

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

BEATRIZ PEREIRA CESTARI

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE DA MICROBIOTA
FECAL PELA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL
DE RECÉM-NASCIDOS COM SEQUÊNCIA DE ROBIN**

BAURU
2014

BEATRIZ PEREIRA CESTARI

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE DA MICROBIOTA
FECAL PELA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL
DE RECÉM-NASCIDOS COM SEQUÊNCIA DE ROBIN**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Biomedicina, sob orientação do Prof. Dr. Lucas Trevizani Rasmussen.

BAURU
2014

Cestari, Beatriz Pereira.

C422a

Análise da diversidade da microbiota fecal pela técnica de PCR em tempo real de recém-nascidos com Sequência de Robin / Beatriz Pereira Cestari -- 2014.

60f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Trevizani Rasmussen.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina)
– Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. Microbiota Fecal. 2. Recém- nascidos. 3. Sequência de Robin. I. Rasmussen, Lucas Trevizani. II. Título.

BEATRIZ PEREIRA CESTARI

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE DA MICROBIOTA FECAL PELA
TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL DE RECÉM-NASCIDOS COM
SEQUÊNCIA DE ROBIN**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Biomedicina, sob orientação do Prof. Dr. Lucas Trevisani Rasmussen.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Lucas Trevisani Rasmussen
Universidade Sagrado Coração

Dr. Narciso Almeida Vieira
Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais –
Universidade de São Paulo HRAC - USP

Profa. Me. Monica da Silveira
Hospital Estadual/ Bauru – SP

Bauru, 02 de Dezembro de 2014.

Dedico este trabalho aos meus pais Antonio Carlos e Maria Lucia, por todo amor, carinho e motivação em meus estudos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, por me permitir tantas conquistas e chegar aonde cheguei.

À meus pais Carlos e Lucia, pela dádiva da vida, por me proporcionarem a oportunidade de estudar sem medir esforços, por toda dedicação, por todo apoio, carinho e amor durante esta jornada de tantas dificuldades, por tudo que contribuíram para minha formação pessoal e meu crescimento e por todo ensinamento.

À minha irmã Camila e meu cunhado Rodrigo, por todo companheirismo, amor e carinho e por estarem sempre ao meu lado me incentivando e torcendo por mim.

Ao meu orientador Dr. Narciso Vieira, por toda paciência, ensinamento, dedicação, carinho e puxões de orelha e por tudo que contribuiu para meu crescimento humano e profissional. Muito obrigada!

À toda minha família, tios e primos que também sempre estiveram ao meu lado me apoiando, rezando e torcendo pelo meu sucesso.

Aos meus avós paternos Jesuina e Dovair e maternos Benedita e Aurélio (*in memoriam*) que sempre se preocuparam comigo sendo carinhosos, atenciosos e que sempre torceram e rezaram por mim.

Aos meus velhos e novos amigos (Mayara, Kelly, Angélica, Mariana, Lucas), por todo amor e carinho e que mesmo longe, sempre se fizeram presente em minha vida diariamente, torcendo por mim. E todos outros que de algum modo contribuíram para meu crescimento e sucesso.

Às amigas da faculdade (Thaís, Lívia, Thaís, Maria Luiza (Malu), Camila, Fabiane (Fabi)), pelos momentos de dificuldades e de conhecimentos que passamos juntas que nos fizeram crescer e amadurecer. Por todo carinho e amizade, obrigada!

À todos os professores, em especial a coordenadora do curso (Professora Daniela) que sem eles nosso processo de formação nunca seria possível, sendo eles a base de toda educação. Obrigada por todo ensinamento, paciência, puxões de orelha, que serão essenciais para o resto de nossas vidas daqui pra frente. Muito obrigada!

Às colaboradoras do meu trabalho Dra. Carla Taddei de C. Neves e Me. Silvia T. Talarico, que sem a cooperação e ajuda de vocês a realização deste trabalho não seria possível. Muito obrigada!

À Universidade Sagrado Coração que sempre foi muito atenciosa para com seus alunos e que proporcionaram o melhor para nossos estudos e aprendizagem.

Ao Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, aos funcionários do Laboratório de Análises Clínicas, aos funcionários do Departamento de Genética, do Arquivo de Prontuários e a todos que possibilitaram a execução deste trabalho.

Aos pacientes do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais e seus familiares que participaram desta pesquisa tomando todo trabalho possível.

Ao CNPq, pela bolsa de iniciação científica e por sempre apoiar e incentivar as pesquisas dos alunos! Muito obrigada!

“Comece fazendo o necessário, depois o que é possível, e, de repente, você estará fazendo o impossível.”

- São Francisco de Assis

RESUMO

A colonização bacteriana do trato gastrointestinal, a partir do nascimento, envolve vários eventos que podem comprometer a saúde do hospedeiro, principalmente no controle do sistema imunológico. O objetivo do presente estudo foi detectar e quantificar bactérias dos gêneros *Lactobacillus spp* e *Bifidobacterium spp* na microbiota fecal de crianças com Sequência de Robin (SR), atendidas em um hospital especializado no primeiro e segundo mês de vida por meio da técnica de PCR em tempo real. O grupo de estudo foi composto por seis crianças com SR, acompanhadas durante o primeiro (M1) e o segundo (M2) mês de vida. O DNA das fezes foi obtido utilizando o kit *QIAmp DNA Stool Mini* (Quiagem). A reação de qPCR foi realizada em equipamento *7500 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems), utilizando os sistemas *SYBR-Green®* e *TaqMan®* em triplicata. Informação clínica: todas as crianças nasceram de parto cirúrgico; a maioria era do sexo feminino; nível socioeconômico médio; fizeram uso de sonda nasogástrica; receberam dieta hipercalórica; tratamento com antiácido. A média de *Lactobacillus spp* em quatro crianças no M1 variou entre $8,5 \times 10^3$ e $9,7 \times 10^8$ n° de cópias/g de fezes; no M2, duas apresentaram $8,1 \times 10^4$ e $6,6 \times 10^5$ e duas ausência do micro-organismo no M1 e M2. A média de *Bifidobacterium spp* em seis crianças no M1 variou entre $1,8 \times 10^7$ e $5,5 \times 10^{11}$ n° de cópias/g de fezes; no M2 entre $4,2 \times 10^8$ e $3,0 \times 10^{12}$ n° de cópias/g de fezes. Assim, o gênero *Lactobacillus spp* foi encontrado em algumas crianças e em determinados momentos. Houve aumento de *Bifidobacterium spp* do M1 para M2.

Palavras Chaves: Microbiota Fecal, recém- nascidos, Sequência de Robin.

ABSTRACT

Bacterial colonization of the gastrointestinal tract, from birth, involves several events that can compromise the health of the host, especially in controlling the immune system. The aim of this study was to detect and quantify bacteria of the genera *Lactobacillus* spp and *Bifidobacterium* spp on fecal microbiota of children with Robin Sequence (SR) treated in a specialized hospital in the first and second month of life through PCR. The study group was composed of six children with SR, accompanied during the first (M1) and second (M2) month of life. The DNA from faeces was obtained using the QIAmp DNA Stool Mini Kit. The qPCR reaction was carried out in equipment 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using SYBR®-Green and TaqMan® systems in triplicate. Clinical information: all children born cesarean birth; most were female; made use of a nasogastric tube; received high calorie diet; antacid treatment; the families belonged to medium socioeconomic communities. Mean *Lactobacillus* spp in four children in M1 ranged between 8.5×10^3 and 9.7×10^8 copies per milligram of DNA; M2, two had 8.1×10^4 and 6.6×10^5 copies per milligram of DNA and two absence of micro-organism in M1 and M2. The average of *Bifidobacterium* spp in six children in M1 ranged between 1.8×10^7 and 5.5×10^{11} copies per milligram of DNA; M2 between 4.2×10^8 and 3.0×10^{12} copies per milligram of DNA. Thus, the genus *Lactobacillus* spp found in some children and at certain times. There was an increase of *Bifidobacterium* spp from M1 to M2.

Key words: Fecal microbiota, newborns, Robin Sequence.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições da reação de quantificação por qPCR.....	29
Tabela 2 - Distribuição das 6 crianças, com Sequência de Robin de acordo com o sexo. Bauru, SP, 2014.....	33
Tabela 3 - Distribuição das 6 crianças, com Sequência de Robin de acordo com o nível socioeconômico. Bauru, SP, 2014.....	34
Tabela 4 - Distribuição das 6 crianças, com Sequência de Robin de acordo com o nível socioeconômico. Bauru, SP, 2014.....	34
Tabela 5 - Distribuição das 6 crianças Sequência de Robin de acordo com o aleitamento materno. Bauru, SP, 2014.....	35
Tabela 6 - Distribuição das 6 crianças Sequência de Robin de acordo com o uso de ranitidina. Bauru, SP, 2014.....	35
Tabela 7 - Distribuição das 6 crianças Sequência de Robin de acordo com a realização da TFFA. Bauru, SP, 2014.....	36
Tabela 8 - Distribuição das 6 crianças Sequência de Robin de acordo com a utilização da dieta hipercalórica. Bauru, SP, 2014.....	36
Tabela 9 - Distribuição das 6 crianças Sequência de Robin de acordo com a utilização da sonda nasogástrica. Bauru, SP, 2014.....	37
Tabela 10 - Quantificação do número de cópias de DNA/g de fezes.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

MI- Microbiota Intestinal

MF- Microbiota Fecal

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase

SR- Sequencia de Robin

TFFA- TécnicaFonoaudiológicas Facilitadoras da Alimentação

IBP- Inibidores da Bomba Protônica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL:.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	21
3 METODOLOGIA	22
3.1 CASUÍSTICA:.....	22
3.2 MÉTODOS:	22
4 RESULTADOS FINAIS	33
4.1 Caracterização da casuística quanto a sexo	33
4.2 Caracterização da casuística quanto à procedência	33
4.3 Caracterização da casuística quanto ao nível socioeconômico	33
4.4 Caracterização da casuística quanto ao tipo de parto.....	34
4.5 Caracterização da casuística quanto ao aleitamento materno	34
4.6 Caracterização da casuística quanto ao uso de ranitidina	35
4.7 Caracterização da casuística quanto a realização da TFFA	36
4.8 Caracterização da casuística quanto a utilização da dieta hipercalórica. 36	
4.9 Caracterização da casuística quanto ao uso de sonda nasogástrica.....	37
4.10 Quantificação bacteriana nas amostras fecais estudadas.....	37
5 DISCUSSÃO	39
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
REFERÊNCIAS	44
ANEXOS	53

1 INTRODUÇÃO

Em nosso ecossistema intestinal há interações complexas entre o hospedeiro e sua microbiota. Estima-se que o trato gastrintestinal do homem seja colonizado por mais de 500 espécies de micro-organismos. No cólon, a população microbiana alcança entre 10^{10} e 10^{14} células bacterianas por grama de fezes, sendo que o número de bactérias cultiváveis representa apenas 20-30% do total. Portanto, quando tratados de estudos baseados em métodos de cultivo, o conhecimento da Microbiota Intestinal (MI) humana ainda é bastante limitado. (FALK; HOOPER; MIDTVEDT; GORDON, 1998; MONREAL; PEREIRA; LOPES, 2005; ALDEBERTH, 2009).

Até o nascimento o trato gastrintestinal do feto é estéril e começa a ser colonizado quando é exposto aos micro-organismos da mãe e do meio ambiente. Segundo Bullen et. al. (1976), as primeiras colonizações são feitas por *Escherichia coli*, *Clostridium spp* e *Streptococcus spp*. Com a amamentação e o consumo de oxigênio do lúmen intestinal, surgem os gêneros *Bifidobacterium spp* (que pode variar em quantidade dependendo do tempo de amamentação, pois o leite humano apresenta fatores de crescimento para este gênero) e os *Lactobacillus spp* e, em seguida, os *Bacteroides sp*, *Eubacterium spp* e *Peptococcus spp*. Normalmente, o recém-nascido apresenta uma população heterogênea de bactérias nos intestinos, a qual se estabiliza a partir do segundo ano de vida. (BULLEN; TEARLE; WILLIS, 1976).

A microbiota normal é específica para cada hospedeiro, podendo ser dividida em residente (própria do nosso organismo), transitória (passam pelo nosso corpo, mas não persistem por muito tempo, sendo que, alguns desses organismos podem ser patógenos) e oportunista (micro-organismos que causam doenças quando encontram falhas no sistema imunológico, como por exemplo, o uso de antibióticos). (INGRAHAM J.; INGRAHAM C., 2010). A diarreia, infecções, danos hepáticos, carcinogênese e putrefação intestinal são exemplos dos efeitos nocivos que a alteração na microbiota pode causar. A inibição do crescimento de micro-organismos virulentos, melhora da digestão, da absorção de nutrientes essenciais, da síntese de vitaminas, estimulação da resposta imune, participação no metabolismo, promoção de fatores essenciais de crescimento e secreção de citocinas anti-inflamatórias são exemplos de efeitos protetores desenvolvidos pela MI, principalmente por

Bifidobacterium spp e *Lactobacillus spp*. O grupo de *Bacteroides sp.* é capaz de desempenhar ações benéficas e prejudiciais. De acordo com Ryan & Projan (2001), essas bactérias colonizam nosso organismo a não ser que a barreira da mucosa do trato gastrintestinal ou das vias respiratórias esteja lesada. (RYAN; PROJAN, 2001; MONREAL; PEREIRA; LOPES, 2005; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2008).

