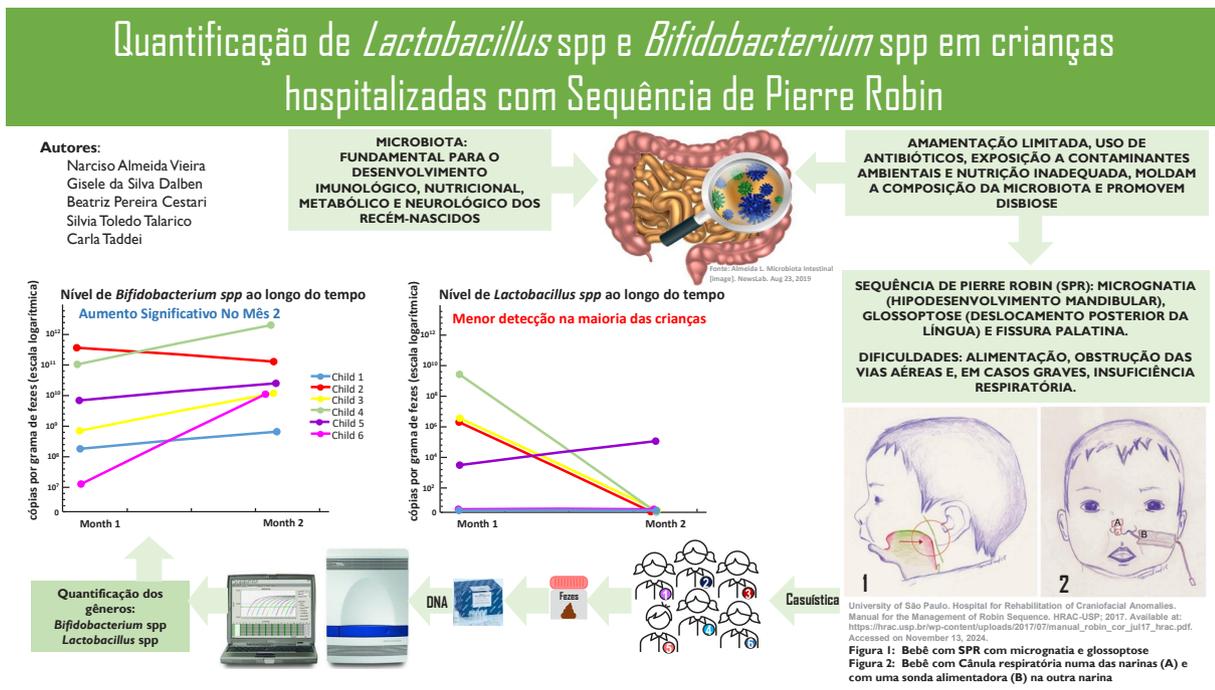


Quantificação de *Lactobacillus* spp e *Bifidobacterium* spp em crianças hospitalizadas com sequência de Pierre Robin

Narciso Almeida Vieira¹  Gisele da Silva Dalben²  Beatriz Pereira Cestari³  Silvia Toledo Talarico⁴ 
Carla R. Taddei⁵ 

¹Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo - Campus de Bauru – FOB/USP. Bauru/SP, Brasil.
²Departamento de Odontopediatria, Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo – Campus de Bauru - HRAC/USP. Bauru/SP, Brasil.
³Laboratório de Análises Clínicas, Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo – Campus de Bauru - HRAC/USP. Bauru/SP, Brasil.
⁴Faculdades Oswaldo Cruz. São Paulo/SP, Brasil.
⁵Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo - FCF/USP. São Paulo/SP, Brasil.
Email: vieirana@usp.br

Resumo Gráfico



Resumo

O objetivo foi detectar e quantificar *Bifidobacterium* spp e *Lactobacillus* spp na microbiota intestinal (MI) de crianças com seqüência de Pierre Robin (SPR) nos primeiros e segundos meses de vida, para verificar possíveis influências no estabelecimento definitivo da MI. Desenho: Estudo longitudinal e descritivo. Local: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais. Participantes: Seis crianças, um menino e cinco meninas, que foram hospitalizadas para o manejo de sua condição, avaliadas durante o primeiro (M1) e o segundo (M2) meses de vida. Intervenções: Amostras de fezes foram coletadas e analisadas por extração de DNA para quantificação dos gêneros anaeróbios *Bifidobacterium* spp e *Lactobacillus* spp. Dados socioeconômicos e clínicos sobre as crianças também foram coletados. Principais medidas de desfecho: O número de cópias de espécies bacterianas foi calculado para cada amostra fecal. O gênero *Bifidobacterium* estava presente em todas as crianças analisadas, com aumento significativo em M2 para cinco crianças. O número de cópias por grama de fezes variou de $1,8 \times 10^7$ a $5,5 \times 10^{11}$ em M1 e de $4,2 \times 10^8$ a $3,0 \times 10^{12}$ em M2. O gênero *Lactobacillus* não esteve presente em todas as crianças, sendo detectado em quantidades baixas, com uma média variando de $8,5 \times 10^3$ a $9,7 \times 10^8$ cópias por grama de fezes em M1. Em M2, apenas uma criança apresentou uma quantificação de $8,1 \times 10^4$, enquanto duas outras crianças mostraram ausência do microrganismo em M1 e M2. A colonização bacteriana do trato gastrointestinal de crianças com SPR é influenciada por fatores clínicos e ambientais específicos. Uma microbiota intestinal saudável é essencial para o desenvolvimento e a imunidade dos recém-nascidos, mas os desafios associados à SPR afetam a diversidade da microbiota.

