

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

NARCISO ALMEIDA VIEIRA

**Microbiota intestinal de crianças com anomalias
craniofaciais atendidas em um hospital especializado**

BOTUCATU – SP

2009

NARCISO ALMEIDA VIEIRA

**MICROBIOTA INTESTINAL DE CRIANÇAS COM
ANOMALIAS CRANIOFACIAIS ATENDIDAS EM UM
HOSPITAL ESPECIALIZADO**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de
Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” – UNESP, para a obtenção do título
de Doutor em Doenças Tropicais.**

Orientador:

Prof. Adjunto Paulo Câmara Marques Pereira

BOTUCATU – SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus

Vieira, Narciso Almeida.

Microbiota intestinal de crianças com anomalias craniofaciais atendidas em um hospital especializado / Narciso Almeida Vieira. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2009.

Orientador: Paulo Câmara Marques Pereira

Assunto CAPES: 40101096

1. Microbiota intestinal 2. Intestinos - Doenças

CDD 616.342

Palavras chave: Bacteroides sp; Bifidobacterium sp; Fissura de palato; Lactobacillus sp; Malformação craniofacial; Microbiota intestinal

Dedicatória

- À minha amada esposa Marisa, pelo suporte afetivo, por priorizar meus estudos e, especialmente, pela cumplicidade com que soube partilhar experiências.

- Aos meus queridos filhos Ariane e Ivan, que diariamente me motivam a crescer, comprovando que vale a pena estudar, independentemente da área escolhida

- Aos meus pais Antonio (em memória) e Carolina, pela dádiva da vida e pela longa trajetória de ensinamentos.

Agradecimentos Especiais

A Deus, por guiar meu caminho, abrindo portas e janelas para meu desenvolvimento pessoal e científico.

Ao Prof. Dr. Paulo Câmara Marques Pereira, pela grandeza de alma, pelo compartilhamento de conhecimentos tão peculiares.

Ao Dr. Hilton Coimbra Borgo, pelas precisas análises estatísticas e pela preciosa amizade, com sugestões sempre tão pertinentes.

À Profa. Dra. Jussara Marcondes, pelo verdadeiro presente que me concedeu ao apresentar-me a meu orientador, pela amizade, pelas delicadas e pertinentes sugestões.

Aos pacientes do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo que participaram desta pesquisa e que se constituem na essência deste estudo. A todos eles e a seus familiares registro meu “muito obrigado” especial.

Agradecimentos

O estímulo, a colaboração e a dedicação de diversas pessoas foram valiosos na tarefa de juntar e dividir experiências intelectuais para, então, aplicá-las na base das reflexões deste trabalho. A todas elas, dedico minha inteira gratidão.

Em particular, desejo assinalar o meu reconhecimento:

*Ao Prof. Dr. José Alberto de Souza Freitas (Tio Gastão),
à Profa. Dra. Maria Irene Bachega,
à Profa. Dra. Sílvia Piazzentini Penna e
ao Dr. Luiz Henrique Marchesano,
pelo exemplo de profissionalismo;*

Ao Prof. Dr. Domingos Alves Meira, por me apontar um caminho sem volta na estrada da Pesquisa Científica, impulsionando-me com seu admirável exemplo pessoal e profissional;

*Aos colegas do Laboratório de Patologia Clínica do HRAC-USP,
Marina Ponce Ciniciato, Sílvia Cristina Arantes, Ana Lúcia Peroni
Costa Cardoso, José Carlos Dotta, Salete Silvério da Costa e Marcos
Vinício Simionato, pela vivência cotidiana;*

*Às colegas do HRAC-USP, Alair Francisquette, Ilma
Sacramento M. de Souza e Patrícia Jorge Neves, pela
relevante colaboração no desenvolvimento deste estudo;*

*Aos colegas das Seções de Documentação e Informação e de Apoio à
Pesquisa do HRAC-USP, especialmente à Ana Aparecida Gomes Grigolli,
Denise Aparecida Giachetti, Rosemeire Aparecida Gimenez Botelho, Ana
Regina Carvalho de Ângelo e ao Ricardo Pimentel Nogueira, pelos auxílios
prestados, tão valiosos para a concretização desta obra.*

Aos funcionários do HRAC-USP, em especial às equipes de Arquivo de Prontuários, Serviço de Comunicação e Informática Hospitalar pelo indispensável apoio técnico;

Ao Prof. Washington Petracca de Menezes pela amizade e pela participação ativa na realização desta obra;

À equipe da seção de Pós-Graduação da UNESP – Campus Botucatu, pela competência e amizade;

E a tantos outros que omito para não tornar esta parte interminável.

Para finalizar, faço uma menção especial aos que me ofereceram os ensinamentos e estímulos mais constantes: os professores, colegas e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

Epígrafe

"Em TODAS as atividades humanas existem esforços e resultados, e a intensidade do esforço é a medida do resultado. O acaso não existe. 'Dons', potencialidades, bens materiais, intelectuais e espirituais são frutos do esforço; são pensamentos concluídos, alvos atingidos, visões realizadas."

- James Allen

Sumário

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	xii
Lista de Tabelas.....	xiv
Resumo	xvii
Abstract	xix
1 – INTRODUÇÃO	01
2 – OBJETIVOS	07
3 – CASUÍSTICA E MÉTODOS	09
3.1 – Casuística	10
3.2 – Métodos	10
4 – RESULTADOS	25
5 – DISCUSSÃO	42
6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
7 – REFERÊNCIAS	55
8 – ANEXOS	66
9 – APÊNDICES.....	74

Lista de figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Distribuição das 61 crianças dos grupos FP e C , de acordo com faixas etárias. Bauru-SP, 2009.....	28
Figura 2 –	Distribuição das 61 crianças com e sem malformação craniofacial dos grupos FP e C , de acordo com o nível socioeconômico. Bauru-SP, 2009.....	29
Figura 3 –	Distribuição das 61 crianças com e sem malformação craniofacial dos grupos FP e C de acordo com o tipo de parto. Bauru, SP, 2009.....	31
Figura 4 –	Mediana da contagem logarítmica de <i>Lactobacillus sp</i> nas fezes das 61 crianças com e sem malformação craniofacial dos grupos FP e C de acordo com a avaliação nutricional. Bauru-SP, 2009.....	38
Figura 5 –	Mediana da contagem logarítmica de <i>Bacteroides sp</i> nas fezes das 61 crianças com e sem malformação craniofacial dos grupos FP e C de acordo com a avaliação nutricional. Bauru-SP, 2009.....	39
Figura 6 –	Mediana da contagem logarítmica de <i>Bifidobacterium sp</i> nas fezes das 61 crianças com e sem malformação craniofacial dos grupos FP e C de acordo com a avaliação nutricional. Bauru-SP, 2009.....	40
Figura 7 –	Mediana da contagem logarítmica de <i>Lactobacillus sp</i> , <i>Bacteroides sp</i> e <i>Bifidobacterium sp</i> nas fezes das 26 crianças com malformação craniofacial do grupo FP nos momentos M1 e M2 . Bauru-SP, 2009.....	41