O intestino humano representa a maior massa de tecido linfóide do corpo e, a partir da sua colonização, bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Bacteroides sp* e Gram-positivas, como *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp*, atuam como fonte de antígenos e imunomoduladores inespecíficos, estimulando resposta imune local e sistêmica, bem como influenciando o número e a distribuição da população de células do tecido linfóide associado ao intestino. (VAN DER WAAIJ, 1982; MONREAL; COSTE, 1993; MONREAL; PEREIRA; LOPES, 2005).

Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de verificar modificações na composição da MI em decorrência de dietas (HENTGES, 1978; DESJEUX; RAMBAUD, 1990; GIBSON; WANG, 1994; FALK; HOOPER; MIDTVEDT; GORDON, 1998; TANNOCK, 1999; MARTEAU; POCHART; FLOURIE; PELLIER; SANTOS; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2008; ALDEBERTH; WORD, 2009), idade (HAENEL, 1970; MOREAU; COSTE, 1993; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2008), localização geográfica (MATA; JEJICANOS; JIMÉNEZ, 1972; MOORE; HOLDEMAN, 1974; SALMINEN; ISOLAURI; ONNELA, 1995), terapias medicamentosas (FINEGOLD, 1970; KURPAD; SHETTY, 1986), doenças entéricas (BHAT; SHANTAKUMARI; RAJAN; MATHAN; KAPADIA; SWARNABAI; BAKER, 1971; NORDENVALL; HALLBERG; LARSSON; NORD, 1983;), estado hormonal (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2008) e a malformação craniofacial. (VIEIRA, 2009). A microbiota normal apresenta funções importantes, como a defesa contra patógenos invasores – “resistência à colonização” ou “efeito barreira” e também impede a proliferação de micro-organismos oportunistas, e os anaeróbios são os principais micro-organismos envolvidos nesse processo. (VAN DER WAAIJ, 1982). Essa resistência está relacionada à competição por substratos, sítios de colonização e à produção de ácidos orgânicos, que inibem o crescimento de muitos patógenos. Alguns tipos de bactérias são capazes de proporcionar resistência a patógenos produzindo “bacteriocinas”, que são substâncias semelhantes a antibióticos, que inibem o crescimento bacteriano de algumas espécies e exercem efeito auto-regulador sobre as produtoras. (HENTGES, 1978; MARTEAU; POCHART;

FLOURIE; PELLIER; SANTOS; DESJEUX; RAMBAUD, 1990; GIBSON; WANG, 1994).

Fatores como doenças, sistema imune deficiente e determinados medicamentos podem destruir o equilíbrio da MI, tais desequilíbrios, como a composição dos micro-organismos ou a relação destes com o respectivo hospedeiro podem causar danos imediatos (MITCHELL; VAN; MASON; NORRIS; PICKERING, 1996) ou tardios à saúde do hospedeiro (GRONLUND; GUEIMOND; LAITINEN; KOCIUBINSKI; GRONROOS; SALMINEN; ISOLAURI, 2007) ou o deixar mais suscetível a doenças. (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2008). Segundo Monreal *et al.* (2005) e Haenel (1970), a MI pode também ser influenciada ou eliminada pelas cirurgias do trato gastrointestinal, etnia, hospitalização e, principalmente, durante o uso de antimicrobianos. (HAENEL, 1970; MONREAL; PEREIRA; LOPES, 2005; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2008). O impacto destes antimicrobianos sobre a composição da microbiota dependerá da concentração da droga no lúmen intestinal e de seu espectro de ação, podendo provocar vários efeitos indesejáveis, como a colonização por patógenos potenciais, além de influenciar a atividade metabólica da MI. (LODE; VOM DER HÖH; ZIEGE; BORNER; NORD, 2001; MONREAL; PEREIRA; LOPES, 2005; SILVA, 2008; ALDEBERTH; WORD, 2009).

Estudos demonstram a importância da participação da MI em determinados processos patológicos, como as infecções do trato respiratório, nas quais os antibióticos são rotineiramente prescritos. (SALMINEN; ISOLAURI; ONNELA, 1995; LODE; VOM DER HÖH; ZIEGE; BORNER; NORD, 2001; MONREAL; PEREIRA; LOPES, 2005). Ela proporciona resistência à invasão de patógenos produzindo agentes antimicrobianos. Pelo hospedeiro também podemos ter contribuições para a prevenção da invasão desses patógenos pela secreção de saliva e ácido gástrico. (BARTOSCH; AFITE; MACFARLANE; Mc MURDO, 2004). A administração de antibióticos pode provocar mudanças na microbiota normal da orofaringe e dos intestinos. Estudos mostram que tratamentos com o uso de antibióticos podem modificar a MI diminuindo ou até mesmo eliminando certas populações bacterianas e aumentando o número de oportunistas. O uso de antibióticos também pode promover o desenvolvimento de resistência do micro-organismo com a possibilidade de disseminação destes no meio ambiente. (SALMINEN; ISOLAURI; ONNELA, 1995; BARTOSCH; AFITE; MACFARLANE; Mc MURDO, 2004; MONREAL; PEREIRA; LOPES, 2005).

Diversos estudos sobre a importância da MI no desenvolvimento do sistema imune têm sido realizados com animais *germfree* ou axênicos, que significa livre de vida associada. Estes animais, quando comparados aos convencionais, apesar de serem semelhantes em relação ao peso, crescimento e temperatura corporal, são isentos de micro-organismos e apresentam um crescimento sexual e espessura das paredes vasculares e alveolares menores, uma mucosa intestinal com baixa densidade de células linfóides, vilosidades e tamanho da superfície da mucosa menores, Placas de Peyer pequenas, pouco numerosas, a concentração sérica de imunoglobulinas inferior e o ceco apresenta-se aumentado em cerca de 10 vezes mais que o normal, passando a representar 30% do peso do animal. Uma vez exposto a bactérias entéricas, o intestino deste animal adquire aparência convencional. (FALK; HOOPER; MIDTVEDT; GORDON, 1998; FERREIRA; HOCHMAN; BARBOSA, 2005). A colonização do cólon com *Clostridium* e *Bacteroides* reverte rapidamente o ceco ao tamanho original. (TRABULSI; SAMPAIO, 2008).

Entre os anaeróbios descritos acima, alguns bacilos Gram-positivos, como *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.*, representam as principais bactérias benéficas, sendo chamadas de probióticas porque podem compor alguns alimentos que beneficiam a MI. Estes micro-organismos auxiliam na manutenção de um balanço saudável da microbiota intestinal, por produzirem compostos orgânicos decorrentes da atividade fermentativa, que inibem a multiplicação de bactérias patogênicas. As bifidobactérias não apresentam fator de patogenicidade para o homem. No leite materno encontram-se oligossacarídeos que exibem fator bifidogênico, ou seja, favorecem a implantação de bactérias probióticas no trato gastrointestinal dos recém-nascidos. (EDWARDS; PARRET, 2002; MORAIS; JACOB, 2006; TALARICO, 2012).

Em fórmulas para crianças, combinações específicas de prebióticos como galacto-oligossacarídeos e fruto-oligossacarídeos, são consideradas estimulantes do crescimento de bifidobactérias e lactobacilos, assim como os oligossacarídeos presentes no leite materno (HAARMAN; KNOL, 2006). Como o gênero *Bifidobacterium spp.*, os *Lactobacillus spp.* também são caracterizados como bactérias ácido-lácticas probióticas utilizadas por indústrias alimentícias na produção de leites fermentados, são micro-organismos considerados seguros e que trazem muitos benefícios, sem riscos para a saúde humana e o ambiente. (HAYASHI;

SAKAMOTO; KITAHARA; BENNO, 2003; SIPOS; SZÉKELY; PALATINSZKY; RÉVÉSZ; MÁRIALIGETI; NIKOLAUSZ, 2007; BRANDT; TADDEI; TAKAGI; OLIVEIRA; DUARTE; IRINO; MARTINEZ; SAMPAIO, 2012; TALARICO, 2012).

Estudos tem comparado a MI humana pela análise de isolados a partir de métodos de culturas de anaeróbios estritos (só sobrevivem com a ausência de oxigênio) e facultativos (metabolizam com ou sem oxigênio). A complexidade deste ecossistema, principalmente no que se refere à ambientes ausentes de oxigênio, dificultou os estudos iniciais. Assim, na década de 80, deram início às publicações sobre a MI, bem como sobre as técnicas de cultivo de anaeróbio, as quais permitiam que bactérias do trato gastrointestinal, fossem cultivadas fora do seu habitat natural. (TANNOCK, 2005).

Na medida em que os estudos foram sendo desenvolvidos, percebeu-se que o uso de técnicas de cultivos apresentava falhas porque muitas, provavelmente a maioria, das espécies de micro-organismos não podem ser cultivados em meios laboratoriais. (TANNOCK, 2005; INGRAHAM, J.; INGRAHAM, C., 2010). Os pesquisadores notaram que o número de micro-organismos era maior na contagem em lâminas do que aos obtidos após serem cultivados. Com isso, foi estimado que apenas 40% da MI era cultivável em meios não seletivos. (MOUNTZOURIS; McCARTNEY; GIBSON, 2002; TANNOCK, 2005; INGRAHAM, J.; INGRAHAM, C., 2010).

Hoje é possível identificar a composição da microbiota por meio de técnicas moleculares como a reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR), as quais ajudam a revelar uma grande diversidade da microbiota nas amostras analisadas.

Ribossomos procariotos contêm duas subunidades, 50S e 30S. A subunidade 50S contém 34 proteínas e as moléculas de rRNA 5S e 23S rRNA. A subunidade 30S contém 21 proteínas e a molécula de rRNA 16S. O sequenciamento do gene 16S rRNA tem sido amplamente empregado para desenvolver a filogenia dos procariotos. (TALARICO, 2012). A construção da biblioteca do gene 16S rRNA, feita para um estudo de comunidades bacterianas presentes em diferentes ecossistemas vem sendo utilizada em estudos sobre a microbiota fecal (MF).

De acordo com as regiões conservadas e variáveis do gene 16S rRNA pode-se identificar a filogenia das bactérias, pois essas regiões são próprias de cada grupo de organismos. Com a construção da biblioteca 16S rRNA é possível

identificar todos os micro-organismos de uma determinada amostra, inclusive os de difícil cultivo. (TALARICO, 2012). A qPCR é a metodologia de escolha para a confirmação quantitativa desses ensaios e pode ser usada para determinar o número de bactérias específicas, através da utilização de iniciadores desenhados para reconhecer regiões específicas do gene 16S rRNA. Esta técnica tem se mostrado mais sensível que o PCR clássico, inclusive por detectar células bacterianas por grama de amostra fecal em concentrações menores que na técnica convencional. (MATSUKI; WATANABE; FUJIMOTO; KADO; TAKADA; MATSUMOTO; TANAKA, 2004; FURRIE, 2006; MATHYS; LACROIX; MINI; MEILE, 2008; FURET; FIRMESSE; GOURMELON; BRIDONNEAU; TAP; MONDOT; DORÉ; CORTIER, 2009; TALARICO, 2012). Por esta razão, esta técnica é utilizada para analisar a real participação de bactérias anaeróbias na comunidade microbiana intestinal, do grupo de crianças desta pesquisa.

A técnica de qPCR apresenta dois sistemas de detecção de sequências: o sistema TaqMan® e o sistema do corante SYBR® Green I. O sistema TaqMan utiliza uma sonda contendo um corante *reporter* fluorescente na extremidade 5' (que transmite fluorescência após clivagem da sonda com a separação dos corantes *reporter* e *quencher*) e um corante *quencher* (que inibe o corante *reporter* enquanto a sonda estiver intacta) na extremidade 3' para possibilitar a detecção de um produto específico da PCR conforme esse se acumula durante os ciclos da reação. O sistema SYBR Green I utiliza o corante SYBR Green I que se liga ao DNA dupla fita, conforme ocorre a progressão da PCR e consequentemente o aumento de cópias do DNA, a intensidade da fluorescência também irá aumentar.

Com o nascimento, o grau de contaminação ambiental, possivelmente interfere na composição da microbiota, fato que de acordo com Brandt (2008), ainda não está claro. Existem poucos estudos sobre a composição da microbiota em recém-nascidos com malformação craniofacial, em especial as com SR que necessitam de tratamento adequado e variado para completa reabilitação.