Palavras-chave: Sequência de Pierre Robin. Microbiota Fecal. Microbiota Intestinal.

INTRODUÇÃO

A colonização inicial da microbiota intestinal é fundamental para o desenvolvimento imunológico, nutricional, metabólico e neurológico dos recém-nascidos. A presença de bactérias benéficas, como aquelas fornecidas pela amamentação, apoia a saúde neonatal ao entregar oligossacarídeos, células imunológicas e outros componentes essenciais¹. Os primeiros anos de vida representam uma janela crítica para adquirir e estabilizar uma comunidade microbiana saudável, que influencia diretamente o sistema imunológico. O conceito dos "primeiros 1000 dias de vida" foi proposto para enfatizar a importância dos cuidados de saúde desde a concepção até o segundo ano de vida².

Vários fatores durante a infância, incluindo amamentação limitada, uso de antibióticos, exposição a contaminantes ambientais e nutrição inadequada, moldam a composição da microbiota ao promover bactérias patogênicas em detrimento de simbiontes benéficos. Esse desequilíbrio pode levar ao aumento da permeabilidade intestinal, produção desregulada de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e inflamação sistêmica, afetando, em última análise, a saúde geral mais tarde na vida^{3,4}. Tais interrupções estão associadas a riscos aumentados de doenças inflamatórias, diabetes, obesidade

e alergias.

A microbiota intestinal humana desempenha um papel vital na saúde e nutrição do hospedeiro desde seu estabelecimento. Em média, aos dois anos de idade, a diversidade de microrganismos está estabelecida para interagir com o hospedeiro ao longo da vida. A população de colônias é composta essencialmente por bactérias anaeróbicas e aeróbicas, alcançando de 10^{10} a 10^{14} microrganismos por grama de fezes⁵⁻¹³. Fatores intrínsecos e extrínsecos, como dieta, uso de antibióticos, idade, localização geográfica, terapias medicamentosas, doenças entéricas, malformações craniofaciais, status socioeconômico, nutrição, tipo de parto e amamentação moldam especificamente a microbiota de cada indivíduo^{6,8-13,14-23}.

A microbiota fornece efeitos protetores ao hospedeiro, como estímulo ao sistema imunológico e secreção de citocinas anti-inflamatórias, inibição do crescimento de microrganismos patogênicos, melhora da absorção de nutrientes essenciais e síntese de vitaminas^{7,12}. Em contrapartida, quando há desequilíbrio, observa-se uma associação notável com diarreia, danos hepáticos, carcinogênese, infecções e putrefação intestinal²⁴.

Presume-se que o trato gastrointestinal humano é colonizado por mais de 500 espécies

de microrganismos, e o número de bactérias cultiváveis representa apenas 20-30%. Assim, técnicas moleculares têm sido aplicadas para conhecer melhor a composição microbiana. A técnica de PCR em tempo real (qPCR) é utilizada para determinar o número exclusivo de bactérias por iniciadores desenhados para regiões específicas do gene 16S rRNA. Esta técnica é muito sensível em comparação com o PCR clássico, pois é possível detectar células bacterianas por grama de fezes em baixas concentrações²⁵⁻²⁹. Dessa forma, esse método foi selecionado para analisar a participação de bactérias anaeróbias na comunidade microbiana intestinal do grupo de crianças com Sequência de Pierre Robin (SPR)²⁶.

Poucos estudos investigaram a microbiota intestinal em recém-nascidos com malformações craniofaciais, como a SPR, que requer tratamento específico e multidisciplinar para reabilitação completa. A SPR é caracterizada por uma tríade de anomalias: micrognatia (hipodesenvolvimento mandibular), *glossoptose*

(deslocamento posterior da língua) e fissura palatina, que juntos levam a dificuldades de alimentação, obstrução das vias aéreas e, em casos graves, insuficiência respiratória. Estudos sugerem um envolvimento genético, incluindo regiões como 4q32-qter e SOX9 (17q24.3-q25.1), indicando uma patogênese complexa. No Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo (HRAC-USP), os pacientes recebem cuidados multidisciplinares para apoiar a reabilitação e a integração social³⁰⁻³³.