Lista de tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Distribuição das 61 crianças, com e sem malformação craniofacial, dos grupos FP e C, de acordo com o sexo. Bauru, SP, 2009.....	27
Tabela 2 –	Distribuição das 61 crianças com e sem malformação craniofacial do grupo FP e C de acordo com a avaliação nutricional. Bauru, SP, 2009.....	30
Tabela 3 –	Distribuição das 60 crianças com e sem malformação craniofacial dos grupos FP e C de acordo com o tempo de aleitamento materno. Bauru, SP, 2009.....	32
Tabela 4 –	Mediana da contagem logarítmica de <i>Lactobacillus sp</i> , <i>Bacteroides sp</i> e <i>Bifidobacterium sp</i> nas fezes das 61 crianças com e sem malformação craniofacial dos grupos FP e C antes da palatoplastia e sem antibioticoterapia nos últimos 30 dias. Bauru-SP, 2009.....	33
Tabela 5 –	Mediana da contagem logarítmica de <i>Lactobacillus sp</i> , <i>Bacteroides sp</i> e <i>Bifidobacterium sp</i> nas fezes das 61 crianças com e sem malformação craniofacial dos grupos FP e C, de acordo com o tipo de parto. Bauru-SP, 2009...	34
Tabela 6 –	Mediana da contagem logarítmica de <i>Lactobacillus sp</i> , <i>Bacteroides sp</i> e <i>Bifidobacterium sp</i> nas fezes das 60 crianças com e sem malformação craniofacial dos grupos FP e C de acordo com o aleitamento materno. Bauru-SP, 2009.....	35
Tabela 7 –	Mediana da contagem logarítmica de <i>Lactobacillus sp</i> , <i>Bacteroides sp</i> e <i>Bifidobacterium sp</i> nas fezes das 50 crianças do grupo FP com e sem discreta anemia. Bauru-SP, 2009.....	36
Tabela 8 –	Mediana da contagem logarítmica de <i>Lactobacillus sp</i> , <i>Bacteroides sp</i> e <i>Bifidobacterium sp</i> nas fezes das 61 crianças dos grupos FP e C de acordo com o nível socioeconômico. Bauru-SP, 2009.....	37
Tabela 9 –	Tabela 9 – Mediana da contagem logarítmica de <i>Lactobacillus sp</i> , <i>Bacteroides sp</i> e <i>Bifidobacterium sp</i> nas fezes das 14 crianças dos grupos FP e C do nível socioeconômico médio e sem excesso de peso. Bauru-SP, 2009.....	41

Resumo

RESUMO

O ecossistema gastrintestinal é caracterizado por interações recíprocas e dinâmicas entre o epitélio gastrintestinal, células do sistema imunológico e sua microbiota intestinal (**MI**), a qual desempenha atividades metabólicas importantes locais (mucosa intestinal) e sistêmicas. Avaliar a **MI** de crianças com malformação craniofacial atendidas em um hospital especializado e verificar a influência da antibioticoprofilaxia com cefazolina em palatoplastia foi o objetivo desse trabalho. Foram isoladas e quantificadas as bactérias anaeróbias intestinais dos gêneros *Bacteroides sp*, *Bifidobacterium sp* e *Lactobacillus sp* nas fezes de 11 crianças sem fissura de palato (**C**) e de 50, com fissura de palato (**FP**), no período compreendido entre maio de 2007 a setembro de 2008. Foi avaliada a **MI** de 18 crianças com fissura de palato após 24 horas de tratamento, em dose única na indução anestésica, com cefazolina para palatoplastia. Observou-se que a frequência de *Bacteroides sp* foi maior no grupo **FP** ($p < 0,001$). Para *Lactobacillus sp*, houve tendência a maior quantidade ($p = 0,086$) no grupo **FP**. Não houve diferença na frequência de *Bifidobacterium sp* entre os dois grupos de crianças ($p = 0,495$). Houve diminuição do número de UFCs de *Bacteróides sp* ($p = 0,031$) e *Lactobacillus sp* ($p = 0,004$) em crianças com fissura tratadas com cefazolina em cirurgia de palato. Para o gênero *Bifidobacterium sp*, houve tendência à diminuição nas UFCs ($p = 0,063$). A dificuldade de ingestão de nutrientes, aleitamento materno insuficiente, otites recorrentes, entre outras ocorrem com frequência em indivíduos com malformação craniofacial, o que pode ter influenciado na composição da **MI**. A associação da palatoplastia e o uso de antibiótico

intensificaram as mudanças na **MI**. Novas investigações devem ser realizadas para verificar quais fatores relacionados à malformação craniofacial, ao tratamento cirúrgico e o uso de antimicrobianos, estariam implicados na alteração da **MI** encontrada neste trabalho bem como suas repercussões clínicas.

Abstract

ABSTRACT

The gastrointestinal ecosystem is characterized by reciprocal and dynamic interactions between the host and the intestinal microbiota (**IM**), which performs local important metabolic (intestinal mucosa) and systemic activities. The purposes of this study are the assessment of the **IM** in children with craniofacial malformation attended at a specialized hospital and the verification of the influence of the antibiotic prophylaxis with cefazolin on palatoplasty. The intestinal anaerobic bacteria *Bacteroides* sp, *Bifidobacterium* sp and *Lactobacillus* sp were isolated and quantified in the feces of 11 non-cleft children (**NC**) and 50 cleft children (**CP**), from May 2007 to September 2008. After a 24-hour treatment, the **IM** in 18 cleft children was evaluated – in a single dose – by means of anesthetic induction with cefazolin, in palatoplasty. It was observed that the *Bacteroides* sp occurred more often in the **CP** group ($p < 0.001$). Regarding the *Lactobacillus* sp, the largest quantity ($p = 0.086$) tended towards the **CP** group. There was no frequency difference for the *Bifidobacterium* sp between the two groups of children ($p = 0.495$). There was a reduction in the number of Colony-Forming Units (CFUs) for the *Bacteroides* sp ($p = 0.031$) and the *Lactobacillus* sp ($p = 0.004$) in cleft children treated with cefazolin, in palate surgeries. Regarding the *Bifidobacterium* sp, there was a reduction tendency in the CFUs ($p = 0.063$). The difficulty to ingest nutrients, the insufficient breastfeeding, the recurrent otitis – among other things – are frequent in individuals with craniofacial malformation, which may have influenced the **IM** composition. The association between palatoplasty and the

use of antibiotics has intensified the **IM** changes. New investigations must be performed in order to verify which factors related to the craniofacial malformation, the surgical treatment and the use of antimicrobians would be involved in the **IM** changes pointed out by this study, as well as the clinical repercussions.

1 – Introdução

1 – INTRODUÇÃO

O ecossistema intestinal é caracterizado por interações recíprocas e dinâmicas entre o hospedeiro e sua microbiota. Estima-se que o trato gastrointestinal do homem seja colonizado por mais de 500 espécies de micro-organismos. No cólon, a concentração de bactérias pode atingir de 10^{11} a 10^{12} unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) e, para desempenhar importantes funções metabólicas, destacam-se em ordem decrescente os anaeróbios *Bacteróides sp*, *Bifidobacterium sp* e *Lactobacillus sp*, entre outros (1-3).

A partir do nascimento, o trato gastrointestinal do lactente, previamente estéril, começa a ser colonizado por micro-organismos no contato com a mãe e o meio ambiente. Inicialmente, *Escherichia coli*, *Clostridium sp* e *Streptococcus sp* colonizam os intestinos. Com o aleitamento materno, surgem os *Bifidobacterium sp* e os *Lactobacillus sp* e, em seguida, os *Bacteroides sp*, *Eubacterium sp* e *Peptococcus sp*. Em lactentes, a quantidade de *Bifidobacterium sp* pode variar de acordo com o tempo de aleitamento materno, devido aos fatores promotores do crescimento presentes no leite humano. Normalmente, o recém-nascido apresenta uma população heterogênea de bactérias nos intestinos, a qual permanece relativamente estável durante toda a vida (4).

As bactérias intestinais podem ser divididas em espécies prejudiciais, benéficas e indiferentes para o hospedeiro. Entre os efeitos nocivos, podem ser citados a diarreia, infecções, danos hepáticos, carcinogênese e putrefação intestinal. A inibição do crescimento de micro-organismos prejudiciais melhora

da digestão, da absorção de nutrientes essenciais, da síntese de vitaminas, estimulação do sistema imune e secreção de citocinas anti-inflamatórias são exemplos de efeitos protetores desenvolvidos pela microbiota intestinal (**MI**), principalmente por *Bifidobacterium sp* e *Lactobacillus sp*. O grupo de *Bacteroides sp* é capaz de desempenhar ações benéficas e prejudiciais. De acordo com Ryan & Projan ⁽⁵⁾, essas bactérias são inócuas a não ser que a barreira da mucosa do trato gastrointestinal ou das vias respiratórias esteja lesada ^(1, 5).

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*, Gram-positivas como *Lactobacillus sp*. e *Bifidobacterium sp*, 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. Quando presentes na dieta alimentar, recebem o nome de probióticos ^(1, 6, 7).

