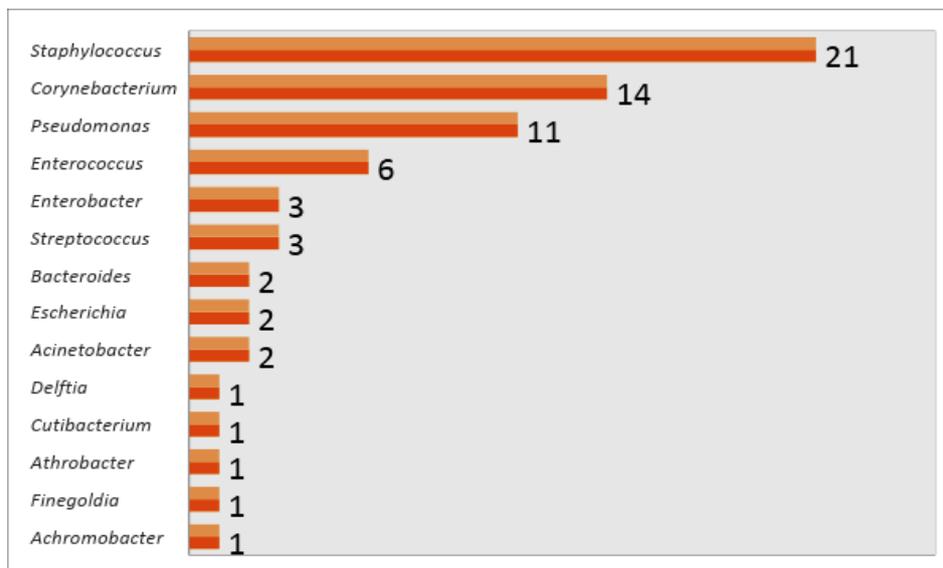


Figura 2 – Prevalência dos gêneros de microrganismos

Os estudos apresentaram números variados de pacientes, de acordo com sua disponibilidade e contexto em que estavam inseridos. Em relação aos métodos de identificação, foi feito principalmente o sequenciamento do gene 16S do rRNA (20; 77%), tendo também sido realizados ensaios de cultura microbiológica (4; 15%), testes bioquímicos (1; 4%) e sequenciamento metagenômico *shotgun* (1; 4%). Tradicionalmente, o método de sequenciamento do gene 16S rRNA é o mais empregado na identificação dos microrganismos em feridas crônicas.

Métodos de sequenciamento baseados em *amplicon* independentes de cultura (como o sequenciamento de rRNA bacteriano e fúngico) destacam a natureza polimicrobiana e temporalmente dinâmica da microbiota bacteriana e fúngica que coloniza DFUs. No entanto, apenas um *insight* limitado é obtido com esses métodos em relação ao papel da microbiota da ferida nos resultados, complicações e cicatrização do paciente (1).

A principal limitação de tais abordagens é a fraca resolução taxonômica, que impede a identificação precisa da espécie ou a nível de cepa. Evidências crescentes sugerem que cepas geneticamente distintas dentro de uma única espécie, têm diferenças funcionais importantes, que influenciam as interações com seu hospedeiro. Por exemplo, dentro do gênero *Staphylococcus* estão as espécies comensais de pele e o patógeno *S. aureus*. Clinicamente, *S. aureus* seria considerado diferente de *S. epidermidis* comensal. Assim, sua classificação é crítica para determinar estratégias de tratamento eficazes (1).

Dessa forma, mostra-se a importância da aplicação de métodos de identificação que possibilitem a caracterização dos microrganismos presentes em feridas crônicas a nível de espécie, como possibilitado nos estudos de Kalan e colaboradores (2019), através do sequenciamento metagenômico *shotgun*, e Jneid e colaboradores (2018), através do método proteômico MALDI-TOF.

Dada a aplicação de métodos de identificação diversos entre os estudos, e por vezes a falta de maior detalhamento no que concerne às espécies encontradas, foram destacados três dos principais gêneros de microrganismos encontrados em feridas crônicas dos pacientes participantes em cada pesquisa, levando em conta aqueles que estiveram presentes em um número maior de feridas e em maior abundância nessas feridas.

4. Conclusão

Acredita-se que o microbioma da pele desempenhe papéis importantes na defesa da pele e no funcionamento imunológico. Neste sentido, pesquisadores em todo o mundo vêm desenvolvendo estudos em busca do tratamento e da cura das feridas crônicas, tendo em vista que o diabetes afeta o ambiente da pele e isso pode perturbar o seu microbioma, com possíveis implicações para infecções da pele e cicatrização de feridas.