As anomalias craniofaciais, como fissura pré e pós-forame incisivo e SR são resultados de alterações ocorridas durante o desenvolvimento embrionário humano e podem ser notadas no embrião de apenas alguns dias. (LOFIEGO, 1992). A etiologia da SR é explicada de maneiras distintas. Ela é descrita como uma tríade de anomalias na qual a criança apresentará micrognatia (hipodesenvolvimento mandibular) e glossoptose (deslocamento posterior da língua que causa obstrução

na faringe) com ou sem fissura palatina associada, resultando em obstrução das vias aéreas e dificuldades alimentares que são mais frequentes e mais graves no período neonatal. Vale ressaltar que a fenda palatina está presente em cerca de 90% dos casos de SR. (MARQUES; SOUZA; CARNEIRO; PERES; BARBIERI; BETIOL, 2005a). A SR pode estar associada a outras síndromes como a de TREACHER-COLLINS e STICKLER. (PUERARI, 2001).



Figura1 - crianças com Sequência de Robin
Fonte: Mondini (2008)

O quadro clínico dos pacientes com SR é bastante diversificado, a criança pode expressar desde leve dificuldade respiratória, alimentar, obstrução respiratória (nem sempre causada somente por glossoptose), fissura submucosa até graves crises de asfixia, podendo levar ao óbito se não houver rápida intervenção médica, e retardo mental. Avaliações clínicas e instrumentais (nasoendoscopia) permitem classificar os pacientes com anomalias craniofaciais e apnéia obstrutiva, incluindo SR, em quatro tipos de obstrução (PUERARI, 2001; MARQUES; SOUZA; CARNEIRO; PERES; BARBIERI; BETIOL, 2005a): TIPO 1 a obstrução resulta do retroposicionamento do dorso da língua em contato com a parede posterior da faringe abaixo do palato posterior; no TIPO 2 a obstrução vem do retroposicionamento do dorso da língua em compressão com o palato posterior ou partes dele (quando a fissura está presente) contra a parede posterior da faringe; o TIPO 3 é quando as paredes laterais da faringe se movem medialmente, obstruindo as vias aéreas e a língua não entra contato com a parede posterior da faringe; e o TIPO 4 a obstrução ocorre por causa da contração esfíntérica das paredes faríngeas sem contato da língua com a parede posterior da faringe. (SHER;

SHPRINTZEN; THORPY, 1986; SHER, 1992; MARQUES; SOUZA; CARNEIRO; PERES; BARBIERI; BETIOL, 2005a).

Dificuldades alimentares, como pouco volume de leite ingerido, alimentação por via oral demorada (geralmente maior que 30 minutos), fadiga, tosse, engasgos, vômitos e regurgitações durante e após as amamentações, podem levar a criança com SR a desnutrição e segundo Marques et al. (2005^a) poucos estudos foram desenvolvidos para resolver essas dificuldades alimentares. Tais dificuldades poderiam levar os pacientes à desnutrição protéico-calórica ou ao uso prolongado de sondas alimentadoras e suas graves consequências. (LOFIEGO, 1992). Técnicas Fonoaudiológicas Facilitadoras da Alimentação (TFFA) são usadas para melhorar a aceitação alimentar das crianças com SR. Essas técnicas, que consistem em estimulação da sucção não-nutritiva através do uso de chupeta, massagem para relaxar e anteriorizar a língua, suporte manual para sustentar a mandíbula, bico de mamadeira longo, macio, com furo aumentado para 1 mm, colocação do bico exatamente sobre a língua, postura global simétrica e movimentos rítmicos do bico na cavidade oral durante a sucção nutritiva, são aplicadas por fonoaudiólogos e estudos realizados mostram que com a utilização destas, gradativamente pode se obter a alimentação oral. (MARQUES; SOUSA; CARNEIRO; PERES; BARBIERI; BETTIOL, 2005b).

No Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo (HRAC-USP) a Unidade de Cuidados Especiais (UCE), denominada de acordo com o organograma do HRAC-USP de Seção de Terapia Semi-Intensiva, destina-se à internação de lactentes e crianças com até dois anos de idade que apresentem síndromes genéticas, múltiplas anomalias congênitas e crianças com fissuras lábio-palatina associadas à disfagia e/ou problemas respiratórios. (MONDINI, 2008). Esses pacientes tem toda a atenção de uma equipe multidisciplinar que trabalha com o objetivo de melhorar as dificuldades respiratórias. Os tratamentos são: Tratamento Postural – o lactente permanece na posição prona, isto é, em decúbito ventral; Intubação Nasofaríngea – colocação de uma cânula de intubação orotraqueal de silicone (leitosa), com diâmetro de 3 a 3,5 mm, introduzida de 7 a 8 cm pela narina até a faringe e cortada 1 cm para fora da narina. Esses dois tratamentos são indicados em pacientes com obstrução respiratória leve (tipo 1); Procedimentos Cirúrgicos – glossopexia, traqueostomia e distração osteogênica da mandíbula. Estes procedimentos, são usados em pacientes com casos mais graves

do tipo 3 e 4. (MARQUES; SOUZA; CARNEIRO; PERES; BARBIERI; BETIOL, 2005a). Pacientes com SR que apresentam fissura palatina segue o protocolo do HRAC com a correção cirúrgica do palato a partir de aproximadamente 12 meses de vida.



Figura 2 – crianças com Sequência de Robin com cânula nasofaríngea (I) e em posição de prona (II).
Fonte: Mondini (2008)

Os pacientes com fissura labiopalatina que ainda não se submeteram a cirurgia, por sua vez, apresentam prejuízo na formação da pressão intra-oral negativa durante a sucção e com a comunicação entre as cavidades oral e nasal, ocorrem perdas de alimentos pelo nariz ou aspiração dos mesmos, podendo causar também, infecção respiratória e otites de repetição. (MONDINI, 2008; WECKWERTH; MARCHESANO; LAMÔNICA; AGUIAR, 1993; HAGBERG; LARSON; MILERAD, 1998). Para eles, a cirurgia é o grande destaque do tratamento.

Vale lembrar que pouco se sabe a respeito da associação entre a SR e a MI. O conhecimento da microbiota e com técnicas diferentes permite-se manipular as populações bacterianas e promover a saúde. Diante da importância da MI para a saúde humana e considerando a inexistência de estudos aplicados à população de crianças com malformação craniofacial, especialmente as com SR, justificou-se a realização deste trabalho, com o objetivo de analisar a MI em crianças com SR atendidas no Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais – Universidade de São Paulo no primeiro e segundo mês de vida.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

- Detectar e quantificar bactérias dos gêneros *Bifidobacterium spp* e *Lactobacillus spp* na microbiota fecal de crianças com Sequência de Robin, atendidas em um hospital especializado no primeiro e segundo mês de vida por meio da técnica de PCR em tempo real.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Detectar e quantificar bactérias dos gêneros *Bifidobacterium spp* e *Lactobacillus spp* na microbiota fecal de crianças com SR e obstrução respiratória alta tipo I sem intubação nasofaríngea com um e dois meses de vida.
- Detectar e quantificar bactérias dos gêneros *Bifidobacterium spp* e *Lactobacillus spp* na microbiota fecal de crianças com SR e obstrução respiratória alta tipo I com intubação nasofaríngea com um e dois meses de vida.
- Verificar a influência do estado nutricional, tipo de parto, nível socioeconômico e o aleitamento materno na MI de crianças com SR e obstrução respiratória alta tipo I com e sem intubação nasofaríngea.

3 METODOLOGIA

3.1 CASUÍSTICA:

Foi realizado um estudo descritivo longitudinal, sendo realizada uma coorte de um grupo de seis crianças com Sequência de Robin, analisadas quanto ao perfil da MI, no primeiro e segundo mês de vida, além dos fatores colonizadores externos. Todas as crianças foram atendidas no Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo (HRAC-USP) no período compreendido entre abril de 2012 e janeiro de 2014.

Esta amostragem pequena, de conveniência, é imposta pela técnica laboriosa e alto custo da metodologia molecular a ser empregada. O tamanho da amostra é compatível com outros estudos publicados com metodologia semelhante. (BRANDT, 3008; HAYASHI; SAKAMOTO; BENNO, 2002).

3.2 MÉTODOS:

3.2.1 Critérios de Inclusão:

Crianças no primeiro e segundo mês de vida, de ambos os sexos com Sequência de Robin e obstrução respiratória alta tipo I com e sem intubação nasofaríngea.

3.2.2 Critérios de Exclusão:

Foram excluídos os indivíduos com idade superior a dois meses de vida, sindrômico e com obstrução respiratória alta tipo II, III e IV.

3.2.3 Grupo de Estudo:

O grupo de estudo foi constituído por 6 crianças com SR e obstrução respiratória alta tipo I, com ou sem intubação nasofaríngea, de ambos os sexos e com idade entre um e dois meses, triadas para tratamento específico junto ao Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo – Bauru – SP.

Para a realização desse projeto, foram fornecidos aos pais ou responsáveis das crianças os detalhes referentes à realização desta pesquisa e foi solicitado a cada um que assinasse o Termo de Consentimento Livre Esclarecido, conforme Resolução nº 196/96 sobre “Pesquisa Envolvendo Seres Humanos”, do Conselho Nacional de Saúde/MS. (anexo 1).

3.2.4 Momentos do Estudo

Para avaliação da microbiota fecal dos seis indivíduos da pesquisa, foram utilizados os seguintes Momentos:

- Momento Um (**M1**): Caracterizado por crianças com SR e obstrução respiratória alta tipo I, com ou sem intubação nasofaríngea, de ambos os sexos e com um mês de idade.
- Momento Dois (**M2**): Caracterizado por crianças com SR e obstrução respiratória alta tipo I, com ou sem intubação nasofaríngea, de ambos os sexos e com dois meses de idade.

3.2.5 Triagem dos pacientes com SR

Todas as crianças com SR e obstrução respiratória alta tipo I com e sem intubação nasofaríngea foram avaliadas clinicamente pelos médicos do HRAC-USP.

3.2.6 Características epidemiológicas

Os pais ou responsáveis pelas crianças foram entrevistados, pelo orientador do trabalho, em salas reservadas observando-se informações relativas a sexo, idade, procedência, peso, altura, antecedentes pessoais patológicos, tipo de parto (natural ou cirúrgico) e duração do aleitamento materno.

3.2.7 Avaliação socioeconômica

A classificação socioeconômica das crianças com SR foi obtida do prontuário do paciente pelo profissional do HRAC-USP, Dr. Narciso Almeida Vieira, e orientador da pesquisa após autorização dos pais, observando-se os seguintes parâmetros: situação econômica da família, número de membros, escolaridade, habitação e ocupação. Para essa avaliação, foi utilizado um sistema de pontuação simples, por meio de correlações, em classificação por estratos: baixo inferior, baixo superior, médio inferior, médio, médio superior e alto. Esses indicadores foram organizados em uma tabela denominada “Instrumental para a Classificação Socioeconômica”, com as respectivas pontuações, com elementos qualitativos e quantitativos. Os dados foram organizados em protocolo denominado “ficha social do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais-USP”, de acordo com a metodologia de classificação socioeconômica proposta por Graciano *et al.* (1999). (Anexo 2).

3.2.8 Avaliação nutricional

A avaliação nutricional foi obtida por meio de medidas antropométricas, considerando o percentil de peso para estatura em crianças até dois meses. (RICHARD, 1994; WORD HEALTH ORGANIZATION, 1995).

Peso (P) – foi aferido em quilogramas (Kg) pela manhã, com os lactentes descalços e nus, em balança FILIZOLA, modelo pediátrico, com precisão de 10 gramas e carga máxima de 16 kg. (AUGUSTO, 1993).

Estatura (E) – foi aferida em centímetros (cm). As medidas foram realizadas em craveira de fórmica, com escala métrica de alumínio preso em uma das bases laterais cujo comprimento não se altera significativamente com as variações de temperatura; subdividida a cada 0,5 cm e com 1 metro de mensuração máxima. A craveira possui um anteparo fixo para encostar-se na cabeça da criança e outro móvel, que se estende até os pés. Os pacientes estiveram na posição supina, horizontal, descalços e nus. (FALKNER, 1985; WEITZBERG; FERREINI, 1995).

Percentil de peso para estatura – O percentil de peso para idade foi avaliado segundo a curva de referência do “National Center for Health Statistics (NCHS)”, sendo estabelecido como linha divisória da normalidade o percentil dez.

3.2.9 Avaliação da Microbiota Fecal

Colheita das amostras fecais

Os pais ou responsáveis pelas crianças foram orientados, no momento da anamnese, e colheram uma amostra de fezes durante o tratamento específico no HRAC-USP a partir da primeira internação hospitalar e para tratamento quando os pacientes completaram um e dois meses de vida. Foi entregue aos pais o frasco estéril para colheita de fezes.

As amostras de fezes foram colhidas após uma evacuação recém-emitida, diretamente das fraldas e acondicionadas em recipientes plásticos estéreis a seco. Após serem colhidas, as amostras foram encaminhadas imediatamente ao Laboratório de Patologia Clínica do HRAC-USP, para acondicionamento no freezer (-80°C) até o processamento, até o momento da avaliação da MF nos dois momentos.