Muitos estudos têm sido conduzidos, com o objetivo de verificar modificações na composição da **MI** em decorrência de dietas ^(2, 3, 8-10), idade ^(6, 11), localização geográfica ^(12, 13, 14), terapias medicamentosas ^(15, 16) e doenças entéricas ^(17, 18). Uma das funções mais importantes da **MI** é a proteção contra a colonização por micro-organismos potencialmente patogênicos – “resistência à colonização”, e os anaeróbios são os principais micro-organismos envolvidos nesse processo ⁽⁷⁾. 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 produzir “bacteriocinas”, substâncias semelhantes a antibióticos, que inibem o

crescimento bacteriano de algumas espécies e exercem efeito auto-regulador sobre as produtoras ⁽⁸⁻¹⁰⁾.

Alguns fatores como doenças e determinados medicamentos podem destruir o equilíbrio da **MI**. Nesse sentido, pode também ser influenciado pela dieta, localização geográfica, cirurgias do trato gastrointestinal, etnia, uso de mamadeiras, hospitalização e, principalmente, durante o uso de antimicrobianos ^(1, 11). O impacto de antimicrobianos sobre a composição da microbiota colônica 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 microflora intestinal ^(1, 2).

Recentes 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 ^(1, 12). A administração de antibióticos pode provocar mudanças na microbiota normal da orofaringe e dos intestinos. Após terapia antimicrobiana, pode ocorrer redução no número de micro-organismos que habitam normalmente o trato gastrointestinal, permitindo o crescimento excessivo de espécies bacterianas já presentes e consequente colonização por micro-organismos potencialmente patogênicos. O uso de antibióticos também pode promover o desenvolvimento de resistência do micro-organismo com possibilidade de disseminação desses agentes resistentes pelo meio ambiente ^(1, 12). Estudos realizados por Monreal et al. ⁽¹⁾, Silva AMP⁽¹⁹⁾ e Lode et al. ⁽²⁰⁾, demonstraram que a **MI** retorna ao normal 30 dias após o término do tratamento com antimicrobianos.

A antibioticoprofilaxia em cirurgia diz respeito à utilização do antibiótico em pacientes sem evidências de processo infeccioso estabelecido, com o

objetivo de prevenir a infecção sistêmica ou da ferida operatória que eventualmente possa ocorrer ⁽²¹⁾. O uso de antimicrobianos profiláticos em cirurgia está indicado nas intervenções em que é alta a probabilidade de infecção da ferida operatória, como pode ocorrer nas cirurgias não contaminadas ou potencialmente contaminadas; e também nos casos em que complicação séptica represente perda total do procedimento, como ocorre na implantação de próteses e, finalmente, em pacientes imunossuprimidos ^(21, 22). As altas taxas de infecção sem antibiótico e sua redução com o uso, em estudos clínicos controlados, justificam a profilaxia nessas circunstâncias ⁽²³⁾. No caso das cirurgias contaminadas e infectadas, a indicação de antibióticos é feita com finalidade curativa e não profilática, obedecendo às normas já estabelecidas para a antibioticoterapia clássica ⁽²¹⁾.

As anomalias craniofaciais, como fissura pré e pós-forame incisivo, são resultados de alteração ocorridas durante o desenvolvimento embrionário humano, podendo ser notadas no embrião de apenas alguns dias ⁽²⁴⁾. Os pacientes com fissura labiopalatina ainda não operados, por sua vez, apresentam prejuízo na formação da pressão intra-oral negativa durante a sucção, com consequente ingestão insuficiente de leite e, muitas vezes, inviabilização do aleitamento materno. Assim sendo, pode haver comprometimento da evolução clínico-nutricional, predispondo a criança a infecções ^(25, 26). O palato fendido também leva à comunicação entre as cavidades oral e nasal, prejudicando ainda mais a alimentação do indivíduo, com perdas de alimentos pelo nariz ou aspiração dos mesmos, que causam também infecção respiratória e otites de repetição. Para esses pacientes, a cirurgia é o grande destaque do tratamento. No Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo (HRAC-USP) as

queiloplastias (cirurgia de lábio) são feitas a partir de três meses de idade e as palatoplastias (cirurgia de palato) podem ser feitas a partir de nove meses de idade mas, em geral, são realizadas após a criança completar 12 meses ^(25, 26).

O tratamento profilático para crianças submetidas à palatoplastia é a cefazolina, antibacteriano betalactâmico pertencente ao grupo das cefalosporinas de primeira geração. As cefalosporinas de primeira geração são ativas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, não tendo ação contra *Enterococcus sp*, *Pseudomonas sp*, *Listeria sp*, *Clamidia sp* e *Stafilococcus aureus* resistentes à oxacilina. Suas principais indicações clínicas são o tratamento de infecções estafilocócicas, infecções respiratórias provocadas por *Haemophilus influenzae* e a prevenção de infecções cirúrgicas ⁽²⁷⁾.

Vale ressaltar que pouco se sabe a respeito da associação entre as malformações craniofaciais e a microbiota gastrointestinal. Diante da importância da **MI** para a saúde humana e considerando a inexistência de estudos aplicados à população de crianças com malformação craniofacial, justifica-se a realização deste trabalho, com o objetivo de se verificar a concentração das bactérias anaeróbias intestinais dos gêneros *Bacteroides sp*, *Bifidobacterium sp* e *Lactobacillus sp* em fezes de lactentes, com e sem fissura de palato, nos momentos antes e após 24 horas do tratamento com cefazolina em cirurgia de palato.

2 – Objetivos

2 – OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

- Avaliar a microbiota intestinal de crianças com malformação craniofacial, com idade entre um e quatro anos, atendidas em um hospital especializado e verificar a influência da antibioticoprofilaxia com cefazolina em palatoplastia.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Isolar e quantificar as bactérias anaeróbias intestinais dos gêneros *Bacteróides sp*, *Bifidobacterium sp* e *Lactobacillus sp* em fezes de crianças com fissura de palato, sem antibioticoterapia nos últimos 30 dias, antes da palatoplastia (momento 1).
- Isolar e quantificar as bactérias anaeróbias intestinais dos gêneros *Bacteróides sp*, *Bifidobacterium sp* e *Lactobacillus sp* em fezes de crianças com fissura de palato, após 24 horas de tratamento, em dose única na indução anestésica, com cefazolina para palatoplastia. (momento 2).
- Comparar os momentos 1 e 2.
- Verificar a influência do estado nutricional, tipo de parto, nível socioeconômico e o aleitamento materno na **MI** de crianças com fissura de palato.

3 – Casuística e Métodos

3 – CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1.– CASUÍSTICA:

Foi realizado um estudo prospectivo, longitudinal e randomizado, envolvendo 50 crianças com fissura de palato (**FP**) atendidas no Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo (HRAC-USP), com idade entre um e quatro anos, no período compreendido entre maio de 2007 e setembro de 2008.

3.2.– MÉTODOS:

3.2.1. Critérios de Inclusão:

Crianças com idade entre um e quatro anos de ambos os sexos com fissura de palato e com indicação de palatoplastia, recebendo cefazolina endovenosa, em dose única na indução anestésica, como antibioticoprofilaxia.

3.2.2. Critérios de Exclusão:

Foram excluídos os indivíduos com idade igual ou superior a cinco anos e ou com uso prévio de antimicrobianos nos últimos 30 dias.

3.2.3. Grupos de Estudo:

Os indivíduos foram distribuídos em dois grupos:

- **Grupo Controle (C):** Constituído por 11 crianças normais, de ambos os sexos e com idade entre um e quatro anos, triadas no Berçário e Maternal “Leite & Amor” – no campus da Universidade de São Paulo em Bauru – SP. Estes indivíduos não utilizavam antimicrobianos no momento da pesquisa e nos últimos 30 dias.
- **Grupo com Fissura de Palato (FP):** Constituído por 50 crianças com fissura de palato, de ambos os sexos e com idade entre um e quatro anos, triadas para palatoplastia junto ao Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo – Bauru – SP.

Foram fornecidos aos pais ou responsáveis dos lactentes dos Grupos **C** e **FP** os detalhes referentes à realização deste estudo (Apêndice 1) e foi solicitado a cada um que assinasse o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (Apêndice 2), conforme Resolução nº 196/96 sobre “Pesquisa Envolvendo Seres Humanos”, do Conselho Nacional de Saúde/MS.