Os principais gêneros de microrganismos que agem na infecção das feridas descritos na literatura pesquisada foram: *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas* e *Enterococcus*. A principal limitação das abordagens de pesquisas que envolvem a caracterização da microbiota da ferida crônica, é a fraca resolução taxonômica, que impede a identificação precisa da espécie ou a nível de cepa.

Ficou evidenciado, que a forma de tratamento é um fator importante para a sua cicatrização, tendo em vista que ela pode influenciar na composição da microbiota da ferida, pois, segundo os resultados das pesquisas analisadas, o desbridamento é uma técnica que modifica o microbioma de uma forma benéfica para a cicatrização da ferida. Assim, os cuidados adequados a serem empreendidos pela enfermagem são primordiais para este fim.

Agradecimento

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq. Os autores declaram inexistência de conflitos de interesse.

5. Referências

1. Kalan LR, Meisel JS, Loesche MA, Horwinski J, Soaita I, Chen X, Uberoi A, Gardner SE, Grice EA. 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): 641-655.
2. Dhall S, Do DC, Garcia M, Kim J, Mirebrahim SH, Lyubovitsky J, Lonardi S, Nothnagel EA, Schiller N, Martins-Green M. Generating and reversing chronic wounds in diabetic mice by manipulating wound redox parameters. *J Diabetes Res*. 2014; 2014: 562625.
3. Bowler R, Gaebler J, Lin Y, Tan TR, Hanneke D, Jost JD, Home JP, Leibfried D, Wineland DJ. Coherent diabatic ion transport and separation in a multizone trap array. *Phys Rev Lett*. 2012; 109(8):080502
4. Valencia IC, Chang A, Kisner RS, et al. Eosinophilic fasciitis responsive to treatment with pulsed steroids and cyclosporine. *Int J Dermatol* 1999; 38:369-72.
5. Beebe SE, Rao IM, Blair MW, Acosta-Gallegos JA. Phenotyping common beans for adaptation to drought. *Front Physiol*. 2013; 6: 4:35
6. Bouslimani A, Porto C, Rath CM, Wang M, Guo Y, Gonzalez A, Berg-Lyon D, Ackermann G, Moeller Christensen GJ, Nakatsuji T, Zhang L, Borkowski AW, Meehan MJ, Dorrestein K, Gallo RL, Bandeira N, Knight R, Alexandrov T, Dorrestein PC. Molecular cartography of the human skin surface in 3D. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112(17): E2120-9.
7. Pang M, Yao Z, Chen C, Lei X, Cheng B. Human-microorganism mutualism theory: Possible mechanisms for the delayed chronic wound healing process. *Med Hypotheses*. 2020; 141:109720.
8. Gardiner M, Vicaretti M, Sparks J, Bansal S, Bush S, Liu M, Darling A, Harry E, Burke CM. A longitudinal study of the diabetic skin and wound microbiome. *PeerJ*. 2017; 5: e3543.
9. Sapico FL, Reeves D, Wexler HM, Duncan J, Wilson KH, Finegold SM. Preliminary study using