Considerando a importante ação da microbiota intestinal para a saúde humana e a falta de estudos sobre crianças com SPR, este estudo teve como objetivo detectar e quantificar bactérias dos gêneros *Bifidobacterium* spp e *Lactobacillus* spp que compõem a microbiota intestinal de crianças com SPR atendidas no HRAC-USP nos primeiros e segundos meses de vida, para verificar possíveis influências para o estabelecimento definitivo da microbiota intestinal.

MATERIAL E MÉTODO

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HRAC-USP em 26 de junho de 2012. Os pais ou responsáveis assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

Coleta de amostras

Foi conduzido um estudo longitudinal descritivo em seis crianças com SPR, um menino e cinco meninas, durante o primeiro (M1) e o segundo (M2) meses de vida, analisadas quanto ao perfil da microbiota intestinal (MI), detectando e quantificando bactérias dos gêneros *Bifidobacterium* sp e *Lactobacillus* sp, bem como fatores externos de colonização, tais como idade, localização geográfica, terapias medicamentosas, nível socioeconômico, estado nutricional, tipo de parto, amamentação e uso de antibióticos. Os pais ou responsáveis foram entrevistados em salas privadas e, após explicação sobre o estudo, assina-

ram o termo de consentimento e receberam frascos estéreis para o armazenamento das amostras. A coleta de fezes foi realizada no momento da hospitalização, após a entrevista e autorização dos pais ou responsáveis. Após a coleta, as fezes foram imediatamente enviadas ao Laboratório Clínico do HRAC-USP e mantidas sob refrigeração a -80°C até a avaliação da MI.

Informações clínicas

As crianças do presente estudo foram atendidas por profissionais do HRAC-USP desde o primeiro mês de vida, e as informações diárias estavam disponíveis nos prontuários dos pacientes. Assim, foi possível verificar que todas as crianças nasceram por parto cirúrgico, sendo cinco a termo e uma com 34 semanas de gestação, considerada prematura (criança 4). Cinco famílias eram de nível socioeconômico médio e uma de nível médio-baixo. Em

geral, os pais tinham bom nível educacional e alta renda; as famílias moravam em casas de alvenaria próprias, com acesso a energia elétrica, água encanada e sistema de esgoto adequado. A maioria das crianças com SPR não foi amamentada devido à glossoptose e disfagia; no entanto, duas mães conseguiram bombear e oferecer leite materno em mamadeira para as crianças durante 3 dias (criança 4) e 20 dias (criança 6), junto com a fórmula.

Foram observados eventos como disfagia, dificuldade respiratória e de alimentação, uso de sondas nasofaríngea e nasogástrica e refluxo. Três crianças receberam dieta hiper-calórica com polímeros de glicose (PG), triglicerídeos de cadeia média (TCM) e fórmula infantil 1 (F1). Todas as seis crianças receberam medicamentos para o estômago, refluxo e náusea, e apenas uma não recebeu ranitidina, um medicamento que reduz a produção de ácido estomacal. A criança 1 usou diferentes antibióticos: ampicilina (7 dias); eritromicina (7 dias); cefepima (9 dias); e azitromicina (7 dias).

Extração de DNA

O DNA das amostras coletadas a seco foi obtido usando o kit QIAmp DNA Stool Mini (Qiagen) para isolamento do DNA genômico bacteriano das amostras fecais, de acordo com as recomendações do fabricante²⁸. Para obter o DNA bacteriano utilizado na curva padrão, foi obtida a curva de crescimento das bactérias quantificadas. As reações de quantificação com iniciadores para quantificação dos gêneros anaeróbios *Bifidobacterium* spp e *Lactobacillus* spp e a construção da curva padrão foram padronizadas. A concentração de iniciadores foi determinada para alcançar uma eficiência entre 90 e 110% e a reação foi otimizada para um volume final de 20 µL, sendo 2 µL de DNA extraído de fezes e o volume restante composto por mix, iniciadores e sondas²⁸.

Alíquotas dos pontos de leitura da fase log de crescimento dos microrganismos quantificados foram congeladas até a utilização. A partir dessas alíquotas, o DNA foi extraído usando o kit Wizard Genomic DNA Purification

(Promega), conforme as instruções do fabricante. A PCR em tempo real foi realizada em um equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). As bactérias anaeróbias (*Bifidobacterium animalis subsp lactis* HN019 e *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356) foram inoculadas em caldo *Lactobacilli* MRS (Difco) e incubadas por 24h, em anaerobiose, a 37°C^{28,34}.