3.2.4. Momentos do Estudo

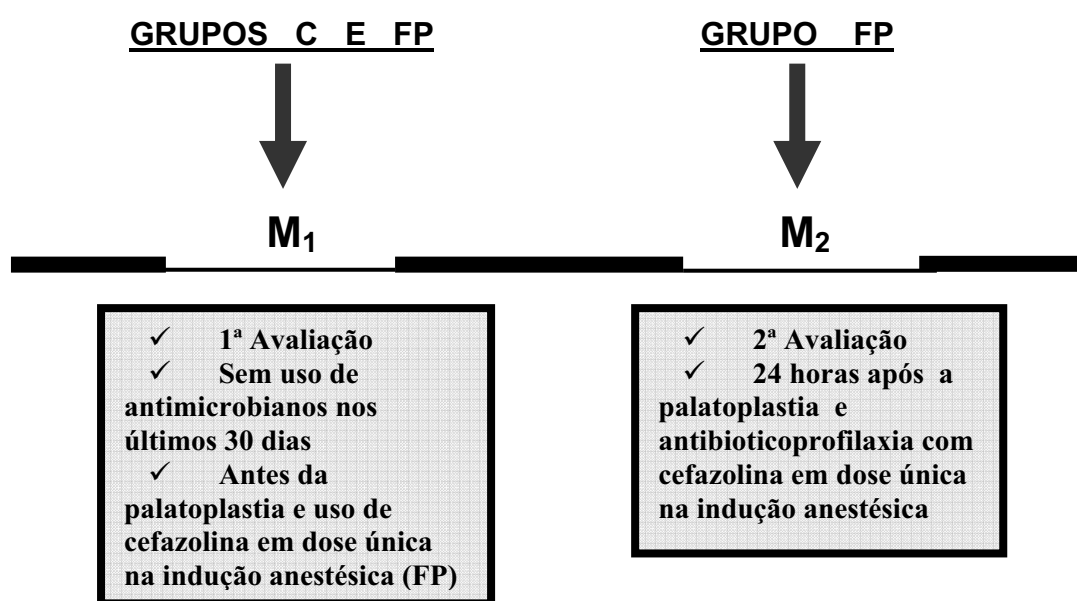
Para avaliação da microbiota intestinal dos indivíduos do grupo controle e dos pacientes foram utilizados os seguintes Momentos Experimentais:

- **Momento Um (M_1):** cultura de fezes dos pacientes com fissura de palato para identificar e quantificar os micro-organismos dos gêneros *Bacteroides sp*, *Bifidobacterium sp* e *Lactobacillus sp*,

realizada antes da palatoplastia e sem antibioticoterapia nos últimos 30 dias.

- Momento Dois (M_2): cultura de fezes dos pacientes com fissura de palato para identificar e quantificar os micro-organismos dos gêneros *Bacteroides sp*, *Bifidobacterium sp* e *Lactobacillus sp*, realizada 24 horas após o tratamento com cefazolina, em dose única na indução anestésica, em palatoplastia.
- As fezes das crianças do grupo controle (C), sem uso de antibioticoterapia nos últimos 30 dias, foram colhidas no Berçário e Maternal “Leite & Amor” e encaminhadas ao Laboratório de Análises Clínicas do HRAC-USP, para identificar e quantificar os micro-organismos dos gêneros *Bacteroides sp*, *Bifidobacterium sp* e *Lactobacillus sp*, em momento único.

MOMENTOS DO ESTUDO



3.2.5. Triagem dos pacientes com fissura de palato

Todas as crianças do grupo **FP** com indicação de palatoplastia, foram avaliadas clinicamente pelos médicos do HRAC-USP.

Como exame pré-operatório, o hemograma foi realizado em duplicata no aparelho Coulter – T890, que forneceu o número de hemácias, taxa de hemoglobina, valor do hematócrito, VCM, HCM, CHCM, o número de leucócitos totais, a porcentagem de linfócitos, valor absoluto de linfócitos e a contagem de plaquetas. No presente estudo foi utilizada a hemoglobina como um fator da avaliação nutricional, considerando a presença de discreta anemia os índices entre 8,9 g/dL a 10,8 g/dL. O equipamento foi calibrado diariamente com o kit 4C Plus (Coulter)[®]. A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada no esfregaço corado pelo método Panótico, com corantes da marca Laborclin[®]. (Apêndice 5)

3.2.6. Tratamento cirúrgico dos pacientes com fissura de palato

Todas as crianças do grupo **FP** receberam tratamento com cefazolina como profilaxia para cirurgia de palato, prescrita pelos responsáveis em assistência cirúrgica do HRAC-USP. A cefazolina foi utilizada na dose única de 25 mg/Kg de peso corporal, por via endovenosa, na indução anestésica e, portanto, antes da palatoplastia.

3.2.7. Características epidemiológicas (Apêndice 3)

Os pais ou responsáveis pelas crianças dos dois grupos foram entrevistados, pelo autor 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.

3.2.8. Avaliação socioeconômica (Anexo 2)

A classificação socioeconômica das crianças dos grupos **C** e **FP** foi realizada 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, Lehfeld e Neves Filho ⁽²⁸⁾. (Anexo 2).

3.2.9. Avaliação nutricional (Apêndice 3)

A avaliação nutricional foi obtida por meio de medidas antropométricas, considerando o percentil de peso para estatura em crianças até dois anos e IMC para os acima de dois anos ^(29, 30).

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 ⁽³¹⁾.

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 ^(32, 33).

Índice de Massa Corporal (IMC) – Foi calculado a partir da relação peso (Kg) e estatura ao quadrado (m^2) pela fórmula: $IMC = P/E^2$ ^(34, 35).

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 cinco. (Anexo 3).

3.2.10. Avaliação da Microbiota Intestinal (Apêndice 4)

Os responsáveis pelos lactentes do Grupo Controle (**C**) foram orientados sobre os procedimentos relacionados à colheita e transporte da amostra de fezes até o laboratório, para os procedimentos padronizados.

Os indivíduos do Grupo **FP** foram orientados, no momento da anamnese, que deveriam colher duas amostras de fezes, sendo que a primeira deveria ser antes do tratamento cirúrgico e a segunda 24 horas após o tratamento profilático com cefazolina para palatoplastia. Foram entregues aos pais dos lactentes dois frascos estéreis para colheita de fezes.

Após a colheita, as fezes foram encaminhadas imediatamente ao Laboratório de Patologia Clínica do HRAC-USP, onde foi avaliada a **MI** dos dois grupos de crianças.

Para a avaliação microbiológica da microbiota intestinal, foi adaptado o método de Zilberstein e colaboradores⁽³⁶⁾.

Foi, então, separado 1g das fezes com auxílio de Balança Analítica – METTLER AE260 Delta Range – (Foto 1).



Foto 1 – Balança Analítica (pesagem do material)

Essa alíquota de um grama foi colocada em tubo plástico, de tampa rosqueável identificado com o número 1 e contendo 9 mL de solução tampão fosfato pH 7,2, obtendo-se uma diluição inicial de 1:10 (Foto 2).



Foto 2 – Diluição da amostra no frasco nº 1

Esta mistura foi homogeneizada em Agitador de Tubos Mixtron – Leucotron[®] até completa dissolução (Foto 3).



Foto 3 – Homogeneização da amostra

A partir da diluição 10^{-1} , uma alíquota de 1 mL foi transferida para outro tubo de ensaio contendo a mesma solução tampão (10^{-2}), e assim consecutivas diluições foram realizadas até alcançar 10^{-9} , utilizando a mesma solução tampão em todos os tubos e agitação (Foto 4).



Foto 4 – Diluição da amostra

Foram utilizados os meios de cultura seletivos Kanamycin-Vancomycin blood Agar, *Bifidobacterium* medium e *Lactobacillus* selective medium (Probac do Brasil) para *Bacteroides* sp, *Bifidobacterium* sp e *Lactobacillus* sp, respectivamente, preparados para este estudo pela Empresa Probac do Brasil- Produtos Bacteriológicos Ltda (foto nº 5).