Análise molecular da microbiota fecal

O DNA das amostras coletadas a seco foi obtido utilizando o kit QIAmp DNA Stool Mini (Quiagem) para o isolamento de DNA genômico bacteriano das amostras de fezes, de acordo com as recomendações do fabricante.

Extração do DNA das amostras de fezes

As fezes coletadas foram mantidas, sob refrigeração, a -80°C até o momento do uso. O DNA das amostras coletadas foi obtido utilizando o kit QIAmp DNA Stool Mini (Quiagem) para o isolamento de DNA genômico bacteriano das amostras de fezes, de acordo com as recomendações do fabricante, Furet et. al. 2009 e McOrist; Jackson e Bird 2002 com algumas modificações, a saber: foram aliquotados em um microtubo estéril 180-220 mg de fezes e para melhor homogeneização foram utilizadas espátulas estéreis próximo à chama do bico de Bunsen. Em seguida, foram adicionados 1,4 mL de tampão ASL e a homogeneização total foi feita em vortex, por 1 minuto ou até completa homogeneização. O tubo foi incubado em banho-maria seco, por 10 minutos a 90°C, homogeneizado em vortex por 15 segundos e centrifugado a 120rpm, por 2 minutos.

O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo estéril de 2 ml, 1,2mL e o pellet foi descartado. A este tubo foi adicionado 1 comprimido Innibitex e imediatamente ocorreu a homogeneização no vortex, por 1 minuto ou até o comprimido dissolver completamente. Este tubo foi incubado à temperatura ambiente, por 1 minuto e centrifugado a 120rpm, por 5 minutos. Todo o volume do sobrenadante foi transferido para um novo microtubo estéril de 1.5 ml e o pellet foi descartado. O tubo contendo o sobrenadante transferido foi centrifugado a 120rpm, por 5 minutos.

Em um novo microtubo estéril de 1.5 ml, pipetou-se 15µL de proteinase K e para este tubo transferiu-se 200µL do sobrenadante do tubo centrifugado, 200µL de tampão AL e a homogeneização em vortex foi feita por 15 segundos. O tubo foi incubado a 70°C, em banho-maria, por 10 minutos. Ao lisado, adicionou-se 200µL de etanol P.A. e o tubo foi homogeneizado em vortex. O lisado foi transferido para uma coluna (disponível no kit), identificada na tampa, e centrifugado a 120rpm, por 2 minutos. O tubo coletor foi trocado por outro disponível com o kit. Cuidadosamente, a tampa da coluna foi aberta e adicionou-se 500µL de tampão Buffer AW1. Fechou-se a tampa e a coluna foi centrifugada por 2 minutos, a

120rpm. Este passo foi repetido, mas agora pipetando 500µL de tampão AW2, centrifugando por 5 minutos e trocando o tubo coletor. O tubo coletor foi trocado mais uma vez e a coluna foi centrifugada a 120rpm, por 2 minutos, para remover possíveis resíduos dos tampões da coluna. A coluna foi transferida para um novo microtubo estéril, identificado na lateral e acrescentados 100µL de água destilada (Mili Q) estéril à 37°C na coluna. Após incubação à temperatura ambiente, por 1 minuto o tubo foi centrifugado a 120rpm, por 2 minutos. A quantificação foi feita no equipamento Nanodrop® 2000 (Thermo Scientific) e tubo foi mantido a -20°C até o momento do uso.

3.2.10 Quantificação e detecção por qPCR

Detecção e Quantificação por PCR em tempo real (qPCR):

Vale ressaltar que a quantificação e detecção dos gêneros *Bifidobacterium spp* e *Lactobacillus spp* por meio da qPCR foi realizada pela Dra. Carla Tadei e Dra. Silvia Talarico na Universidade de São Paulo – USP que colaboraram imensamente para a realização deste trabalho.

Para obter o DNA bacteriano utilizado na construção da curva padrão, foram feitas as curvas de crescimento das bactérias que foram quantificadas.

Alíquotas dos pontos de leitura da fase log de crescimento dos microorganismos que foram quantificados foram congeladas e o DNA extraído com o Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega), de acordo com as instruções do fabricante.

Diluições seriadas de uma concentração conhecida de DNA genômico da espécie a ser quantificada foi usada na construção da curva padrão.

PCR em tempo real:

A reação de PCR em tempo real foi realizada em equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Foram pesquisados os seguintes gêneros bacterianos: *Bifidobacterium spp* e *Lactobacillus spp*.

Para a quantificação da população de *Bifidobacterium spp* foi utilizado o sistema TaqMan® e para o gênero *Lactobacillus spp* o sistema SYBR-Green®, utilizando os iniciadores e sondas descritos por FURET et. al. (2009). O ciclo threshold, número do ciclo onde a eficiência de detecção de fluorescência é de 100% (região de

crescimento exponencial) foi monitorado (FURET; FIRMESSE; GOURMELON; BRIDONNEAU; TAP; MONDOT; DORÉ; CORTIER, 2009).

Padronização da reação de quantificação por qPCR

A padronização das reações de quantificação foi realizada para se determinar as concentrações ideais de iniciadores, através da combinação de diferentes concentrações de iniciadores forward e reverse (figura 3), a fim de se obter uma eficiência entre 90% e 110%, além de otimizar a reação para um volume final de 20 μ L. Quanto mais próximo de 100% a eficiência da reação estiver, melhor o desempenho do ensaio. A eficiência é calculada pelo software 7500 Software Version 2.0.5 Applied Biosystems, Life Technologies Corp., 2010.

	Iniciador <i>reverse</i>			
		50nM	300nM	900nM
Iniciador <i>forward</i>				
	50nM	50/50	50/300	50/900
	300nM	300/50	300/300	300/900
	900nM	900/50	900/300	900/900

Figura 3 – Concentrações de iniciadores utilizados na padronização das reações de quantificação

Fonte: Talarico (2012)

Curvas padrão

Para obter o DNA bacteriano utilizado na construção da curva padrão das bactérias a serem quantificadas, alíquotas de 1mL da fase log de crescimento desses micro-organismos foram utilizadas para a extração do DNA genômico com o *Kit Wizard Genomic DNA Purification* (Promega), de acordo com as instruções do fabricante (FURET; FIRMESSE; GOURMELON; BRIDONNEAU; TAP; MONDOT; DORÉ; CORTIER, 2009).

As bactérias anaeróbias (*Bifidobacterium animalis subsp lactis* HN019 e e *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356) foram inoculadas em caldo Lactobacilli MRS (Difco) e incubadas por 24h, em anaerobiose, a 37°C.

Diluições seriadas de uma concentração conhecida de DNA genômico de cada espécie a ser quantificada foram usadas na construção da curva padrão. As curvas padrão foram construídas para cada um dos micro-organismos estudados e como controle negativo, foi utilizada água estéril MilliQ®.

Para a quantificação das bactérias anaeróbias foram utilizadas as seguintes bactérias para construção das curvas: *Bifidobacterium animalis subsp lactis* HN019 e *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356.

Quantificação de micro-organismos por qPCR

As reações de quantificação por qPCR foram realizadas em equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). A relação de iniciadores e sondas utilizados encontra-se descrita na Tabela 1. (RINTTILÄ; KASSINEN; MALINEN; KROGIUS; PALVA, 2004; FURET; FIRMESSE; GOURMELON; BRIDONNEAU; TAP; MONDOT; DORÉ; CORTHER, 2009).

O volume total final de reação foi determinado em 20 μ L, sendo 2 μ L de DNA extraído de fezes conforme descrição anterior e o volume restante composto por mix, iniciadores e sondas. (FURET; FIRMESSE; GOURMELON; BRIDONNEAU; TAP; MONDOT; DORÉ; CORTHER, 2009).

Para as reações utilizando o sistema SYBR® Green I, as condições de amplificação foram: desnaturação por 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 60 segundos a 60°C, seguidas da curva de *melting* (15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C, 15 segundos a 95°C e 15 segundos a 60°C).

Análise estatística

Os cálculos de quantificação das amostras foram realizados no programa Excel, com o valor do ciclo *threshold* (Ct) obtido durante as corridas. Estes valores foram colocados na equação da reta obtida a partir da curva padrão construída. Os valores obtidos foram corrigidos de acordo com a diluição das amostras (BOLOTIN; WINCKER; MAUGER; JAILLON; MALARME; WEISSENBACH; ERLICH; SOROKIN, 2001; ALTERMANN; RUSSELL; AZCARATE-PERIL; BARRANGO; BUCK; MCAULIFFE; SOUTHER; DOBSON; DUONG; CALLANAN; LICK; HAMRICK; CANO; KLAENHAMMER, 2005; DURFEE; NELSON; BALDWIN; PLUNKETT; BURLAND; MAU; PETROSINO; QIN; MUZNY; AYELE; GIBBS; CSORGO; POSFAI; WEINSTOCK; BLATTNER, 2008; BARRANGOU; BRICZINSKI; TRAEGER; LOQUASTO; RICHARDS; HORVATH; COUTE-MONVOISIN; LEYER; RENDULIC; STEELE; BROADBENT; OBERG; DUDLEY; SCHUSTER; ROMERO; ROBERTS, 2009).

O número de cópias da espécie bacteriana foi calculado para cada amostra de fezes, a partir dos valores de Ct, utilizando as curvas padrão construídas (ZHANG; SHAO; FANG, 2009).

Para calcular o número de cópias foi utilizada a seguinte fórmula (CREA..., 2012).

$$n^{\circ} \text{ de cópias} = \text{DNA(g)} / \text{cópia genoma (g)}$$

onde:

$$\text{cópia genoma(g)} = \text{tamanho genoma (nt)} * 1,096.10^{-21} \text{(g/bp)}$$

Tabela 1 - Condições da reação de quantificação por qPCR

Organismo	Iniciadores e sondas	Sequências (5' - 3')	Referências	Concen-Tração	Sistema	Condições da reação
<i>Bifidobacterium spp</i>	F_Bifid 09c R_Bifid 06 P_Bifid	→ CGG GTG AGT AAT GCG TGA CC → TGA TAG GAC GCG ACC CCA → 6FAM-CTC CTG GAA ACG GGT G	FURET et al, 2009	300nM 300nM 250nM	TaqMan®	denaturação por 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 60 segundos a 60°C
<i>Lactobacillus spp</i>	Lactobacillus F Lactobacillus R	AGC AGT AGG GAA TCT TCC A CAC CGC TAC ACA TGG AG	RINTTILÄ et al, 2004	300nM 300nM	SYBR® Green I	denaturação por 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 60 segundos a 60°C, seguidos da curva de <i>melting</i> (15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C, 15 segundos a 95°C e 15 segundos a 60°C)

Fonte: Talarico (2012)

3.2.11 Padronização das reações de quantificação por qPCR

Foram padronizadas as reações de quantificação com os iniciadores para quantificação dos gêneros anaeróbios *Bifidobacterium spp* e *Lactobacillus spp* construindo curvas padrão. A concentração dos iniciadores foi determinada para atingir uma eficiência entre 90 e 110% e a reação otimizada para um volume final de 20µL, sendo 2µL de amostra.

A padronização da reação de quantificação para o gênero *Bifidobacterium* foi realizada utilizando sistema TaqMan® (figuras 4 e 5) e permitiu definir as concentrações de iniciadores em 300nM, tanto para forward quanto reverse e 250nM

para a sonda com reporter FAM e quencher NFQ-MGB, pois nessas condições, a eficiência da reação foi de 90,516%. Foram usadas 5 diluições decimais seriadas de DNA genômico de *Bifidobacterium animalis subsp lactis* HN019 na construção da curva padrão. O ponto inicial da curva teve concentração de 5,3ng/μL.