A população de *Bifidobacterium* spp foi quantificada usando o sistema TaqMan®, o que permitiu definir as concentrações dos iniciadores em 300 nM, tanto para forward quanto para reverse, e 250 nM para a sonda com repórter FAM e quencher NFQ-MGB, pois nessas condições a eficiência da reação foi de 90,516%. Um total de cinco diluições decimais seriadas de DNA genômico de *Bifidobacterium animalis subsp lactis* HN019 foi usado para a construção da curva padrão. O ponto inicial na curva tinha concentração de 5,3 ng/µL. A quantificação de *Lactobacillus* spp foi realizada usando o sistema SYBR-Green®, com os iniciadores e sondas descritos por Furet et al.²⁸, com concentrações de 300 nM para iniciadores forward e reverse, apresentando eficiência de 93,237%. A curva de melting evidenciou a especificidade da reação. Um total de cinco diluições decimais seriadas de DNA genômico de *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356 foi usado para a construção da curva padrão, e o ponto inicial tinha uma concentração de 10,1 ng/µL.

O ciclo de *threshold*, número de ciclos no qual a eficiência de detecção de fluorescência é de 100% (região de crescimento exponencial), foi monitorado²⁸. As quantificações das amostras foram calculadas no software Excel, com o valor do ciclo de *threshold* (Ct) obtido durante o teste. Esses valores foram inseridos na equação obtida a partir da curva padrão construída. Os valores obtidos foram corrigidos de acordo com as diluições das amostras³⁰⁻³³.

O número de cópias de espécies bacterianas foi calculado para cada amostra fecal, com base nos valores de Ct, usando as curvas padrão construídas³⁵⁻³⁹.

RESULTADOS

Aos dois meses, houve uma presença significativa do gênero *Bifidobacterium* spp na microbiota das crianças. Todas as crianças apresentaram grande quantidade de *Bifidobacterium* spp e baixa quantidade de *Lactobacillus* spp, o que determinou o perfil de colonização de cada uma.

Os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* foram quantificados no primeiro e no segundo meses de vida de seis crianças com SPR. O gênero *Bifidobacterium* estava presente em todas as crianças analisadas e apresentou um aumento significativo no número de cópias/g de fezes no segundo mês para cinco crianças. No entanto, uma criança apresentou uma leve diminuição (Tabela 2), demonstrando que não houve um padrão na colonização. O número de cópias/g de fezes variou

de $1,8 \times 10^7$ a $5,5 \times 10^{11}$ em M1 e de $4,2 \times 10^8$ a $3,0 \times 10^{12}$ cópias/g de fezes.

O gênero *Lactobacillus* não estava presente em todas as crianças, sendo detectado em baixa quantidade, com uma média variando de $8,5 \times 10^3$ a $9,7 \times 10^8$ cópias/g de fezes em M1, e em M2 apenas uma criança apresentou uma quantificação de $8,1 \times 10^4$. Outras duas crianças (números 1 e 6) apresentaram ausência do microrganismo em M1 e M2.

A quantificação das bactérias de acordo com a amamentação evidenciou que as crianças 1 e 6, que receberam leite materno, tiveram um aumento em *Bifidobacterium* spp e redução ou ausência total de *Lactobacillus* spp, assim como as outras crianças. Cada criança apresentou um perfil microbiológico fecal específico.

Tabela 1 - Informações clínicas de crianças hospitalizadas com Sequência de Pierre Robin, incluindo gênero, origem, uso de medicamentos antiácidos, nível socioeconômico, dieta e amamentação, Bauru, SP.

Criança nº	Gênero	Origem	Uso de Ranitidina	Nível Socioeconômico	Tipo de parto	Dieta Hipercalórica	Aleitamento Materno	TFFA	SNF	SNG
1	F	GO	Sim	Médio	Cirúrgico	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
2	F	SP	Sim	Médio	Cirúrgico	Não	Não	Sim	Sim	Sim
3	F	SC	Não	Médio	Cirúrgico	Não	Não	Sim	Sim	Sim
4	F	SP	Sim	Superior	Cirúrgico	Sim	Sim	Não	Não	Sim
5	M	AL	Sim	Médio	Cirúrgico	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
6	F	RJ	Sim	Médio	Cirúrgico	Não	Sim	Não	Sim	Sim

Legenda: AL = Alagoas; GO = Goiás; RJ = Rio de Janeiro; SC = Santa Catarina; SP = São Paulo.

F – Feminino

M – Masculino

TFFA – Técnica Facilitadora da Alimentação

SNF – Sonda Nasofaríngea

SNG – Sonda Nasogástrica

Tabela 2 - Quantificação do número de cópias de DNA/g de fezes, Bauru, SP.