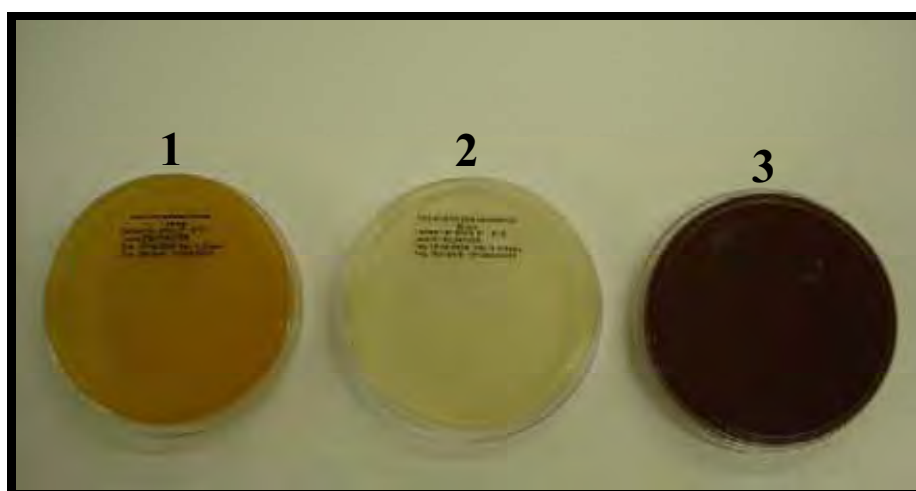


Foto 5 – Meios de cultura seletivos para *Bifidobacterium* sp (1), *Lactobacillus* sp (2) e *Bacteróides* sp (3)

Cada placa de meio seletivo foi dividida em nove partes, conforme foto nº 6.

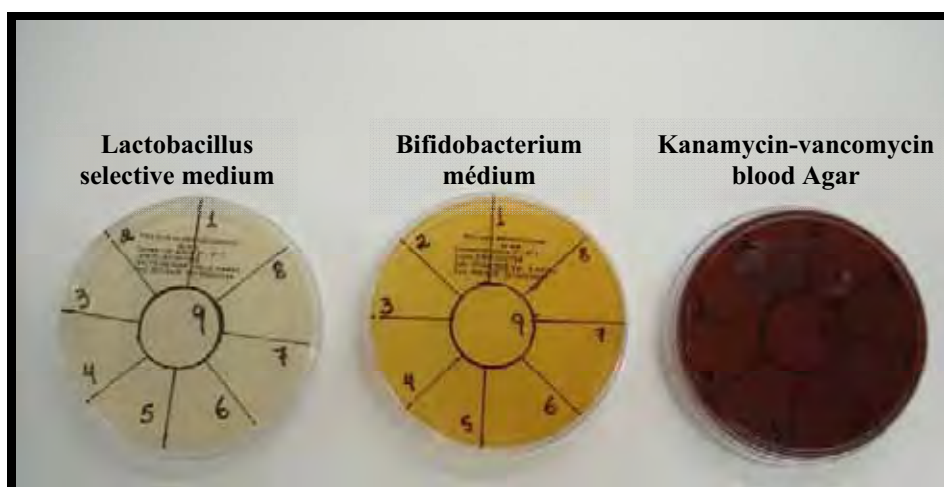


Foto 6 – Meios de cultura seletivos divididos e nove partes

Após o preparo dessas diluições, procedeu-se ao plaqueamento de 10 μ L de cada diluição nos meios seletivos (foto 7).

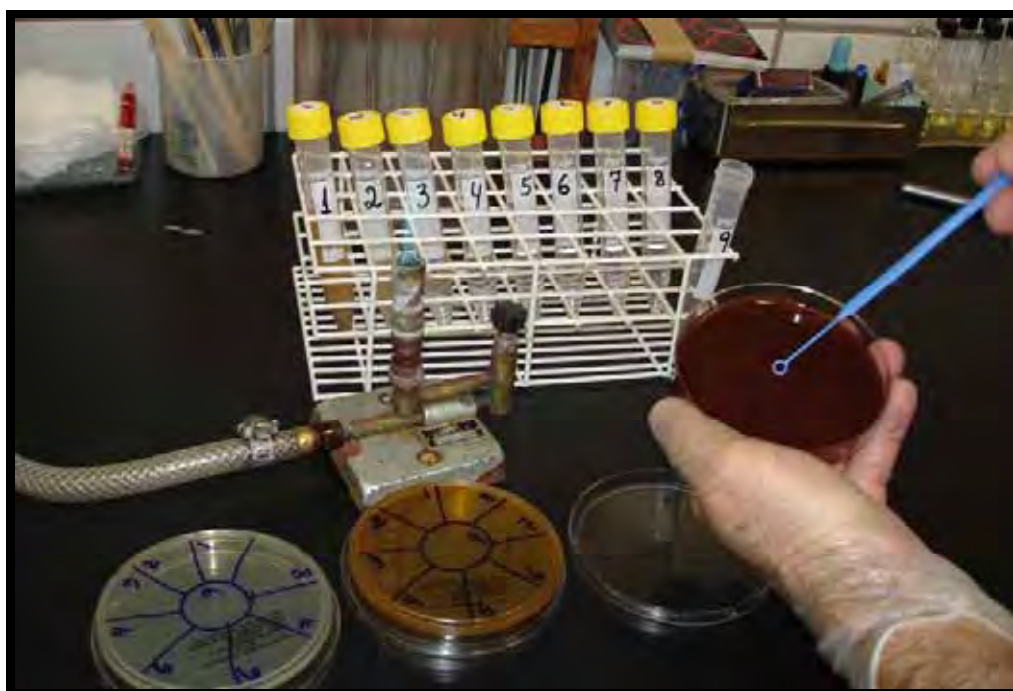


Foto 7 – Inoculação de 10 μ L da amostra diluída nos meios seletivos

Terminada a inoculação, as placas devidamente identificadas, foram acondicionadas em Jarra Anaeróbica GasPak (Permution) em ambiente de anaerobiose, e incubadas a 37°C por um período de 48 horas (foto 8). Como

gerador de atmosfera com teor reduzido de oxigênio e aumentado de gás carbônico, foi utilizado o Anaerobacter® - Probac do Brasil (foto 9).



Foto 8 – Jarra de Anaerobiose GasPak (Permutation) contendo placas inoculadas, ativadas pelo gerador de gás carbônico Anaerobac® com fita indicadora



Foto 9 – Anaerobac® antes da incubação (A) e ao término da incubação (B)

Após esse período, as placas foram analisadas quanto ao crescimento bacteriano e aspecto das colônias. As Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foram contadas em cada placa, considerando-se a presença de pelo menos uma UFC na maior diluição em cada meio seletivo (Foto 10).

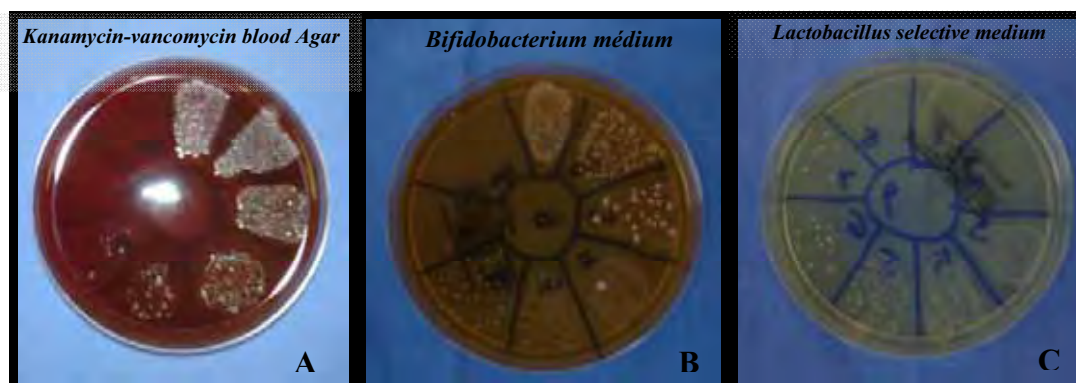


Foto 10 – Contagem das colônias: *Bacteroides* sp = 10^{-6} UFC (A), *Bifidobacterium* sp = 10^{-8} UFC (B) e *Lactobacillus* sp = 10^{-8} UFC (C)

Além disso, para cada teste foram realizadas as seguintes observações:

- Morfologia das colônias – tamanho, forma, cor e aspecto (Foto 10)
- Celular: coloração pelo Gram (Foto 11)
- Prova da catalase: membros do gênero *Lactobacillus* sp e *Bifidobacterium* sp dão reação negativa e bastonetes Gram-negativos (*Bacteroides* sp) dão reação positiva.