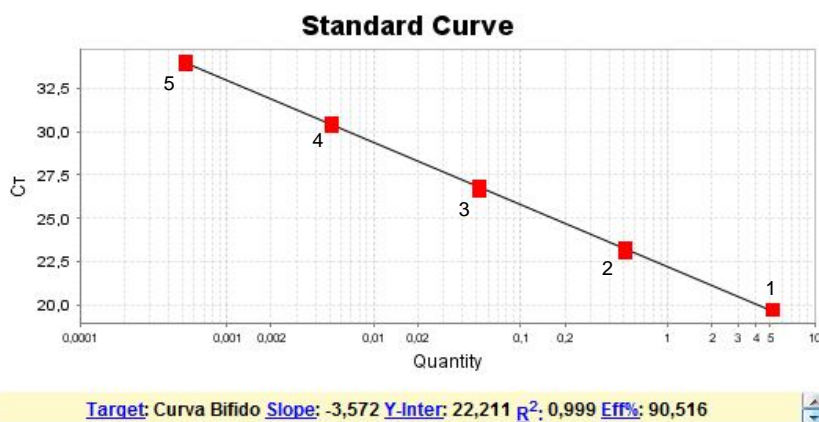


Figura 4: padronização da curva padrão com iniciador específico para *Bifidobacterium* spp..
 1. Diluição 100 (concentração de DNA: 5,3ng/μL, nº de cópias de DNA: 4,99.107). 2. Diluição 10-1.
 3. Diluição 10-2. 4. Diluição 10-3. 5. Diluição 10-4.
Fonte: Talarico (2012)

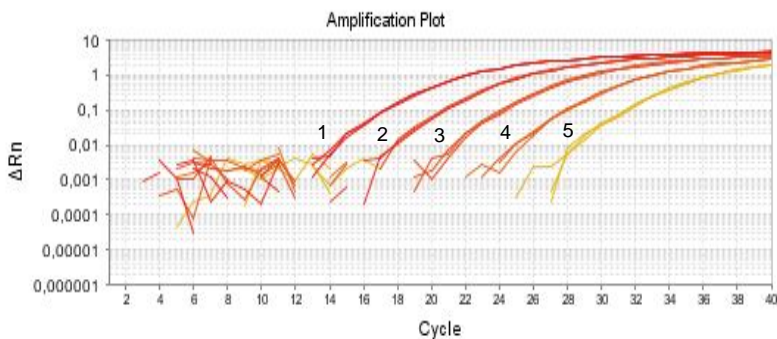
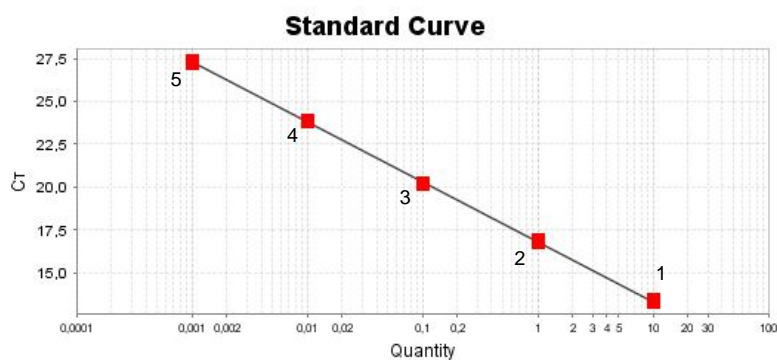


Figura 5: perfil de amplificação da curva padrão com iniciador específico para *Bifidobacterium* spp..
 1. Diluição 100. 2. Diluição 10-1. 3. Diluição 10-2. 4. Diluição 10-3. 5. Diluição 10-4.
 Experimentos realizados em triplicata.
Fonte: Talarico (2012)

A padronização da reação de quantificação de bactérias do gênero *Lactobacillus* utilizou sistema SYBR Green® I (figuras 6 e 7) e com as concentrações de 300nM para os iniciadores forward e reverse, apresentou eficiência de 93,237%. A curva de melting comprovou a especificidade da reação (figura 8). Foram utilizadas 5 diluições decimais seriadas de DNA genômico de *Lactobacillus*

acidophilus ATCC4356 na construção da curva padrão e o ponto inicial teve concentração de 10,1ng/μL.



Target: Curva Lactobacillus Slope: -3,495 Y-Inter: 16,823 R²: 1 Eff%: 93,237

Figura 6: padronização da curva padrão com iniciador específico para *Lactobacillus spp.*

1. Diluição 100 (concentração de DNA: 10,1ng/□L, n^o de cópias de DNA: 9,25.107).
2. Diluição 10-1.
3. Diluição 10-2. 4. Diluição 10-3. 5. Diluição 10-4.

Fonte: Talarico (2012)

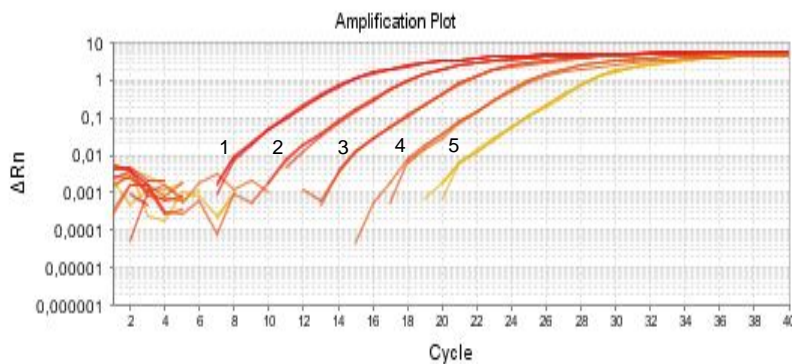


Figura 7: perfil de amplificação da curva padrão com iniciador específico para *Lactobacillus spp.*

1. Diluição 100. 2. Diluição 10-1. 3. Diluição 10-2. 4. Diluição 10-3. 5. Diluição 10-4.
- Experimentos realizados em triplicata.

Fonte: Talarico (2012)

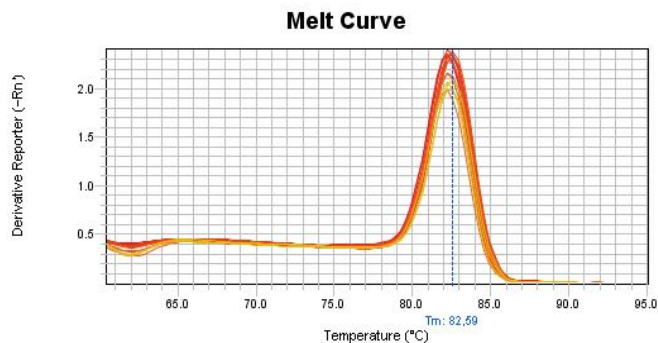


Figura 8: curva de melting para padronização com iniciador específico para *Lactobacillus spp.*.

Fonte: Talarico (2012)

3.2.12 Acompanhamento das crianças e registro de informações

As crianças foram acompanhadas pelo pesquisador a partir da internação na Unidade de Cuidados Especiais do HRAC-USP. Foram registradas informações sobre o pré-natal e condições de nascimento, alimentação, intercorrências infecciosas e ao uso de medicações na ficha de avaliação clínica (anexo 3).

3.2.13 Ética (anexo 4)

O presente estudo foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo, recebendo parecer favorável em 26 de junho de 2012.

3.2.14 Apresentações em simpósios e jornadas

Este trabalho foi apresentado no 21º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP – SIICUSP, sob orientação de Narciso Almeida Vieira, na área de Ciências Biológicas, realizado nos dias 23 e 24/10/2013, no CCRP, Ribeirão Preto, SP.

No 22º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP – SIICUSP, sob orientação de Narciso Almeida Vieira, na área de Ciências Biológicas, realizado no dia 16/09/2014, na Pós Graduação do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais – HRAC/USP.

Foi apresentado também, na II Jornada de Biomedicina, sob orientação de Narciso Almeida Vieira, realizada nos dias 29, 30, 31/10/2014, na Universidade Sagrado Coração.

4 RESULTADOS FINAIS

4.1 Caracterização da casuística quanto a sexo

A distribuição dos indivíduos do grupo de estudo de acordo com o sexo está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição das 6 crianças, com Sequência de Robin de acordo com o sexo. Bauru, SP, 2014

Grupo	G
Sexo	nº (%)
Masculino	1 (16,6)
Feminino	5 (83,3)
Total	6 (100,00)

Fonte: elaborado pelo autor

G = Grupo de 6 crianças com Sequência de Robin com sonda nasofaríngea

Foi observado que a maioria das crianças com Sequencia de Robin era do sexo feminino.

4.2 Caracterização da casuística quanto à procedência

No presente trabalho observou-se que 33,3% dos indivíduos do grupo de estudo eram do Estado de São Paulo, 16,6% do estado de Goiás, 16,6% do Rio de Janeiro, 16,6% de Alagoas e 16,6% de Santa Catarina.

4.3 Caracterização da casuística quanto ao nível socioeconômico

A distribuição dos indivíduos do grupo de estudo, de acordo com o nível socioeconômico, está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 - Distribuição das 6 crianças, com Sequência de Robin de acordo com o nível socioeconômico. Bauru, SP, 2014

Social \ Grupo	G nº (%)
BI	0 (0)
BS	1 (16,6)
M	5 (83,3)
Total	6 (100,00)

Fonte: elaborado pelo autor

G = Grupo de 6 crianças com Sequência de Robin com sonda nasofaríngea

BI = Baixo Inferior

M = Médio

BS = Baixo Superior

Foi observado que no grupo de estudo a maioria pertencia ao nível socioeconômico médio.

4.4 Caracterização da casuística quanto ao tipo de parto

A distribuição dos indivíduos do grupo de estudo, de acordo com o tipo de parto (normal ou cirúrgico) está apresentada na Tabela 4.

Tabela 4 - Distribuição das 6 crianças, com Sequência de Robin de acordo com o nível socioeconômico. Bauru, SP, 2014

Parto \ Grupo	G nº (%)
Cirúrgico	6 (100)
Normal	0 (0)
Total	6 (100,00)

Fonte: elaborado pelo autor

G = Grupo de 6 crianças com Sequência de Robin com sonda nasofaríngea

Foi observado que a todas as crianças no grupo de estudo nasceram de parto cirúrgico.

4.5 Caracterização da casuística quanto ao aleitamento materno

A distribuição dos indivíduos do grupo de estudo, de acordo com o tempo de aleitamento materno, está apresentada na Tabela 5.

Tabela 5 – Distribuição das 6 crianças Sequência de Robin de acordo com o aleitamento materno. Bauru, SP, 2014

Grupo		G	
Aleitamento Materno		nº (%)	
Sim		2	(33,3)
Não		4	(66,6)
Total		6	(100,00)

Fonte: elaborado pelo autor

G = Grupo de 6 crianças com Sequência de Robin com sonda nasofaríngea

Foi observado que no de estudos a maioria das crianças não recebeu leite materno.

4.6 Caracterização da casuística quanto ao uso de ranitidina

A distribuição dos indivíduos do grupo de estudo, de acordo com o uso de ranitidina, está apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 - Distribuição das 6 crianças Sequência de Robin de acordo com o uso de ranitidina. Bauru, SP, 2014

Grupo		G	
Uso de Ranitidina		nº (%)	
Sim		5	(83,3)
Não		1	(16,6)
Total		6	(100,00)

Fonte: elaborado pelo autor

G = Grupo de 6 crianças com Sequência de Robin com sonda nasofaríngea

Observou-se, no grupo de estudo, que a maioria das crianças fez uso de ranitidina.

4.7 Caracterização da casuística quanto a realização da TFFA

A distribuição dos indivíduos do grupo de estudo, de acordo a realização da TFFA, está apresentada na Tabela 7.

Tabela 7 - Distribuição das 6 crianças Sequência de Robin de acordo com a realização da TFFA. Bauru, SP, 2014

Grupo		G	
		nº (%)	
TFFA	Sim	3	(50)
	Não	3	(50)
	Total	6	(100,00)

Fonte: elaborado pelo autor

G = Grupo de 6 crianças com Sequência de Robin com sonda nasofaríngea

TFFA = Técnicas Fonoaudiológicas Facilitadoras da Alimentação

Foi observado que no grupo de estudo, 50% das crianças realizaram a TFFA.

4.8 Caracterização da casuística quanto a utilização da dieta hipercalórica.

A distribuição dos indivíduos do grupo de estudo, de acordo com a utilização da dieta hipercalórica, está apresentada na Tabela 8.

Tabela 8 - Distribuição das 6 crianças Sequência de Robin de acordo com a utilização da dieta hipercalórica. Bauru, SP, 2014

Grupo		G	
		nº (%)	
Dieta Hipercalórica	Sim	3	(50)
	Não	3	(50)
	Total	6	(100,00)

Fonte: elaborado pelo autor

G = Grupo de 6 crianças com Sequência de Robin com sonda nasofaríngea

Foi observado que no grupo de estudo 50% das crianças fizeram uso da dieta hipercalórica.

4.9 Caracterização da casuística quanto ao uso de sonda nasogástrica.

A distribuição dos indivíduos do grupo de estudo, de acordo com a utilização da sonda nasogástrica, está apresentada na Tabela 9.

Tabela 9 - Distribuição das 6 crianças Sequência de Robin de acordo com a utilização da sonda nasogástrica. Bauru, SP, 2014

Grupo		G	
		nº	(%)
SG	Sim	6	(100)
	Não	0	(0)
	Total	6	(100,00)

Fonte: elaborado pelo autor

G = Grupo de 6 crianças com Sequência de Robin com sonda nasofaríngea

SG= Sonda Nasogástrica

Foi observado que no grupo de estudo, todas as crianças fizeram uso da sonda nasogástrica.

4.10 Quantificação bacteriana nas amostras fecais estudadas

Após a determinação das concentrações ideais de iniciadores e sondas, as amostras também foram testadas e o perfil de amplificação observado determinou a necessidade ou não de diluição das mesmas, ou para adequação do Ct das amostras dentro da curva de calibração para posterior cálculo de quantificação, ou para diminuição da presença de interferentes da amplificação. Todas as amostras foram quantificadas em triplicata e o número de cópias em 1g de amostra de fezes de bactéria específica é observado na Tabela 10.