SISTEMA ALVO	<i>Bifidobacterium</i> spp		<i>Lactobacillus</i> spp	
	TaqMan® 300/300/250nM Vol 20µL		SYBR® Green I 300/300nM Vol 20µL	
	Criança nº.	M1	M2	M1
1	1.5E+08	4.2E+08	0.0	0.0
2	5.5E+11	1.4E+11	1.6E+06	0.0
3	9.7E+08	2.4E+10	2.4E+06	0.0
4	1.1E+11	3.0E+12	9.7E+08	0.0
5	8.8E+09	2.9E+10	8.5E+03	8.1E+04
6	1.8E+07	8.2E+09	0.0	0.0

M1 = Primeiro mês de vida
M2 = Segundo mês de vida

DISCUSSÃO

A microbiota é composta por diversos microrganismos que colonizam o hospedeiro desde o nascimento e se estabilizam por volta dos dois anos de idade. O desenvolvimento da interação entre microrganismos e hospedeiro gera um ambiente saudável, importante para a saúde humana. Esses microrganismos atuam como fonte de antígenos inespecíficos e imunomoduladores, estimulando respostas imunológicas locais e sistêmicas e influenciando o número e a distribuição da população de células do tecido linfóide associadas ao intestino, além de atuarem na defesa contra patógenos invasores^{7,8,12}. No entanto, vários fatores influenciam o estabelecimento e a estabilidade da microbiota, incluindo dieta^{6,9-11,13,21}, uso de antibióticos^{12,15}, idade^{8,15}, localização geográfica^{14,17,18}, terapias medicamentosas^{19,20}, doenças entéricas⁴⁰, malformações craniofaciais²³ e estado hormonal³¹.

Este estudo identificou diferenças significativas na composição da microbiota intestinal em um pequeno grupo de crianças com SPR ao quantificar os gêneros bacterianos *Bifidobacterium sp* e *Lactobacillus sp*.

As bactérias do gênero *Bifidobacterium* spp fazem parte da microbiota do trato gastrointestinal inferior dos humanos e não têm patogenicidade. Alguns de seus benefícios conhecidos incluem a melhoria do valor nutricional de alguns alimentos, o controle de infecções intestinais em crianças, atividade anticancerígena, ativação do sistema imunológico e proteção contra infecções por microrganismos patogênicos. *Lactobacillus* spp são usados em suplementação nutricional, pois atuam como um tratamento eficaz na prevenção e combate de várias doenças, sem risco de atacar ou intoxicar o organismo. Como protegem a microbiota intestinal, a suplementação terapêutica com *Lactobacillus* é recomendada durante e após a terapia com antibióticos^{41,42}.

Esses dois gêneros bacterianos são conhecidos como organismos probióticos e são definidos como microrganismos vivos usados como suplementos alimentares para melhorar a saúde do hospedeiro quando administrados na dosagem correta. São agentes terapêuticos que acidificam a microbiota intestinal, prevenindo assim o desenvolvimento de microrganismos patogênicos. Eles

também desempenham um papel antibacteriano e anti-inflamatório e podem alterar a composição microbiana⁴².

A maioria das crianças com SPR neste estudo são do sexo feminino, o que está de acordo com os relatos de Meyer *et al.*⁴³ e Pinheiro Neto *et al.*⁴⁴.

Um fator que pode influenciar a microbiota do recém-nascido é o tipo de parto. Nesse momento, principalmente durante o parto normal, o bebê tem contato com bactérias da microbiota vaginal e fecal da mãe ou com bactérias do ambiente; durante o parto cirúrgico, provavelmente há contato com instrumentos cirúrgicos e a presença da mãe com sinais de afeto, como beijos. Nesta pesquisa, verificou-se que todas as crianças nasceram por parto cirúrgico, concordando com os dados de Vieira & Pereira⁴⁵.

De acordo com os resultados (Tabela 1), a maioria das crianças não foi amamentada. Com a amamentação e o consumo de oxigênio do lúmen intestinal, podem surgir gêneros bacterianos, como *Bifidobacterium* spp, que podem variar em quantidade dependendo do tempo de amamentação, já que o leite humano apresenta fatores de crescimento para esse respectivo gênero; *Lactobacillus* spp; *Bacteroides* spp; *Eubacterium* spp; entre outros. Todas as crianças foram colonizadas por *Bifidobacterium* spp e em maior quantidade do que *Lactobacillus* spp durante os primeiros sessenta dias de vida. Este resultado foi semelhante aos estudos realizados por Talarico²⁹.

A amamentação, junto com a introdução de fórmulas suplementares e alimentos sólidos, está relacionada ao desenvolvimento de populações estritamente anaeróbias⁴². Isso favorece um aumento na quantidade de bactérias dos gêneros *Bifidobacterium* spp e *Lactobacillus* spp, conforme descrito por Vael; Desager⁴⁶. O gênero *Lactobacillus* spp não foi encontrado em todas as crianças, diferindo dos estudos de Talarico²⁹, mas semelhante aos de Jost *et al.*⁴⁷, que quantificaram esse gênero em uma amostra de sete crianças.

Ao nascer, devido ao contato com a mi-

crobiota materna, ambiente e outros fatores externos, o recém-nascido terá uma população diversa de bactérias que se estabilizará após o segundo ano de vida⁵. A importância desses microrganismos é tão relevante que um dos principais gêneros colonizadores, como *Bifidobacterium* spp, é usado para o tratamento e prevenção de doenças gastrointestinais⁴⁸.