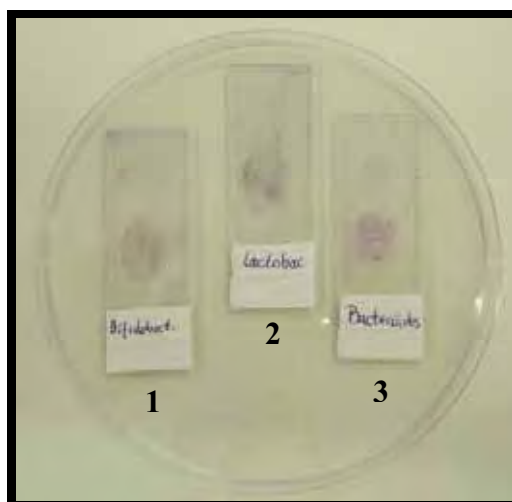


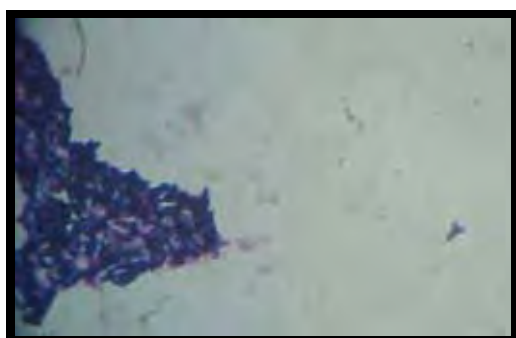
Foto 11 – Lâminas coradas pelo Gram

1 – *Bifidobacterium* sp

2 – *Lactobacillus* sp

3 – *Bacteróides* sp

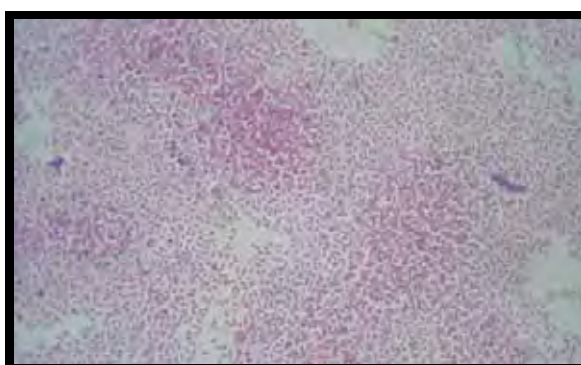
Lâminas coradas pelo Gram



Bifidobacterium sp (Gram-Positivo)



Lactobacillus sp (Gram-Positivo)



Bacteróides sp (Gram-Negativo)

Estas análises foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica do HRAC-USP pelo autor da pesquisa.

3.2.11. Método Estatístico

Para as contagens de *Bacteroides sp*, *Bifidobacterium sp* e *Lactobacillus sp* foram calculadas medianas com a transformação logarítmica dos dados⁽³⁷⁾.

Para a comparação entre momentos (**M₁** e **M₂**) no grupo **FP** foi utilizada a prova não-paramétrica de “Wilcoxon signed-rank test” com o cálculo das estatísticas teste t, Mann-Whitney e p.

Para a comparação entre os grupos **C** (**M₁**) e **FP** em momento **M₁** foram utilizados o teste t para duas amostras independentes (usando o logaritmo da contagem) com o cálculo das estatísticas t e p e/ou o método não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

Em todas as análises efetuadas, as estatísticas calculadas foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$ (p é a probabilidade de erroneamente concluir pela significância) e tendência à significância quando $0,05 < p < 0,10$.

3.2.12. Ética (anexo 1)

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 03 de agosto de 2006.

4 – Resultados

4 – RESULTADOS

4.1. Caracterização da casuística quanto a sexo e idade

A) Caracterização da casuística quanto ao sexo

A distribuição dos indivíduos de todos os grupos de acordo com o sexo está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição das 61 crianças, com e sem malformação craniofacial, dos grupos FP e C, de acordo com o sexo. Bauru, SP, 2009

Grupos Sexo	FP nº (%)	C nº (%)	Total nº (%)
Masculino	24 (48,0)	6 (54,5)	30 (49,2)
Feminino	26 (52,0)	5 (45,5)	31 (50,8)
Total	50 (100,00)	11 (100,00)	61 (100,00)

FP = Grupo de 50 crianças com fissura de palato

C = Grupo Controle

Método Estatístico = Teste do Qui quadrado com correção de Yates,

Análise estatística: $p < 0,05$

De acordo com os gêneros masculino e feminino, não houve diferença significativa entre os grupos estudados.

B) Caracterização da casuística quanto à idade

A distribuição do número de indivíduos dos grupos **FP** e **C**, de acordo com a idade, está apresentada na Figura 1.

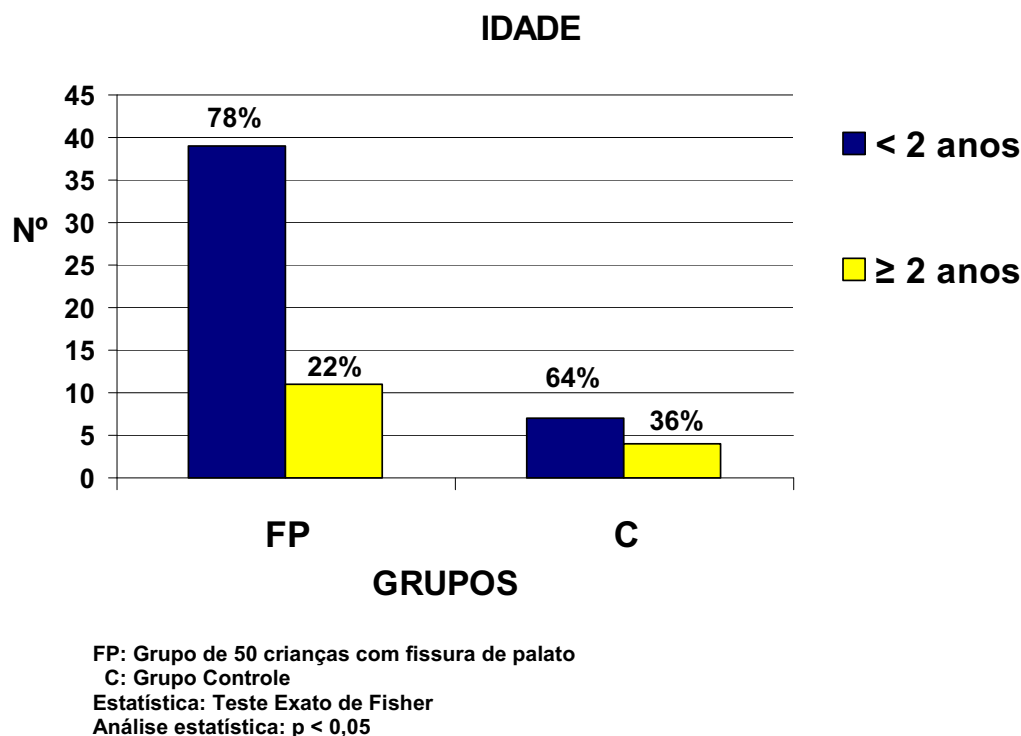


Figura 1 – Distribuição das 61 crianças dos grupos **FP** e **C**, de acordo com faixas etárias. Bauru-SP, 2009.

