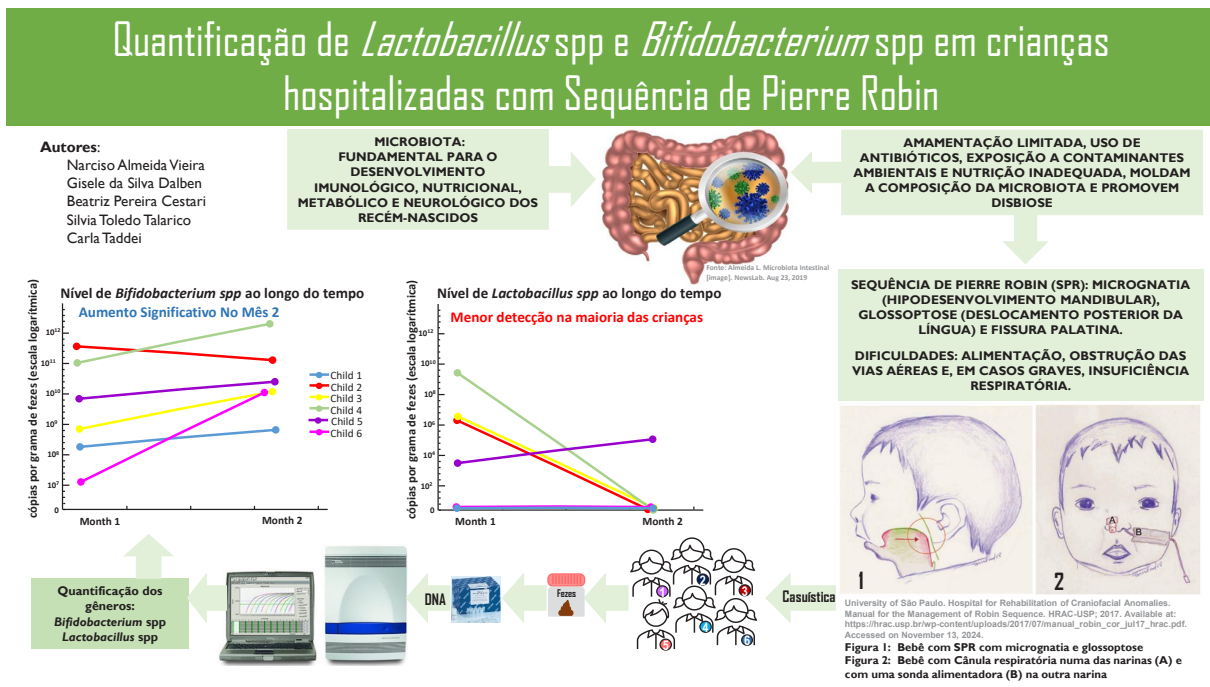


# Quantificação de *Lactobacillus* spp e *Bifidobacterium* spp em crianças hospitalizadas com sequência de Pierre Robin

Narciso Almeida Vieira<sup>1</sup>  Gisele da Silva Dalben<sup>2</sup>  Beatriz Pereira Cestari<sup>3</sup>  Silvia Toledo Talarico<sup>4</sup>   
Carla R. Taddei<sup>5</sup> 

<sup>1</sup>Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo - Campus de Bauru – FOB/USP. Bauru/SP, Brasil.  
<sup>2</sup>Departamento de Odontopediatria, Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo – Campus de Bauru - HRAC/USP. Bauru/SP, Brasil.  
<sup>3</sup>Laboratório de Análises Clínicas, Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo – Campus de Bauru - HRAC/USP. Bauru/SP, Brasil.  
<sup>4</sup>Faculdades Oswaldo Cruz. São Paulo/SP, Brasil.  
<sup>5</sup>Departamento 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 sequência 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 essenciais<sup>1</sup>. 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 vida<sup>2</sup>.

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<sup>3,4</sup>. 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 fezes<sup>5-13</sup>. 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<sup>6,8-13,14-23</sup>.

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<sup>7,12</sup>. Em contrapartida, quando há desequilíbrio, observa-se uma associação notável com diarreia, danos hepáticos, carcinogênese, infecções e putrefação intestinal<sup>24</sup>.

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 concentrações<sup>25-29</sup>. 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)<sup>26</sup>.

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 social<sup>30-33</sup>.

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 fabricante<sup>28</sup>. 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 sondas<sup>28</sup>.

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<sup>28,34</sup>.

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.<sup>28</sup>, 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 monitorado<sup>28</sup>. 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 amostras<sup>30-33</sup>.

O número de cópias de espécies bacterianas foi calculado para cada amostra fecal, com base nos valores de Ct, usando as curvas padrão construídas<sup>35-39</sup>.

## 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<sup>7,8,12</sup>. No entanto, vários fatores influenciam o estabelecimento e a estabilidade da microbiota, incluindo dieta<sup>6,9-11,13,21</sup>, uso de antibióticos<sup>12,15</sup>, idade<sup>8,15</sup>, localização geográfica<sup>14,17,18</sup>, terapias medicamentosas<sup>19,20</sup>, doenças entéricas<sup>40</sup>, malformações craniofaciais<sup>23</sup> e estado hormonal<sup>31</sup>.

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<sup>41,42</sup>.

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 microbiana<sup>42</sup>.

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

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 & Pereira<sup>45</sup>.

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 Talarico<sup>29</sup>.

A amamentação, junto com a introdução de fórmulas suplementares e alimentos sólidos, está relacionada ao desenvolvimento de populações estritamente anaeróbias<sup>42</sup>. Isso favorece um aumento na quantidade de bactérias dos gêneros *Bifidobacterium* spp e *Lactobacillus* spp, conforme descrito por Vael; Desager<sup>46</sup>. O gênero *Lactobacillus* spp não foi encontrado em todas as crianças, diferindo dos estudos de Talarico<sup>29</sup>, mas semelhante aos de Jost *et al.*<sup>47</sup>, 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 vida<sup>5</sup>. 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 gastrointestinais<sup>48</sup>.

De acordo com Vandenplas *et al.*<sup>49</sup>, o equilíbrio da microbiota também pode ser alterado pelo uso de medicamentos, mudando sua composição e abrindo caminho para microrganismos patogênicos. Vieira *et al.*<sup>45</sup> 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 enterobactérias<sup>17</sup>. 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<sup>25,26-28</sup>.

## 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, Matzkel 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.