Tabela 10 - Quantificação do número de cópias de DNA/g de fezes

ALVO SISTEMA PACIENTES	<i>Bifidobacterium spp</i> TaqMan® 300/300/250nM Vol 20µL		<i>Lactobacillus spp.</i> SYBR® Green I 300/300nM Vol 20µL	
	M1	M2	M1	M2
1	1,5E+08	4,2E+08	0,0E+00	0,0E+00
2	5,5E+11	1,4E+11	1,6E+06	0,0E+00
3	9,7E+08	2,4E+10	2,4E+06	0,0E+00
4	1,1E+11	3,0E+12	9,7E+08	0,0E+00
5	8,8E+09	2,9E+10	8,5E+03	8,1E+04
6	1,8E+07	8,2E+09	0,0E+00	0,0E+00

Fonte: elaborado pelo autor

Legenda: M1 = Momento 1 com um mês de idade; M2 = Momento 2 com dois meses de idade

O gênero *Bifidobacterium spp.* esteve presente em todas as crianças analisadas. Sendo assim, observa-se que este gênero foi predominante em relação aos outro gênero testado, não sendo possível observar um padrão de colonização. No entanto, de um modo geral, a quantificação de *Bifidobacterium spp* variou, em média, entre $1,8 \times 10^7$ a $5,5 \times 10^{11}$ n° de cópias/g de fezes em M1; em M2 variou entre $4,2 \times 10^8$ e $3,0 \times 10^{12}$ n° de cópias/g de fezes.

O gênero *Lactobacillus spp* não esteve presente em todas as crianças, sendo detectado em baixa quantidade variando, em média, de $8,5 \times 10^3$ a $9,7 \times 10^8$ n° de cópias/g de fezes em M1 e em M2 apenas uma criança apresentou quantificação de $8,1 \times 10^4$. Outras duas crianças apresentaram ausência do micro-organismo em M1 e M2.

5 DISCUSSÃO

Até o nascimento o ser humano é estéril e sua colonização por micro-organismos ocorre no início da vida, como demonstram diversos estudos. O cólon apresenta uma diversidade muito grande de micro-organismos aeróbios e anaeróbios, cujo número ultrapassa a soma de todas as células somáticas e germinativas do próprio organismo. (HOOPER; MIDTVEDT; GORDON, 1998; MONREAL; PEREIRA; LOPES, 2005; ALDEBERTH; WORD, 2009; FALK). Estes micro-organismos atuam como fonte de antígenos e imunomoduladores inespecíficos, estimulando resposta imune local e sistêmica, bem como influenciando o número e a distribuição da população de células do tecido linfóide associado ao intestino (VAN DER WAAIJ, 1982; MONREAL; MOREAU; COSTE, 1993; PEREIRA; LOPES, 2005) e atuam também na defesa contra patógenos invasores (“resistência à colonização” ou “efeito barreira”). Diversos fatores podem influenciar a MI, entre eles dietas (HENTGES, 1978; MARTEAU; POCHART; FLOURIE; PELLIER; SANTOS; DESJEUX; RAMBAUD, 1990; GIBSON; WANG, 1994; FALK; HOOPER; MIDTVEDT; GORDON, 1998; MARQUES; CARNEIRO; PERES; BARBIERI; BETTIOL, 2005b; ALDEBERTH; WORD, 2009), idade (HAENEL, 1970; MOREAU; COSTE, 1993; MARQUES; SOUSA; CARNEIRO; PERES; BARBIERI; BETTIOL, 2005) localização geográfica (MATA; JEJICANOS; JIMÉNEZ, 1972; MOORE; HOLDEMAN, 1974; SALMINE; ISOLAURI; ONNELA, 1995), terapias medicamentosas (FINEGOLD, 1970; KURPAD; SHETTY, 1986), doenças entéricas (BHAT; SHANTAKUMARI; RAJAN; MATHAN; KAPADIA; SWARNABAI; BAKER, 1971; NORDENVALL; HALLBERG; LARSSON; NORD, 1983), estado hormonal (MARQUES; SOUSA; CARNEIRO; PERES; BARBIERI; BETTIOL, 2005) e a malformação craniofacial. (VIEIRA, 2009).

A Sequência de Robin é exemplo de malformação craniofacial, resultante de alterações (ou defeitos) ocorridas durante o desenvolvimento embrionário humano. (LOFIEGO, 1992). Algumas teorias defendem que sua origem deve-se a distúrbios genéticos ou a fatores mecânicos intra-uterinos e outras, ainda, a fatores metabólicos. (PUERARI, 2001).

A presente pesquisa investigou a presença e a quantidade de *Bifidobacterium* spp e *Lactobacillus* spp, micro-organismos que compõe a MF, de crianças com Sequência de Robin em dois momentos: trinta e sessenta dias de vida.

No que diz respeito ao sexo, observou-se, até o momento, que a maioria das crianças com Sequencia de Robin é do sexo feminino. Este resultado concorda com os trabalhos apresentados por Puerari (2001), Meyer et al (2008), Diógenes et al (2013) e Peres. (2000).

Referente à procedência, observou-se, até o momento, que a maioria dos pacientes é proveniente do estado de São Paulo concordando com os trabalhos realizados por Vieira (2009) e Vieira & Pereira (2005), Peres et al (2006) e Arena et al. (2005).

Diversas pesquisas mostram a influência da dieta na microbiota das pessoas. (HENTGES, 1978; MARTEAU; POCHART; FLOURIE; PELLIER; SANTOS; DESJEUX; RAMBAUD, 1990; FALK; GIBSON; WANG, 1994; HOOPER; MIDTVEDT; GORDON, 1998). Porém a alimentação do indivíduo está relacionada com sua condição socioeconômica. Nesta pesquisa, observou-se que a maioria dos pacientes pertencia à classe socioeconômica média, discordando dos estudos de Vieira (2009) Vieira & Pereira (2005) e de dados nacionais apresentados por Borgo (2001), que em 2001, na reunião da Organização Mundial da Saúde, mostrou que 86% dos pacientes com malformação craniofacial tratados no HRAC-USP, pertenciam a classe socioeconômica baixa.

Outro fator que terá influência na microbiota do recém-nascido é o tipo de parto. Neste momento o bebê tem contato com as bactérias da microbiota vaginal e fecal da mãe, ou com bactérias do meio ambiente, dependendo do tipo de parto, mostrando então, a influência considerável na instalação da microbiota da criança. Nesta pesquisa foi verificada, até o momento, que a todas as crianças nasceram de parto cirúrgico, concordando com dados de Vieira & Pereira. (2005).

A amamentação juntamente com a introdução de fórmulas suplementares e alimentos sólidos se relaciona com o desenvolvimento das populações de anaeróbios obrigatórios. (MACKIE; SGHIR; GASKINS, 2013). Favorece também um aumento na quantidade de bactérias dos gêneros *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.*, como descrito por Vael; Desager (2009). O gênero *Lactobacillus spp* não foi encontrado em todas as crianças, diferente dos resultados de Talarico (2012) e concordando com os resultados de Jost et al. (2012), que em seu estudo com amostragem de 7 crianças, relata que uma pequena quantidade desse gênero foi quantificada.

Com o nascimento, o contato com a microbiota da mãe, com o meio ambiente e outros fatores externos, o recém-nascido apresentará uma população de bactérias diversificada que irá se estabilizar a partir do segundo ano de vida (BULLEN; TEARL; WILLIS, 1976). A importância desses microrganismos é ampla, tanto que um dos principais gêneros colonizadores como *Bifidobacterium* é utilizado em tratamento e prevenção de doenças gastrointestinais. (LANGENDIJK; SCHUT; JANSEN; RAANGS; KAMPHUIS; WILKINSON; WELLING, 1995)

Com a amamentação e o consumo de oxigênio do lúmen intestinal surgem gêneros de bactérias como de *Bifidobacterium spp* (que pode variar em quantidade dependendo do tempo de amamentação, pois o leite humano apresenta fatores de crescimento) e de outros gêneros. A amamentação juntamente com fórmulas suplementadas também favorece um aumento na quantidade de bactérias dos gêneros *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.*, como descrito por Vael; Desager (2009). Os resultados deste trabalho mostraram que todas as crianças foram colonizadas por *Bifidobacterium spp* nos dois momentos e estes se apresentaram em maior quantidade entre as bactérias detectadas.

Com o nascimento o recém-nascido apresentará uma população de bactérias diversificada que irá se estabilizar a partir do segundo ano de vida (BULLEN; TEARLE; WILLIS, 1976). Apesar da dificuldade que as crianças com SR apresentam para a alimentação, observa-se que menos da metade recebeu aleitamento materno nos primeiros dias de vida. Vale ressaltar que metade teve suplementação por meio da dieta hipercalórica e fizeram uso da TFFA, a fim de ganharem peso. As TFFA são técnicas realizadas por fonoaudiólogos e possuem o intuito de promover alimentação oral reduzindo o tempo da alimentação por sonda nasogástrica. (MARQUES; SOUSA; CARNEIRO; PERES, BARBIERI; BETTIOL, 2005b).

Segundo Vandenplas et al. (2011) o equilíbrio da MI pode ser afetado pelo uso de medicamentos os quais poderiam facilitar a instalação de micro-organismos patogênicos. De acordo com Dal-Paz et al. (2008), o suco gástrico e a mucosa do estômago apresentam baixas concentrações de bactérias gram-negativas devido à presença de ácido clorídrico, no entanto, o uso de inibidores da bomba protônica (IBP) por mais de 12 meses poderiam favorecer o supercrescimento de micro-organismos provenientes da microbiota do intestino delgado. O risco de supercrescimento bacteriano aumenta quando IBP é administrado por longos períodos concomitantemente a antimicrobianos e fármacos quimioterápicos

citotóxicos (JOST; LACROIX; BRAEGGER; CHASSARD, 2012; TURRONI; PEANO; PASS; FORONI; SEVERGNINI; CLAEISSON; KERR; HOURIHANE; MURRAY; FULIGNI; GUEIMONDE; MARGOLLES; BELLIS; O'TOOLE; VAN SINDEREN; MARCHESI; VENTURA, 2012). A ranitidina é uma droga comumente utilizada para o tratamento de úlceras pépticas e refluxos gastro-esofágicos, o presente trabalho revelou que a maioria das crianças com SR fez uso dessa medicação. As crianças com SR apresentam necessidade do uso desse medicamento devido a problemas com refluxo, porém como dito, seu uso constante pode trazer problemas que podem estar relacionados com alterações na microbiota, sendo assim há a necessidade de novos estudos para averiguar seu efeito sobre a microbiota.

O uso das técnicas moleculares para avaliar a diversidade, variabilidade individual e complexidade da MI têm sido aplicadas nos mais recentes estudos, independente de cultura microbiológica. A qPCR é um procedimento empregado para detecção e quantificação de bactérias específicas, uma vez que se utilizam iniciadores desenhados para reconhecer regiões específicas de rRNA. Por meio da qPCR é possível detectar células bacterianas por grama de amostra fecal em concentrações menores que na técnica convencional (MATSUMOTO; TANAKA, 2004; FURRIE, 2006; MATSUKI; WATANABE; FUJIMOTO; KADO; TAKADA; MATHYS; LACROIX; MINI; MEILE, 2008; FURET; FIRMESSE; GOURMELON; BRIDONNEAU; TAP; MONDOT; DORÉ; CORTHER, 2009; VAEL; DESAGER, 2009; TALARICO, 2012;).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A maioria das crianças com Sequência de Robin:

- Era do sexo feminino;
- Nível socioeconômico médio;
- Nascida de parto cirúrgico;
- Não recebeu aleitamento materno;
- Fez uso de ranitidina, medicação inibidora da bomba protônica.

Metade das crianças fez uso das Técnicas Fonoaudiológicas Facilitadoras da Alimentação para melhorar a aceitação alimentar e dieta hipercalórica para ganhar peso.

Todas as crianças fizeram uso da sonda nasogástrica.

O método de qPCR mostrou eficiência na detecção e quantificação de *Lactobacillus spp* e *Bifidobacterium spp*.

O gênero *Lactobacillus spp* foi encontrado em algumas crianças e em determinados momentos.

De M1 para M2 houve aumento da quantidade de *Bifidobacterium spp*.