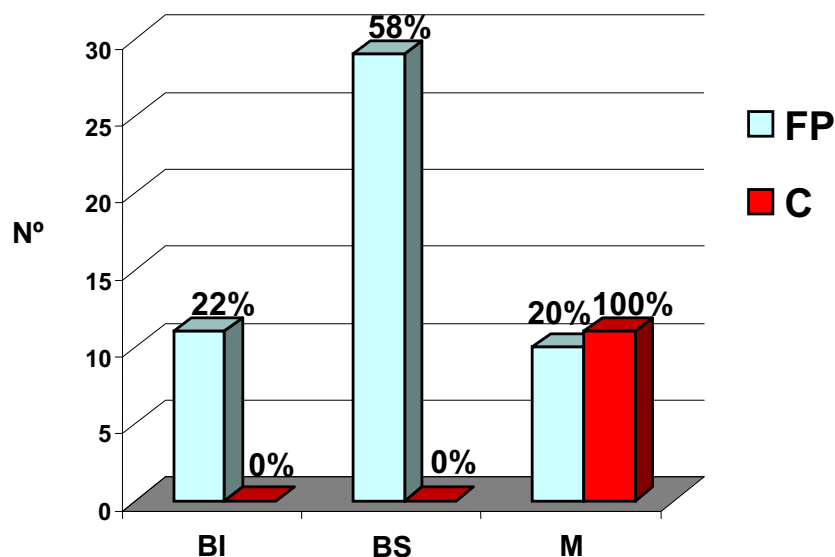
Não houve diferença significativa entre os grupos quando se considera a faixa etária maior ou menor que dois anos. Foi observado entre os indivíduos dos grupos **FP** e **C** que a maioria tinha entre um e dois anos. A mediana da idade foi de 1,4 anos, variando de um a quatro no total dos grupos.

4.2. Caracterização da casuística quanto à procedência

No presente trabalho observou-se que 100% dos indivíduos do grupo **C** e 68% do grupo **FP** eram provenientes do Estado de São Paulo. Os demais eram provenientes dos estados de Minas Gerais (8%), Distrito Federal (8%), Mato Grosso do Sul (4%), Espírito Santo (2%), Goiás (2%), Maranhão (2%), Paraná (2%), Rio de Janeiro (2%) e Roraima (2%).

4.3. Caracterização da casuística quanto ao nível socioeconômico

A distribuição dos indivíduos dos grupos **FP** e **C**, de acordo com o nível socioeconômico, está apresentada na Figura 2.



FP = Grupo de 50 crianças com fissura de palato
BI = Baixo Inferior
M = Médio

C: Grupo Controle
BS = Baixo Superior

Figura 2 – Distribuição das 61 crianças com e sem malformação craniofacial dos grupos **FP** e **C**, de acordo com o nível socioeconômico. Bauru-SP, 2009.

Foi observado que todos os indivíduos do grupo **C** pertenciam ao nível socioeconômico médio, e que no grupo **FP**, a maioria pertencia ao nível baixo superior.

4.4. Caracterização da casuística quanto à avaliação nutricional

A distribuição dos indivíduos dos grupos **FP** e **C**, de acordo com a avaliação nutricional estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Distribuição das 61 crianças com e sem malformação craniofacial do grupo FP e C de acordo com a avaliação nutricional. Bauru, SP, 2009

Grupos	FP	C	Estatística
Classificação	Nº (%)	Nº (%)	(Teste Exato de Fisher)
Desnutrição	9 (18,0)	1 (9,1)	p = 0,67
Eutrofia	35 (70,0)	4 (36,4)	p = 0,41
Sobrepeso	6 (12,0)	6 (54,5)	p = 0,005
Total	50 (100,0)	11 (100,0)	-----

FP: Grupo de 50 crianças com fissura de palato

C: Grupo Controle

p ≤ 0,05

Foi observado que a maior porcentagem de crianças no grupo **C** tinha sobrepeso (p = 0,005). No grupo **FP**, a maior porcentagem de crianças era eutrófica. Houve diferenças estatisticamente significativa.

4.5. Caracterização do grupo FP quanto a anemia e diagnóstico nutricional

Foi observado que, entre os 50 indivíduos do grupo **FP**, nove (18,0%) apresentaram anemia leve, com valores de hemoglobina entre 8,9g/dL a 10,8g/dL, sendo que, entre os nove desnutridos, três (33,3%) apresentaram discreta anemia.

4.6. Caracterização da casuística quanto ao tipo de parto

A distribuição dos indivíduos dos grupos **FP** e **C**, de acordo com o tipo de parto (normal ou cirúrgico) está apresentada na Figura 3.

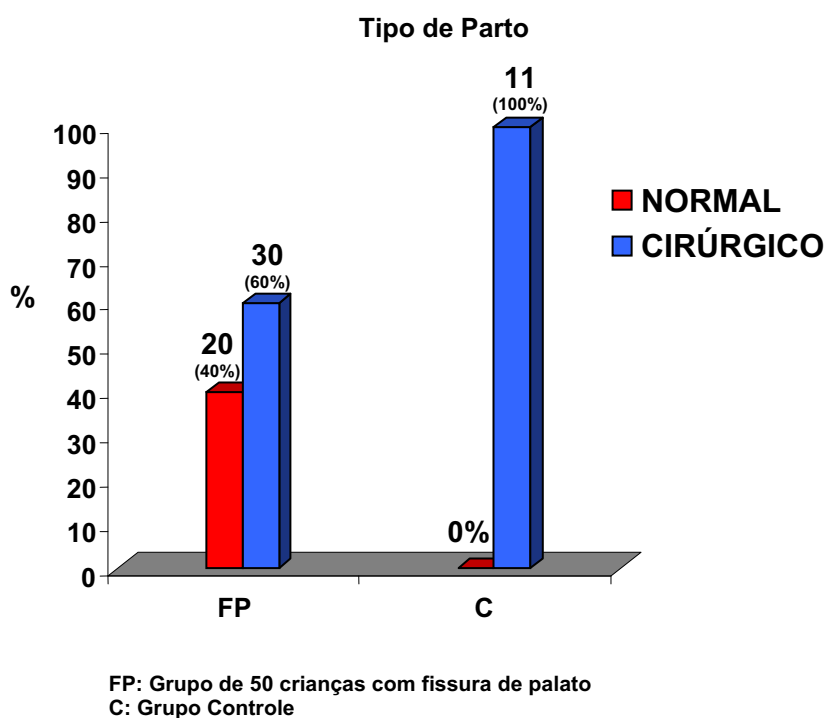


Figura 3 – Distribuição das 61 crianças com e sem malformação craniofacial dos grupos **FP** e **C**, de acordo com o tipo de parto. Bauru, SP, 2009.

Foi observado que todas as crianças no grupo **C** nasceram de parto cirúrgico. Do grupo **FP**, a maioria (60%) nasceu de parto cirúrgico.

4.7. Caracterização da casuística quanto ao aleitamento materno

A distribuição dos indivíduos dos grupos **FP** e **C**, de acordo com o tempo de aleitamento materno, está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 – Distribuição das 60 crianças com e sem malformação craniofacial dos grupos FP e C de acordo com o tempo de aleitamento materno. Bauru, SP, 2009

Tempo de Aleitamento materno \ Grupos	FP	C	Total
	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)
0 — 150 dias	43 (87,8)	3 (27,3)	46 (76,7)
150 — 365 dias	6 (12,2)	8 (72,7)	14 (23,3)
TOTAL	49 (100,0)	11 (100,0)	60 (100,0)

FP: Grupo de 50 crianças com fissura de palato
C: Grupo Controle

Foi observado que a maioria das crianças no grupo **C** (72,7%) recebeu leite materno por mais de seis meses (mediana de 365 dias). A maioria das crianças dos grupos **FP** (87,8%) recebeu leite materno por menos de cinco meses com mediana de dez dias (mínimo de zero e máximo de 150 dias).

4.8. Composição da Microbiota Intestinal dos pacientes com e sem malformação craniofacial

A) Contagem de *Lactobacillus sp*, *Bacteroides sp* e *Bifidobacterium sp*

A composição da microbiota intestinal, em termos de *Bacteroides sp*, *Lactobacillus sp* e *Bifidobacterium sp*, do grupo controle e dos pacientes com fissura de palato está apresentada na Tabela 4.

Tabela 4 – Mediana da contagem logarítmica de *Lactobacillus sp*, *Bacteroides sp* e *Bifidobacterium sp* nas fezes das 61 crianças com e sem malformação craniofacial dos grupos FP e C antes da palatoplastia e sem antibioticoterapia nos últimos 30 dias. Bauru-SP, 2009

Microbiota log/g de fezes			
	<i>Lactobacillus sp</i>	<i>Bacteroides sp</i>	<i>Bifidobacterium sp</i>
Grupos			
FP	6,0	9,0	7,0
C	5,0	2,0	7,0
Estatística	p = 0,084	p < 0,001	p = 0,495

FP = Grupo de 50 crianças com fissura de palato

C = Grupo Controle

Análise estatística: Kruskal-Wallis; $p \leq 0,05$

A frequência de *Bacteroides sp* foi maior no grupo **FP** ($p < 0,001$). Para *Lactobacillus sp*, houve maior frequência no grupo **FP** com tendência à significância ($p = 0,086$). Para *Bifidobacterium sp*, não houve diferença significativa entre os grupos.