De acordo com Vandenplas *et al.*⁴⁹, o equilíbrio da microbiota também pode ser alterado pelo uso de medicamentos, mudando sua composição e abrindo caminho para microrganismos patogênicos. Vieira *et al.*⁴⁵ mostraram que a quantidade de alguns gêneros, como *Bifidobacterium* spp e *Lactobacillus* spp, é significativamente reduzida após 24 horas de uso de cefazolina em cirurgias de reparo palatal, o que pode gerar complicações negativas para o hospedeiro. O presente estudo revelou que a maioria das crianças utilizou ranitidina (antiácido). O efeito dos antibióticos na composição da microbiota intestinal nesse grupo de crianças demonstrou heterogeneidade durante o período do estudo. Foi possível observar uma mudança no perfil da microbiota em algumas crianças, de acordo com o grupo e o período. De acordo com alguns autores, o tratamento com antibióticos causa distúrbios nos padrões esperados de *Bifidobacterium* spp e crescimento excessivo de enterobactérias¹⁷. O presente estudo revelou que o uso de medicamentos antimicrobianos interfere na variabilidade individual da microbiota intestinal.

O uso de técnicas moleculares para avaliar a diversidade, variabilidade individual e complexidade da microbiota tem sido aplicado nos estudos mais recentes, independentemente da cultura microbiológica. A qPCR é um procedimento usado para detectar e quantificar bactérias específicas, usando iniciadores desenhados para reconhecer regiões específicas do rRNA; assim, é possível detectar células bacterianas por grama de amostra fecal em concentrações mais baixas em comparação com a técnica convencional^{25,26-28}.

CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que o estabelecimento da microbiota intestinal em crianças com SPR é influenciado por fatores clínicos e ambientais, com variabilidade significativa na composição bacteriana entre os indivíduos. Uma microbiota intestinal saudável é vital para a saúde imunológica e o desenvolvimento dos recém-nascidos; no entanto, crianças com SPR enfrentam desafios únicos que dificultam o estabelecimento de uma microbiota

equilibrada. Esses achados ressaltam a importância de estratégias de cuidados personalizadas para pacientes com SPR, incluindo intervenção precoce para promover a amamentação e o uso cauteloso de antibióticos. Além disso, pesquisas futuras devem se concentrar em comparar pacientes com SPR com controles saudáveis para entender as divergências em relação ao esperado e suas possíveis implicações.

Declaração de autor CRediT

Conceituação: Vieira, NA; Neves, CTC. Metodologia: Vieira, NA; Neves, CTC; Talarico, ST. Validação: Vieira, NA; Neves, CTC; Dalben, GS. Análise estatística: Vieira, NA. Análise formal: Vieira, NA; Neves, CTC; Talarico, ST; Cestari, BP. Investigação: Vieira, NA; Neves, CTC; Talarico, ST; Cestari, BP. Recursos: Vieira, NA; Neves, CTC. Redação - preparação do rascunho original: Vieira, NA; Neves, CTC; Dalben, GS. Redação - revisão e edição: Vieira, NA; Neves, CTC; Dalben, GS. Visualização: Vieira, NA; Neves, CTC; Dalben, GS; Cestari, BP. Supervisão: Vieira, NA; Neves, CTC. Administração do projeto: Vieira, NA; Neves, CTC.

Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

REFERÊNCIAS

1. Carr LE, Virmani MD, Rosa F, Munblit D, Matazel KS, Elolimy AA, et al. Role of human milk bioactives on infants' gut and immune health. *Front Immunol*. 2021;12:604080. doi: 10.3389/fimmu.2021.604080.
2. Robertson RC, Manges AR, Finlay BB, Prendergast AJ. The human microbiome and child growth - first 1000 days and beyond. *Trends Microbiol*. 2019;27(2):131-47. doi: 10.1016/j.tim.2018.09.008.
3. Davis EC, Castagna VP, Sela DA, Hillard MA, Lindberg S, Mantis NJ, et al. Gut microbiome and breast-feeding: implications for early immune development. *J Allergy Clin Immunol*. 2022;150(3):523-34. doi: 10.1016/j.jaci.2022.07.014.
4. Enav H, Bäckhed F, Ley RE. The developing infant gut microbiome: a strain-level view. *Cell Host Microbe*. 2022;30(5):627-38. doi: 10.1016/j.chom.2022.04.009.
5. Bullen CL, Tearle PV, Willis AT. Bifidobacteria in the intestinal tract of infants: an in vivo study. *J Med Microbiol*. 1976;9:325-33. doi: 10.1099/00222615-9-3-325.
6. Hentges DJ. Fecal flora of volunteers on controlled diets. *Am J Clin Nutr*. 1978;31(10 Suppl). doi: 10.1093/ajcn/31.10.S123.
7. Van der Waaij D. Colonization resistance of the digestive tract: Clinical consequences and implications. *J Antimicrob Chemother*. 1982;10(4):263-70. doi: 10.1093/jac/10.4.263.
8. Moreau MC, Coste M. Immune responses to dietary protein antigens. *World Rev Nutr Diet*. 1993;74:22-57. doi: 10.1159/000422601.
9. Gibson GR, Wang X. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J Appl Bacteriol*. 1994;77(4):412-20. doi: 10.1111/j.1365-2672.1994.tb03443.x.
10. Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JL. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62(4):1157-70. doi: 10.1128/mmbr.62.4.1157-1170.1998.
11. Tannock GW. Analysis of the intestinal microflora: a renaissance. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1999;76(1-4):265-78. doi: 10.1023/A:1002038308506.
12. Monreal MTFD, Pereira PCM, Lopes CAM. Intestinal microbiota of patients with bacterial infection of the respiratory tract treated with amoxicillin. *Braz J Infect Dis*. 2005;9(4):292-300. doi: 10.1590/S1413-86702005000400005.
13. Aldeberth I, Word AE. Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatr*. 2009;98(2):229-38. doi: 10.1111/j.1651-2227.2008.01060.x.
14. Finegold SM. Interaction of antimicrobial therapy and intestinal microflora. *Am J Clin Nutr*. 1970;23(11):1466-71. doi: 10.1093/ajcn/23.11.1466.
15. Haenel H. Human normal and abnormal gastrointestinal flora. *Am J Clin Nutr*. 1970;23(11):1433-9. doi: 10.1093/ajcn/23.11.1433.
16. Bhat P, Shantakumari S, Rajan D, Mathan VI, Kapadia CR, Swarnabai C, et al. Bacterial flora of the gastrointestinal tract in southern Indian control subjects and patients with tropical sprue. *Gastroenterology*. 1971;62:11-21.