REFERÊNCIAS¹

1. ALDEBERTH I. Word AE. Establishment of the gut microbiota in Western infants. **Acta Paediatrica**, v. 98, n. 2, p. 229-38, feb. 2009.
2. ALTERMANN, E. et al. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. **Proc Natl Acad Sci**, v. 102, n. 11, p. 3906–3912, mar. 2005.
3. APPLIED (b). Disponível em:
<http://www6.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/quant_pcr.pdf>.
Acesso em: 09 out. 2012
4. APPLIED. (a) Disponível em:
<<http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/real-time-pcr/taqman-and-sybr-green-chemistries.html?ICID=EDI-Lrn4>>. Acesso em: 09 out. 2012.
5. ARENA, E. P.; PERES, S. P. B. A. **Nutritional profile of children with cleft lip and/or cleft palate**. In: 10th INTERNATIONAL CONGRESS on Cleft Palate and Related Craniofacial Anomalies, 2005, Durban. CLEFT 2005, p. 222.
6. AUGUSTO A. L. P. **Avaliação nutricional**. In: AUGUSTO A. L. P.; ALVES, D. C.; MANDARINO, I. C.; GERUDE, M. *Terapia nutricional*. São Paulo: Atheneu, 1993, p. 28-37.
7. BARRANGOU, R. et al. Comparison of the complete genome sequences of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSM 10140 and BI-04. **J. Bacteriol**, v.191, n. 13, p. 4144–4151, jul. 2009.
8. BARTOSCH, S. et al. Characterization of Bacterial Communities in Feces from Healthy Elderly Volunteers and Hospitalized Elderly Patients by Using Real-Time PCR and Effects of Antibiotic Treatment on the Fecal Microbiota. **Amer Soc Microb App Envi Microb**, v. 70, n. 6, p. 3575-81, june. 2004.
9. BHAT, P. et al. Bacterial flora of the gastrointestinal tract in southern Indian control subjects and patients with tropical sprue. **Gastroenterology**, v. 62, n. 1, p. 11-21, jan. 1971.

¹Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas. Requisitos uniformes para originais submetidos à revistas biomédicas. *J. Pediatr* 1997; 73:213-24. National Library of Medicine. *Listo of journals indexed in Index Medicus*. Washington, 2001. 248p.

10. BLAUT, M. et al. Molecular biological methods for studying the gut microbiota: EU human flora project. **Br J Nutr**, v. 87, (suppl 2), p. 203-11, 2002.
11. BOLOTIN, A. et al. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v. 11, n. 5, p. 731-753, may 2001.
12. BORGGO, H. C. Focus on the family situation of patients with craniofacial defects in Brazil. Global registry and database on craniofacial anomalies. Report of a WHO Registry Meeting on Craniofacial Anomalies. 2001, Bauru, Brazil, p. 42-3.
13. BRANDT, K.; TADDEI, C. et al. Establishment of the bacterial fecal community during the first month of life in brazilian newborns. **Clinics**, v. 67, n. 2, p. 113-123, feb. 2012
14. BRANDT, K. G. Análise molecular da microbiota fecal de recém-nascidos saudáveis, 2008, p. 85, [Tese], (pediatria) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo 2008.
15. BULLEN, C. L.; TEARLE, P. V.; WILLIS, A.T. Bifidobacteria in the intestinal tract of infants: an in vivo study. **Journal of Med Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 325-33, aug. 1976.
16. DAL-PAZ, K. et al. Inibidores da bomba protônica. **Moreira Jr Editora- RBM**, v. 2, n. 1, p. 46-51, 2008.
17. DIÓGENES, P. N. C. et al. Avaliação polissonográfica e de videoendoscopia da deglutição de pacientes portadores da sequência de Pierre-Robin. **Braz. j. Otorhinolaryngol**, v. 75, n. 6, p. 852-856, nov./dec. 2009.
18. DURFEE, T. et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. **J. Bacteriol**, v. 190, n. 7, p. 2597-2606, apr. 2008.
19. EDWARDS, C. A.; PARRET, A. M. - Intestinal flora during the first months of life: new perspectives. **Br J Nutr**, v. 88, n. 1, p.11-18, sep. 2002.
20. FALK, P. G. et al. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. **Microbiol Mol Biol Rev**; v. 62, n. 4, p. 1157-70, dec. 1998.

21. FALKNER, F. **Evaluación Del crecimiento desde la edad fetal hasta los años de edad.** In: BRUNSER, O. et cols. (Eds). *Nutrición clínica em la infância.* New York: Raven Press, 1985. p. 315.
22. FERREIRA, L. M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M. V. J. Modelos Experimentais em pesquisa. **My SciELO**, v. 20, n. 2, p. 28-34, 2005.
23. FINEGOLD, S. M. Interaction of antimicrobial therapy and intestinal microflora. **Am J Clin Nutr**, v. 23, n. 11, p. 1466-71, nov. 1970.
24. FURET, J. P. et al. Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 68, n. 3, p. 351-362, jun. 2009.
25. FURRIE, E. A molecular revolution in the study of intestinal microflora. **Gut**, v. 55, n. 2, p. 141-143, feb. 2006.
26. GIBSON, G. R.; WANG, X. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. **J Appl Bacteriol**; v. 77, n. 4, p. 412-20, oct. 1994.
27. GRACIANO MIG, LEHFELD, N. A. S.; NEVES; F. A. Critérios de avaliação para classificação sócio-econômica: elementos de atualização. **Serv Social Realid**, v. 8, p. 109-28, 1999.
28. GRONLUND, M. M. et al. Maternal breast-milk and intestinal bifidobacteria guide the compositional development of the Bifidobacterium microbiota in infants at risk. **Clin Exp Allergy**, v. 37, n. 12, p. 1764-72, dec. 2007.
29. HAARMAN, M.; KNOL, J. Quantitative Real-Time PCR analysis of fecal *Lactobacillus* species in infants receiving a prebiotic infant formula. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 2359-2365, apr. 2006.
30. HAENEL, H. Human normal and abnormal gastrointestinal flora. **Am J Clin Nutr**, v. 23, n. 11, p. 1433-39, 1970.
31. HAGBERG, C.; LARSON, O.; MILERAD, J. Incidence of cleft lip and palate and risks of additional malformations. **Cleft Palate-Craniofacial Journal**, v. 35, n. 1, p. 40-5. Jan. 1998.

32. HAYASHI, H. et al. Molecular Analysis of Fecal Microbiota in Elderly Individuals Using 16S rDNA Library and T-RFLP. **Microbiol Immuno**, v. 47, n. 8, p. 557-570, 2003.
33. HAYASHI, H.; SAKAMOTO, M.; BENNO, Y. Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture methods. **Microbiol Immunol**, v. 46, n. 8, p. 535-48, 2002.
34. HENTGES, D. J. Fecal flora of volunteers on controlled diets. **Am J Clin Nutr**, v. 31, n.10, p. 123-4, oct. 1978.
35. INGRAHAM, J. L.; INGRAHAM, C. A. **Micro-organismos e a saúde humana**. In: ROSA P. L.; NEVES, M.; ALBUQUERQUE, F. A. Introdução à Microbiologia. 3ª edição. São Paulo: Cengage Learning, 2010, p. 333-351.
36. JOST, T. et al. New insights in gut microbiota establishment in healthy breast fed neonates. **Plos One**, v. 7, n. 8, p. 4495, aug. 2012.
37. KURPAD, A. V.; SHETTY, P. S. Effects of antimicrobial therapy of fecal bulking. **Gut**, v. 27, n. 1, p. 55-8, jan.1986.
38. LANGENDIJK, P. S. et al. Quantitative Fluorescence In Situ Hybridization of Bifidobacterium spp. with Genus-Specific 16S rRNA-Targeted Probes and Its Application in Fecal Samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Department of Medical Microbiology, University of Groningen, v. 61, n. 8, p. 3069-75, aug. 1995.
39. LODE, H. et al. Ecological effects of linezolid versus amoxicilin/clavulanic acido on the normal intestinal microflora. **Scand J Infect Dis**, v. 33, n. 12, p. 899-903, 2001.
40. LOFIEGO, J. L. **Embriologia**. In: **Fissura Lábio-Palatina: avaliação, diagnóstico e tratamento fonoaudiológico**. Rio de Janeiro: Revinter, 1992(a). p. 20-44.
41. MACKIE, R. I.; SGHIR, A.; GASKINS, H. R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, p. 1035-45, 1999.
42. MARQUES, I. L. et al. Seqüência de Robin – protocolo único de tratamento. **J Pediatr** (Rio J), v. 81, n. 1, p. 14-22, 2005b.

43. MARQUES, I. L. et al. Sequência de Robin: protocolo único de tratamento. **J Pediatr**, v. 81, n. 1, p. 14-22, 2005^a.
44. MARTEAU, P. 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**, v. 52, n. 4, p. 685-8, oct. 1990.
45. MATA, L. J.; JEJICANOS, M. L.; JIMÉNEZ, F. Studies on the indigenous gastrointestinal flora of Guatemalan children. **Am J Clin Nutr**, v. 25, n. 12, p. 1380-90, dec. 1972.
46. MATHYS, S. et al. PCR and real-time PCR primers developed and identification of *Bifidobacterium thermophilum* in faeces. **BMC Microbiology**, v. 8, p. 179, oct. 2008.
47. MATSUKI, T. et al. Quantitative PCR with 16S rRNA-Gene-Targeted Species-Specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 167-173, jan. 2004.
48. MEYER, A. C. et. Al. Airway interventions in children with Pierre Robin Sequence. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 138, n. 6, p. 782-7, jun. 2008.
49. MITCHELL, D. K. Et al. Prospective study of toxigenic *Clostridium difficile* in children given amoxicillin/clavulanate for otitis media. **Pediatr Infect Dis J**, v. 15, n. 6, p. 514-9, jun. 1996.
50. MONDINI, C. C. S. D. **Avaliação da capacidade de cuidadores de lactentes com Sequência de Robin**. 2008, [Tese]. Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo, Bauru, 2008.
51. MONREAL, M. T. F. D.; PEREIRA P. C. M.; LOPES C. A. M. Intestinal microbiota of patients with bacterial infection of the respiratory tract treated with amoxicillin. **Braz J Infect Dis**, Salvador, v. 9, n. 4, p. 292-300, aug. 2005.
52. MOORE, W. E. C.; HOLDEMAN, L. V. Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. **Appl Environ microbiol**, v. 27, n. 5, p. 961-79, may. 1974.

53. MORAES-FILHO, J. P. P., et al. Brazilian Consensus on Gastroesophageal Reflux Disease: Proposals for Assessment, Classification, and Management. **Am J Gastroenterol**. v. 97, n., p. 241-8, 2002.
54. MORAIS, M. B.; JACOB, C. M. A. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 5, p. 189-197, nov. 2006.
55. MOREAU, M. C.; COSTE, M. Immune responses to dietary protein antigens. **World Rev Nutr Dietetics**, v. 74, p. 22-57, 1993.
56. MOUNTZOURIS, K. C.; MCCARTNEY, A. L.; GIBSON, P. R. Intestinal microflora of human infants and current trends for its nutritional modulation. **Br J Nutr**, v. 87, n. 5, p. 405-20, may. 2002.
57. MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; Pfaller, M. A. **Microbiota Comensal e Patogênica no Homem**. In: GUEDES, R. Microbiologia Médica. 5ª edição. São Paulo: Elsevier, 2008, p. 81-84.
58. NORDENVALL B. et al. The effect of clindamycin on the intestinal flora in patients with enteric hyperoxaluria. **Scand J Gastroenterol**, v. 18, n. 2, p. 177-81, mar. 1983.
59. PARK, H. K. et al. Molecular analyses of colonized bacteria in a human newborn infant gut. **J Microbil**, v. 43, n. 4, p. 345-53, aug. 2005.
60. PERES, S. P. B. A. et. Al. **A importância da Intervenção Dietética no Estado Nutricional de Lactentes com Sequência de Robin**. In: 1º Simpósio Internacional de Nutrologia Pediátrica, 2006, São Paulo. Anais do 1º Simpósio Internacional de Nutrologia Pediátrica: Programa Final e Resumo de Temas Livres. São Paulo, 2006, p. 62.
61. PERES, S. P. B. A. **Importância da intervenção dietética no estado nutricional de crianças portadoras de Sequência de Robin** [Tese] - Faculdade de Medicina de Botucatu- UNESP, Botucatu, 2000.
62. PUERARI, V. R. **Sequencia de Robin isolada Diagnóstico e Condutas**, 2001, [Monografia]. MOTRICIDADE ORAL - CEFAC Centro de Especialização em Fonoaudiologia Clínica, Porto Alegre.
63. RICHARD, M. E. Weight comparisons of infants with complete cleft lip and palate. **Pediat Nursing Pitman**, v. 20, n. 2, p. 191-6, apr. 1994.

64. RINTTILÄ, T. et al. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 6, p. 1166–1177, 2004.
65. RYAN, J. L.; PROJAN, S. J. Doenças Bacterianas. In: PARSLOW, T. G.; STITES, D. P. et al. *Imunologia Médica*. Décima edição. Guanabara Kooganp, 2001. 528-36p.
66. Salminen S, Isolauri E, Onnela T. Gut flora in normal and disordered states. **Chemotherapy**, v. 41, (Suppl 1), p. 5-15, 1995.
67. SHER, A. E. Mechanisms of airway obstruction in Robin sequence: implications for treatment. **Cleft Palate Craniofac J**, v. 29, n. 3, p. 224-31, may. 1992
68. SHER, A. E.; SHPRINTZEN, R. J.; THORPY, M. J. Endoscopic observations of obstructive sleep apnea in children with anomalous upper airways: predictive and therapeutic value. **J. Pediatr Otorhinolaryngol**, v. 11, n. 2, p. 135-46, apr. 1986
69. SILVA, A. M. P. Efeito da levofloxacin na microbiota intestinal de pacientes com pneumonia adquirida na comunidade, 2008, 73f, [dissertação], - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2008.
70. SIPOS, R. et al. Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 60, n. 2, p. 341-50, may 2007.
71. SUAU, A. et al. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecularspecie within the human gut. **Appl Environ Microbiol**, v. 65, n. 11, p. 4799-807, nov. 1999.
72. TALARICO, S. T. **Detecção e quantificação de bactérias anaeróbias na microbiota fecal de crianças de zero a 12 meses de idade** [Dissertação]. São Paulo: Umiversidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2012.
73. TANNOCK, G. W. Analysis of the intestinal microflora: a renaissance. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 76, n. 1-4, 1999, p. 265-78.