- species-specific oligonucleotide probe for rRNA of *Bilophila wadsworthia*. *J Clin Microbiol.* 1994; 32(10): 2510-3
10. Jones CS. 1985. An empirical study of the evidence for contingency theories of management accounting systems in conditions of rapid change. *Accounting, Organizations and Society.* 1985; 10(3): 303-328.
 11. Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H. Phytochemical Screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia.* 2011; 1 (1): 98- 106.
 12. Noor S, Ahmad J, Parwez I, Ozair M. Culture-Based Screening of Aerobic Microbiome in Diabetic Foot Subjects and Developing Non-healing Ulcers. *Front Microbiol.* 2016; 7:1792.
 13. Wolcott R, Sanford N, Gabriliska R, Oates JL, Wilkinson JE, Rumbaugh KP. Microbiota is a primary cause of pathogenesis of chronic wounds. *J Wound Care.* 2016; 25(Sup10): S33-S43.
 14. Noor S, Ahmad J, Parwez I, Ozair M. Culture-Based Screening of Aerobic Microbiome in Diabetic Foot Subjects and Developing Non-healing Ulcers. *Front Microbiol.* 2016; 7:1792.
 15. Loesche M, Gardner SE, Kalan L, Horwinski J, Zheng Q, Hodkinson BP, Tyldsley AS, Franciscus CL, Hillis SL, Mehta S, Margolis DJ, Grice EA. Temporal Stability in Chronic Wound Microbiota Is Associated With Poor Healing. *J Invest Dermatol.* 2017; 137(1) :237-244.
 16. Malone M, Johani K, Jensen SO, Gosbell IB, Dickson HG, Hu H, Vickery K. Next Generation DNA Sequencing of Tissues from Infected Diabetic Foot Ulcers. *EBioMedicine.* 2017; 21:142-149.
 17. Tipton CD, Mathew ME, Wolcott RA, Wolcott RD, Kingston T, Phillips CD. Temporal dynamics of relative abundances and bacterial succession in chronic wound communities. *Wound Repair Regen.* 2017; 25(4): 673-679.
 18. Wu M, Li Y, Guo D, Kui G, Li B, Deng Y, Li F. Microbial Diversity of Chronic Wound and Successful Management of Traditional Chinese Medicine. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2018; 2018:9463295
 19. Park C, Rosenblat JD, Brietzke E, Pan Z, Lee Y, Cao B, Zuckerman H, Kalantarova A, McIntyre RS. Stress, epigenetics and depression: A systematic review. *Neurosci Biobehav Rev.* 2019; 102:139-152.
 20. Park JU, Oh B, Lee JP, Choi MH, Lee MJ, Kim BS. Influence of Microbiota on Diabetic Foot Wound in Comparison with Adjacent Normal Skin Based on the Clinical Features. *Biomed Res Int.* 2019; 2019: 7459236.
 21. Sloan TJ, Turton JC, Tyson J, Musgrove A, Fleming VM, Lister MM, Loose MW, Sockett RE, Diggle M, Game FL, Jeffcoate W. Examining diabetic heel ulcers through an ecological lens: microbial community dynamics associated with healing and infection. *J Med Microbiol.* 2019; 68(2):230-240.
 22. Choi Y, Banerjee A, McNish S, Couch KS, Torralba MG, Lucas S, Tovchigrechko A, Madupu R, Yooseph S, Nelson KE, Shanmugam VK, Chan AP. Co-occurrence of Anaerobes in Human Chronic Wounds. *Microb Ecol.* 2019; 77(3): 808-820.
 23. MacDonald A, Brodell JD, Daiss JL, Schwartz EM, Oh I. Evidence of differential microbiomes in healing versus non-healing diabetic foot ulcers prior to and following foot salvage therapy. *J Orthop Res.* 2019; 37(7): 1596-1603.
 24. Phalak P, Henson MA. Metabolic modelling of chronic wound microbiota predicts mutualistic interactions that drive community composition. *J Appl Microbiol.* 2019; 127(5): 1576-1593.
 25. Kim JH, Ruegger PR, Lebig EG, VanSchalkwyk S, Jeske DR, Hsiao A, Borneman J, Martins-Green M. High Levels of Oxidative Stress Create a Microenvironment That Significantly Decreases the Diversity of the Microbiota in Diabetic Chronic Wounds and Promotes Biofilm Formation. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020; 10:259.
 26. Min KR, Galvis A, Baquerizo Nole KL, Sinha R, Clarke J, Kirsner RS, Ajdic D. Association between baseline abundance of *Peptoniphilus*, a Gram-positive anaerobic coccus, and wound healing outcomes of DFUs. *PLoS One.* 2020; 15(1): e0227006. .
 27. Han SH, Lee JS, Song KH, Choe YB, Ahn KJ, Lee YW. Differences in foot skin microbiomes between patients with type 2 diabetes and healthy individuals. *Mycoses.* 2020; 63(3): 314-322.
 28. Álvarez-Rodríguez II, Castaño-Tostado E, García-Gutiérrez DG, et al. Non-Targeted Metabolomic Analysis Reveals Serum Phospholipid Alterations in Patients with Early Stages of Diabetic Foot Ulcer. *Biomarker Insights.* 2020; 15:1177271920954828.
 29. Jnana A, Muthuraman V, Varghese VK, Chakrabarty S, Murali TS, Ramachandra L, Shenoy KR, Rodrigues GS, Prasad SS, Dendukuri D, Morschhauser A, Nestler J, Peter H, Bier FF, Satyamoorthy K. Microbial Community Distribution and Core Microbiome in Successive Wound Grades of Individuals with Diabetic Foot Ulcers. *Appl Environ Microbiol.* 2020; 86(6): e02608-19.
 30. De Wert LA, Rensen SS, Soons Z, Poeze M, Bouvy ND, Penders J. The cutaneous microbiome in hospitalized patients with pressure ulcers. *Sci Rep.* 2020; 10(1):5963.
 31. Verbanic S, Shen Y, Lee J, Deacon JM, Chen IA. Microbial predictors of healing and short-term effect of debridement on the microbiome of chronic wounds. *NPJ Biofilms Microbiomes.* 2020; 6(1):21.