17. Mata LJ, Jejicanos ML, Jiménez F. Studies on the indigenous gastrointestinal flora of Guatemalan children. *Am J Clin Nutr.* 1972;25(12):1380-90. doi: 10.1093/ajcn/25.12.1380.
18. Moore WEC, Holdeman LV. Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl Environ Microbiol.* 1974;27(5):961-79. doi: 10.1128/am.27.5.961-979.1974.
19. Nordenvall B, Hallberg D, Larsson L, Nord CE. The effect of clindamycin on the intestinal flora in patients with enteric hyperoxaluria. *Scand J Gastroenterol.* 1983;18(2):177-81. doi: 10.3109/00365528309181580.
20. Kurpad AV, Shetty PS. Effects of antimicrobial therapy on fecal bulking. *Gut.* 1986;27(1):55-8. doi: 10.1136/gut.27.1.55.
21. Marteau P, Pochart P, Flourié B, Pellier P, Santos L, Desjeux JF, et al. Effect of chronic ingestion of fermented dairy product containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on metabolic activities of the colonic flora in humans. *Am J Clin Nutr.* 1990;52(4):685-8. doi: 10.1093/ajcn/52.4.685.
22. Salminen S, Isolauri E, Onnela T. Gut flora in normal and disordered states. *Chemotherapy.* 1995;41(Suppl 1):5-15. doi: 10.1159/000239391.
23. Mitchell DK, Lidsky ME, Sampson DE, Lander TA, Liu M, Sidman JD. Prospective study of toxigenic *Clostridium difficile* in children given amoxicillin/clavulanate for otitis media. *Pediatr Infect Dis J.* 1996;15(6):514-9. doi: 10.1097/00006454-199606000-00008.
24. Gronlund MM, Gueimonde M, Laitinen K, Kociubinski G, Grönroos T, Salminen S, et al. Maternal breast-milk and intestinal bifidobacteria guide the compositional development of the *Bifidobacterium* microbiota in infants at risk. *Clin Exp Allergy.* 2007;37(12):1764-72. doi: 10.1111/j.1365-2222.2007.02849.x.
25. Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Kado Y, Takada T, Matsumoto K, et al. Quantitative PCR with 16S rRNA-Genetargeted Species-Specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(1):167-73. doi: 10.1128/AEM.70.1.167-173.2004.
26. Furrie E. A molecular revolution in the study of intestinal microflora. *Gut.* 2006;55(2):141-3. doi: 10.1136/gut.2005.081695.
27. Mathys S, Lacroix C, Mini R, Meile L. PCR and real-time PCR primers developed for identification of *Bifidobacterium thermophilum* in faeces. *BMC Microbiol.* 2008;8:179. doi: 10.1186/1471-2180-8-179.
28. Furet JP, Firmesse O, Gourmelon M, Bridonneau C, Tap J, Mondot S, et al. Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiol Ecol.* 2009;68(3):351-62. doi: 10.1111/j.1574-6941.2009.00671.x.
29. Talarico ST, Santos FE, Brandt KG, Martinez MB, Taddei CR. Anaerobic bacteria in the intestinal microbiota of Brazilian children. *Clinics (Sao Paulo).* 2017;72(3):154-60. doi: 10.6061/clinics/2017(03)05.
30. Silva KCP, Messias TS, Dalben GS, Vieira NA. Male individuals with Robin Sequence: emerging significant association with ABO and RhD blood group phenotypes. *Hematol Transfus Cell Ther.* 2018;40(4):354-7. doi: 10.1016/j.htct.2018.03.009.
31. Marques IL, Sousa TV, Carneiro AF, Peres SPBA, Barbieri MA, Bettiol H. Sequência de Robin: protocolo único de tratamento. *J Pediatr.* 2005;81(1):14-22. doi: 10.1590/S0021-75572005000100005.
32. Mondini CCSD, Fontes CMB, Trettene AS, Cianciarullo TI, Lazarini IM. Applicability of Orem: training of caregiver of infant with Robin Sequence. *Rev Bras Enferm.* 2018;71(suppl 3):1469-73. doi: 10.1590/0034-7167-2016-0562.
33. Jakobsen LP, Knudsen MA, Lespinasse J, García AC, Ramos C, Frys JP, et al. A base genética da Sequência de Pierre Robin. *Cleft Palate Craniofac J.* 2006;43(2):155-9.
34. Rinttilä T, Kassinen A, Malinen E, Krogius L, Palva A. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *J Appl Microbiol.* 2004;97(6):1166-77. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02409.x.
35. Bolotin A, Wincker P, Mauger S, Jaillon O, Malarne K, Weissenbach J, et al. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* 2001;11:731-53. doi: 10.1101/gr-1697r.
36. Altermann E, Russell WM, Azcarate-Peril MA, Barrangou R, Buck BL, McAuliffe O, et al. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCIM. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(11):3906-12. doi: 10.1073/pnas.0409188102.
37. Durfee T, Nelson R, Baldwin S, Plunkett G 3rd, Burland V, Mau B, et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. *J Bacteriol.* 2008;190(7):2597-606. doi: 10.1128/JB.01695-07.
38. Barrangou R, Briczinski EP, Traeger LL, Loquasto JR, Richards M, Horvath P, et al. Comparison of the complete genome sequences of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSM 10140 and Bl-04. *J Bacteriol.* 2009;191(13):4144-51. doi: 10.1128/JB.00155-09.
39. Zhang T, Shao MF, Fang HHP. A qRT-PCR-based method for the measurement of *rrn* operon copy number. *Lett Appl Microbiol.* 2009;49:26-30. doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02613.x.
40. Hasan N, Yang H. Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. *PeerJ.* 2019;7. doi: 10.7717/peerj.7502.
41. Okoniewski A, Dobrzyńska M, Kusiak P, Dziedzic K, Przysławski J, Drzymała-Czyż S. The Role of Fermented Dairy Products on Gut Microbiota Composition. *Fermentation.* 2023;9(3):231. doi: 10.3390/fermentation9030231.
42. Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr.* 1999;69(suppl):1035S-45S. doi: 10.1093/ajcn/69.5.1035s.
43. Meyer AC, Ottenhof S, Moroi MK, Limberger I, Furtado FM, Antunes NL. Airway interventions in children with Pierre Robin Sequence. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008;138(6):782-7. doi: 10.1016/j.otohns.2008.03.002.
44. Pinheiro Neto CD, Alonso N, Sennes LU, Goldenberg DC, Santoro PP. Avaliação polissonográfica e de videoendoscopia da deglutição de pacientes portadores da sequência de Pierre-Robin. *Braz J Otorrinolaringol.* 2009;75(6):852-6. doi: 10.1590/S1808-86942009000600014.
45. Vieira NA, Borgo HC, Dalben GS, Bachega MI, Pereira PCM. Evaluation of fecal microorganisms of children with cleft palate before and after palatoplasty. *Braz J Microbiol.* 2013;44(3):835-8. doi: 10.1590/S1517-83822013000300026.
46. Vael C, Desager K. The importance of the development of the intestinal microbiota in infancy. *Curr Opin Pediatr.* 2009;21(6):794-800. doi: 10.1097/MOP.0b013e328323251b.

47. Jost T, Lacroix C, Braegger CP, Chassard C. New insights in gut microbiota establishment in healthy breastfed neonates. *PLoS One*. 2012;7(8). doi: 10.1371/journal.pone.0044595.
48. Langendijk PS, Schut F, Jansen GJ, Raangs GC, Kamphuis GR, Wilkinson MH, et al. Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61(8):3069-75. doi: 10.1128/aem.61.8.3069-3075.1995.
49. Vandenplas Y, Veereman-Wauters G, De Greef E, Peeters S, Casteels A, Mahler T, et al. Probiotics and prebiotics in prevention and treatment of diseases in infants and children. *J Pediatr (Rio J)*. 2011;87(4):292-300. doi: 10.2223/JPED.2103.

Recebido: 06 maio 2024.
Aceito: 28 outubro 2024.
Publicado: 22 novembro 2024.