74. TANNOCK, G. W. New perceptions of the gut microbiota: implications on the future research. **Gastroenterol Clin North Am**, v. 34, n. 3, p. 361-82, sep. 2005.
75. TRABULSI, L. R.; SAMPAIO, M. C. Microbiota normal do corpo humano. In: Trabulsi LR. Alterthum F. Microbiologia. 5. ed. São Paulo, SP: Atheneu, 2008. p.103-10.
76. TURRONI, F. et al. Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota. **Plos One**, v. 7, n. 5, p. 36957, may 2012.
77. VAEL, C.; DESAGER, K. The importance of the development of the intestinal microbiota in infancy. **Curr Opin Pediatr**, v. 21, p. 794-800, 2009.
78. VAN DER WAAIJ, D. Colonization resistance of the digestive tract: Clinical consequences and implications. **J Antimicrob Chemother**; v. 10, n. 4, oct. p. 263-701982.
79. VANDENPLAS Y. et al. Probiotics and prebiotics in prevention and treatment of diseases in infants and children. **J Pediatr (Rio J)**, v. 87, n. 4, p. 292-300, mar. 2011.
80. VIEIRA, N. A. Microbiota intestinal de crianças com anomalias craniofaciais atendidas em um hospital especializado, 2009, p. 111, [dissertação]. Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu.
81. VIEIRA, N. A.; PEREIRA, P. C. M. **Gastroenteritis by rotavirus in a hospital specialized in children with craniofacial malformation**. In: 10th INTERNATIONAL CONGRESS on Cleft Palate and Related Craniofacial Anomalies, Durban, v. 16, n. 2, p. 222, 2005.
82. WECKWERTH, P. H. et al. Bacteriologia da otite média crônica supurativa em crianças portadores de fissura palatal. **Rev Bras Med**, v. 50, p. 602-10. 1993.
83. WEITZBERG, D. L.; FERREINI, M. T. **Avaliação nutricional**. In: WAITZBERG, D. L. Nutrição enteral e parenteral na prática clínica. Rio de Janeiro: Atheneu, 1995, p. 127-52.
84. World Health Organization. Report of a WHO Expert Commite Physical status the use and interpretation of anthropometry. Geneva, 1995.

85. ZHANG, T.; SHAO, M. F.; FANG, H. H. P. A qRT-PCR-based method for the measurement of *rrn* operon copy number. Letters in **Applied Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 26-30, jul. 2009.
86. ZOEDENTAL, E. et al. Molecular microbial ecology of the gastrointestinal tract: from phylogeny to function. **Curr Issues Intestinal Microbiol**, v. 5, n. 2, p. 31-47, 2004.

ANEXOS

Anexo 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. (a) _____, portador da cédula de identidade _____, responsável pelo paciente _____,

após leitura minuciosa deste documento, devidamente explicado pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO concordando em participar da pesquisa “ANÁLISE DA DIVERSIDADE DA MICROBIOTA FECAL PELA TECNICA DE PCR EM TEMPO REAL DE RECÉM-NASCIDOS COM SEQUÊNCIA DE ROBIN”, realizada por Dr. Narciso Almeida Vieira e Beatriz Pereira Cestari que tem como objetivo caracterizar a microbiota intestinal em crianças com Sequência de Robin durante o tratamento específico no HRAC-USP. Segundo os autores, todas as pessoas possuem alguns micro-organismos no intestino que ajudam a evitar doenças e participam de várias reações que trazem benefícios ao ser humano. Porém, quando doente ou quando são utilizados determinados remédios, o homem pode ter diminuição destes micro-organismos e assim dificultar a sua recuperação. Com os resultados obtidos será possível oferecer orientações relativas à alimentação, como forma de melhorar a quantidades destes micro-organismos que trazem benefícios à saúde. Participando deste estudo, será necessário fornecer uma pequena quantidade de fezes e informar o peso e altura a partir da primeira internação hospitalar e as demais nos retornos agendados para tratamento no HRAC-USP quando o paciente completar um mês de vida.

Caso o sujeito da pesquisa queira apresentar reclamações em relação a sua participação na pesquisa, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, do HRAC-USP, pelo endereço Rua Silvio Marchione, 3-20 no Serviço de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão ou pelo telefone (14) 3235-8421.

Fica claro que o sujeito da pesquisa ou seu representante legal, pode a qualquer momento retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornar-se-ão confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 1º do Código de Ética Profissional do Biólogo).

Por estarem de acordo assinam o presente termo.

Bauru, SP, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Sujeito da Pesquisa
ou responsável

Assinatura do Pesquisador

*Pesquisador Responsável: Dr. Narciso Almeida Vieira (CRBIO 06350-01)
Rua Silvio Marchione, 3-20, CEP 17012-900, Bauru, SP
Telefone: (14) 3235-8100; email: vieirana@usp.br*

Anexo 2**FICHA DO SERVIÇO SOCIAL**

HG nº _____

I - Investigação Diagnóstica1 - Classificação Sócio-Econômica: _____ Total pontos:

() N/C () F - BI () E - BS () D - MI () C - M () B - MS () A - AL
 00 - 20 20 - 30 30 - 40 40 - 47 47 - 54 54 - 57

OBS.: Alteração da Tabela () Sim () Não Esp. _____

2 - Situação econômica da família: _____ salários mínimos

Pontos	Renda bruta mensal	Especificação
21 ()	acima de 100 SM	_____
18 ()	60 - 100 SM	_____
14 ()	30 - 60 SM	_____
12 ()	15 - 30 SM	_____
9 ()	09 - 15 SM	_____
5 ()	04 - 09 SM	_____
3 ()	02 - 04 SM	_____
2 ()	1/2 - 02 SM	_____
1 ()	0 - 1/2 SM	_____

Tipo de rendimento:

() salário () retirada pró-labore () rendimento financeiro () aluguéis () honorários
 () aposentadoria () pensionista () outros. Especificar: _____

3 - Número de membros residentes da família / Especificação: _____ pessoas

Pontos	Especificação / Relações (religião)
6 ()	até 2
4 ()	2 - 4
3 ()	4 - 6
2 ()	6 - 8
1 ()	acima de 8

4 - Escolaridade - Maior nível educacional / responsável * _____

Pontos	Nível educacional	Especificação / Vínculo/Relações
7 ()	1-Superior	_____
5 ()	2-Superior incompleto / 3-Colegial completo	_____
4 ()	4-Colegial incompleto / 5-Ginásio completo	_____
3 ()	6-Ginásio incompleto / 7-Primário completo	_____
2 ()	8- Primário incompleto	_____
1 ()	9-Sem escolaridade / alfabetizado	_____
0 ()	10-Sem escolaridade / analfabeto	_____
N ()	11-Sem idade escolar	_____

5 - Habitação / Situação _____ 6 - Habitação / Condição _____

Situação - Pontos					Condição / Acomodações	
1 - Prec.	2 - Ins.	3 - Reg.	4 - Boa	5 - Ótima	()	()
6	7	8	9	10	()	1 - Própria
5	6	7	8	9	()	2 - Financiada
4	5	6	7	8	()	3 - Alugada
2	3	4	5	6	()	4 - Cedida
0	0	0	1	2	()	5 - Outras. Espec.

Obs.: Número de cômodos _____ cômodos

continuação

Anexo 3

Protocolo de Avaliação Clínica

RG _____ Nome: _____
 Idade: _____ Sexo () Masc () Fem _____ Data: ____ / ____ /200____
 Cor: _____ Altura: _____ Peso: _____

- a) Hipótese diagnóstica: _____
 b) Queixa principal geral: _____
 c) Duração da doença: _____
 () febre – Dias _____ () vômito – Dias _____
 () náuseas – Dias _____ () diarreia – Dias _____
 () apática – Dias _____ () inapetência – Dias _____
 () sintomas respiratórios – Dias _____
 () dor abdominal – Dias _____ () desidratação: () 1º grau () 2º grau () 3º grau
 () hidratado/medicações - _____ – Dias _____
 d) Medicações em uso: _____
 e) Antecedentes pessoais patológicos: _____
 f) Antecedentes familiares: _____
 g) Antecedentes alimentares – aleitamento materno: () Sim () Não –
 Período: _____
 h) Acha que seu filho tem intestino preso ou é ressecado?
 () Sim () Não
 Há quanto tempo? _____
 Uso da Técnica Fonoaudiológica Facilitadora da Alimentação (TFFA): () Sim () Não

	x / dia	-	x / semana
Consistência fecal	Frequência		
Duras { 5 – Banana com rachos profundos _____ 4 – Banana com rachos superficiais _____ 3 – Banana lisa _____ Macias { 2 – Massa _____ 1 – Líquida _____	6 – Pelotas, enrugadas ou partidas	-	Frequência

DIFICULDADE AO EVACUAR

Frequência
Força muito:

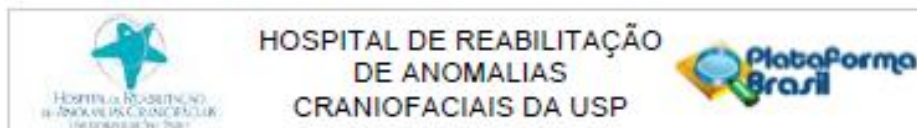
Demora muito: _____
 Cora: _____
 Sangue nas fezes: _____
 Desiste: _____

Usa algum produto ou medicamento para ajudar funcionar intestino:
 () Sim () Não - Qual: _____

Seu filho costuma apresentar algum destes sintomas? Assinale com um X
 Frequência

- () Vômitos _____
 () Dor no abdômen _____
 () Empaxamento _____
 () Flatulência (gases) _____

Anexo 4



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise da diversidade da microbiota fecal de crianças com Sequência de Robin de zero a trinta dias de idade por meio da técnica de PCR em tempo real

Pesquisador: NARCISO ALMEIDA VIEIRA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 02083612.1.0000.5441

Instituição Proponente: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da USP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 187.475

Data da Relatório: 19/12/2012

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de Pesquisa de Atualização, de autoria de Beatriz Pereira Cestari, sob orientação do Dr. Narciso Almeida Vieira.

Objetivo da Pesquisa:

Caracterizar a MI de crianças com Sequência de Robin atendidas em um hospital especializado no primeiro mês de vida por meio da técnica de PCR em tempo real.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Adequado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O conhecimento da microbiota permite a utilização de diferentes estratégias com o intuito de manipular as populações bacterianas e promover a saúde. Diante a importância da MI para a saúde humana e considerando a inexistência de estudos aplicados a população de crianças com malformação craniofacial, especialmente as com SR, justifica-se a realização deste trabalho.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequado.

Recomendações:

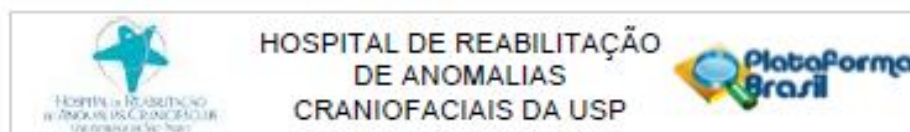
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Recomendo ao CEP o parecer aprovado.

Endereço: SILVIO MARCHIONE 3-20
 Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA CEP: 17.012-900
 UF: SP Município: BAURU
 Telefone: (14)3235-8421 Fax: (14)3234-7818 E-mail: uep_projeto@centrinho.usp.br

Continuação

Continuação

**Situação do Parecer:**

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Colegiado acatou o parecer do relator em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes estabelecidas na Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê. O pesquisador fica responsável pela entrega na Seção de Apoio a Pesquisa do SVAPEPE dos relatórios semestrais e final.

Informamos que após o recebimento do trabalho concluído, este Comitê enviará o parecer final para publicação do trabalho.

Projeto aprovado na reunião de 26/05/2012, na fase de adequação da Plataforma Brasil.

BAURU, 21 de Janeiro de 2013

Assinador por:
Marcia Ribeiro Gomide
 (Coordenador)

Endereço: SILVIO MARCHIONE 3-20
 Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA CEP: 17.012-900
 UF: SP Município: BAURU
 Telefone: (14)3235-8421 Fax: (14)3234-7818 E-mail: usp_projeto@centrinho.usp.br