32. Mahnic A, Breznik V, Bombek Ihan M, Rupnik M. Comparison Between Cultivation and Sequencing Based Approaches for Microbiota Analysis in Swabs and Biopsies of Chronic Wounds. *Front Med (Lausanne)*. 2021; 8: 607255.
33. Pang M, Zhu M, Lei X, Chen C, Yao Z, Cheng B. Changes in Foot Skin Microbiome of Patients with Diabetes Mellitus Using High-Throughput 16S rRNA Gene Sequencing: A Case Control Study from a Single Center. *Med Sci Monit*. 2020; 26:e921440.
34. Travis J, Malone M, Hu H, Baten A, Johani K, Huygens F, Vickery K, Benkendorff K. 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.
35. Shibata K, Ogai K, Ogura K, Urai T, Aoki M, Arisandi D, Takahashi N, Okamoto S, Sanada H, Sugama J. Skin Physiology and its Microbiome as Factors Associated with the Recurrence of Pressure Injuries. *Biol Res Nurs*. 2021; 23(1): 75-81.
36. Dörr S, Freier F, Schlecht M, Lobmann R. Bacterial diversity and inflammatory response at first-time visit in younger and older individuals with diabetic foot infection (DFI). *Acta Diabetol*. 2021; 58(2):181-189.
37. Park JU, Oh B, Lee JP, Choi MH, Lee MJ, Kim BS. Influence of Microbiota on Diabetic Foot Wound in Comparison with Adjacent Normal Skin Based on the Clinical Features. *Biomed Res Int*. 2019; 2019: 7459236
38. Jneid J, Cassir N, Schuldiner S, Jourdan N, Sotto A, Lavigne JP, La Scola B. Exploring the Microbiota of Diabetic Foot Infections With Culturomics. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018; 18:282.
39. Phalak P, Henson MA. Metabolic modelling of chronic wound microbiota predicts mutualistic interactions that drive community composition. *J Appl Microbiol*. 2019; 127(5): 1576-1593.
40. Nagase S, Ogai K, Urai T, Shibata K, Matsubara E, Mukai K, Matsue M, Mori Y, Aoki M, Arisandi D, Sugama J, Okamoto S. Distinct Skin Microbiome and Skin Physiological Functions Between Bedridden Older Patients and Healthy People: A Single-Center Study in Japan. *Front Med (Lausanne)*. 2020; 7:101.
41. Turner KH, Everett J, Trivedi U, Rumbaugh KP, Whiteley M. Requirements for *Pseudomonas aeruginosa* acute burn and chronic surgical wound infection. *PLoS Genet*. 2014; 10(7): e1004518.
42. Rahim K, Saleha S, Zhu X, Huo L, Basit A, Franco OL. Bacterial Contribution in Chronicity of Wounds. *Microb Ecol*. 2017; 73(3): 710-721.
43. Shen C, Sun L, Zhu N, Qi F. Kindlin-1 contributes to EGF-induced re-epithelialization in skin wound healing. *Int J Mol Med*. 2017; 39(4): 949-959.
44. Serra R, Grande R, Butrico L, Rossi A, Settimio UF, Caroleo B, Amato B, Gallelli L, de Franciscis S. Chronic wound infections: the role of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2015; 13(5): 605-13.
45. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG Jr. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*. 2015; 28(3): 603-61.
46. Vance RE, Rietsch A, Mekalanos JJ. Role of the type III secreted exoenzymes S, T, and Y in systemic spread of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in vivo. *Infect Immun*. 2005; 73(3): 1706-13.
47. Vieira CPB, Araújo TME. Prevalência e fatores associados a feridas crônicas em idosos na atenção básica. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*. 2018; (52):e03415.
48. Vyas KS, Wong LK. Detection of biofilm in wounds as an early indicator for risk for tissue infection and wound chronicity. *Annals of Plastic Surgery*. 2016; 76(1): 127-31.
49. de Oliveira FP, Pires BMFB, de Cássia Ferreira de Almeida Silva K, de Carvalho BTF, Teixeira LA, de Paula GR, de Oliveira BGRB. Prevalence, Antimicrobial Susceptibility, and Clonal Diversity of *Pseudomonas aeruginosa* in Chronic Wounds. *J Wound Ostomy Continence Nurs*. 2017; 44(6): 528-535
50. Pires BMFB, de Oliveira FP, de Oliveira BGRB, Fuly PDSC, Ferreira-Carvalho BT, de Paula GR, Teixeira LA. Monitoring and Molecular Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolated from Chronic Wounds. *Adv Skin Wound Care*. 2018; 31(9): 399-405.
51. Chen YE, Fischbach MA, Belkaid Y. Skin microbiota-host interactions. *Nature*. 2018; 553(7689):427-436.
52. Whittam AJ, Maan ZN, Duscher D, Wong VW, Barrera JA, Januszyk M, Gurtner GC. Challenges and Opportunities in Drug Delivery for Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2016; 5(2): 79-88.