B) Contagem de *Lactobacillus sp*, *Bacteroides sp* e *Bifidobacterium sp* nas fezes das crianças com e sem malformação e o tipo de parto.

A composição da microbiota intestinal, em termos de *Bacteroides sp*, *Lactobacillus sp* e *Bifidobacterium sp* do grupo controle e dos pacientes com fissura de palato e o tipo de parto está apresentada na Tabela 5.

Tabela 5 – Mediana da contagem logarítmica de *Lactobacillus sp*, *Bacteroides sp* e *Bifidobacterium sp* nas fezes das 61 crianças com e sem malformação craniofacial dos grupos FP e C, de acordo com o tipo de parto. Bauru-SP, 2009

Microbiota Intestinal Log10/g fezes		<i>Lactobacillus sp</i>	<i>Bacteroides sp</i>	<i>Bifidobacterium sp</i>
Grupos e Tipo de Parto				
FP	Normal	6	9	7
	Cirúrgico	6	8	7
C	Cirúrgico	5	2	7

FP = Grupo de 50 crianças com fissura de palato

C = Grupo Controle

Estatística:

Foi observado que a frequência de *Bacteroides sp* foi maior no grupo **FP** nascidos de parto normal com tendência à significância ($p < 0,08$). Para *Lactobacillus sp* e *Bifidobacterium sp* não houve diferença significativa entre os grupos.

C) Contagem de *Lactobacillus sp*, *Bacteroides sp* e *Bifidobacterium sp* nas fezes das crianças com e sem malformação e o aleitamento materno.

A composição da microbiota intestinal, em termos de *Bacteroides sp*, *Lactobacillus sp* e *Bifidobacterium sp* do grupo controle e dos pacientes com fissura de palato e o aleitamento materno está apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 – Mediana da contagem logarítmica de *Lactobacillus sp*, *Bacteroides sp* e *Bifidobacterium sp* nas fezes das 60 crianças com e sem malformação craniofacial dos grupos FP e C de acordo com o aleitamento materno. Bauru-SP, 2009

Microbiota (log/g de fezes)				Mediana dos dias de Aleitamento (Variação)	
	<i>Lactobacillus sp</i>	<i>Bacteroides sp</i>	<i>Bifidobacterium sp</i>		
Tempo de aleitamento					
6 meses (n = 46)	6,0	8,0	7,0	10	(0 - 150)
≥ 6 meses (n = 14)	6,5	6,0	7,0	180	(180 - 365)
Estatística	p = 0,122	p = 0,008	p = 0,786		

FP = Grupo de 50 crianças com fissura de palato

C = Grupo Controle

Estatística: Teste de Mann-Whitney

Em relação ao aleitamento materno, observou-se que a frequência de *Bacteroides sp* foi maior nos grupos **FP** e **C** com tempo de aleitamento materno acima de seis meses. Para *Lactobacillus sp* ($p = 0,122$) e *Bifidobacterium sp* ($p = 0,786$) não houve diferença significativa entre os grupos.

D) Contagem de *Lactobacillus sp*, *Bacteroides sp* e *Bifidobacterium sp* nas fezes das crianças do grupo FP de acordo com a anemia.

A composição da microbiota intestinal, em termos de *Bacteroides sp*, *Lactobacillus sp* e *Bifidobacterium sp* das crianças do grupo **FP** que apresentavam ou não anemia está apresentada na Tabela 7.

Tabela 7 – Mediana da contagem logarítmica de *Lactobacillus sp*, *Bacteroides sp* e *Bifidobacterium sp* nas fezes das 50 crianças do grupo FP com e sem discreta anemia. Bauru-SP, 2009

Microbiota Log ₁₀ /g fezes Grupo (n)	Lactobacillus sp	Bacteroides sp	Bifidobacterium sp
FP com discreta anemia (9)	6	8	7
FP com Hemoglobina normal (41)	6	9	7

FP = Grupo de 50 crianças com fissura de palato

Não foi observada associação significativa entre a contagem dos micro-organismos *Bacteroides sp*, *Lactobacillus sp* e *Bifidobacterium sp* nas fezes das crianças do grupo **FP** com a anemia.

E) Contagem de *Lactobacillus sp*, *Bacteroides sp* e *Bifidobacterium sp* nas fezes das crianças dos grupos FP e C de acordo com o nível socioeconômico.

A composição da microbiota intestinal, em termos de *Bacteroides sp*, *Lactobacillus sp* e *Bifidobacterium sp* das crianças dos grupos **FP** e **C**, de acordo com o nível socioeconômico, está apresentada na Tabela 8.

Tabela 8 – Mediana da contagem logarítmica de *Lactobacillus sp*, *Bacteroides sp* e *Bifidobacterium sp* nas fezes das 61 crianças dos grupos FP e C de acordo com o nível socioeconômico. Bauru-SP, 2009

Grupo Nível Social Microbiota e Log₁₀/g de fezes	FP			C	Estatística
	BI	BS	M	M	
Lactobacillus sp	6,0	6,0	6,0	5,0	p = 0,130
Bacteroides sp	8,0	9,0	8,5	2,0	p = 0,001
Bifidobacterium sp	7,0	7,0	7,5	7,0	p = 0,130

FP = Grupo de 50 crianças com fissura de palato

BS = Baixo Superior

C = Grupo Controle

Estatística = Teste não paramétrico de Mann-Whitney

BI = Baixo Inferior

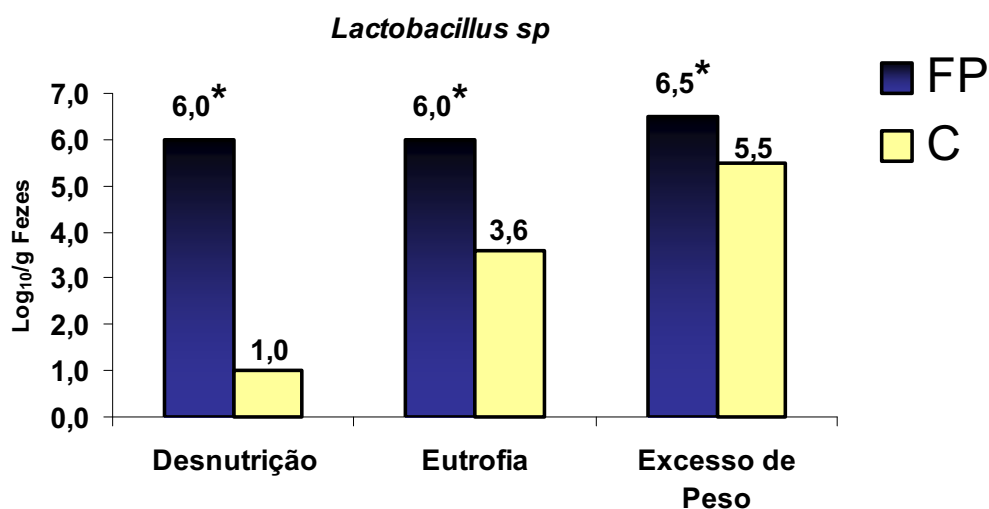
M = Médio

NS = Não significativo

Não foi observada associação significativa entre a contagem dos micro-organismos *Lactobacillus sp* e *Bifidobacterium sp* nas fezes das crianças dos grupos **FP** e **C** com o nível socioeconômico. Houve diferença significativa na contagem de *Bacteroides sp* entre os grupos **FP** e **C** de acordo com o nível socioeconômico.

F) Contagem de *Lactobacillus sp*, *Bacteroides sp* e *Bifidobacterium sp* nas fezes das crianças com e sem malformação quanto à avaliação nutricional.

A composição da microbiota intestinal, em termos de *Lactobacillus sp* das crianças dos grupos **FP** e **C** de acordo com a avaliação nutricional está apresentada na Figura 4.



Estatística = Teste não paramétrico de Mann-Whitney

* Análise estatística: $p < 0,05$

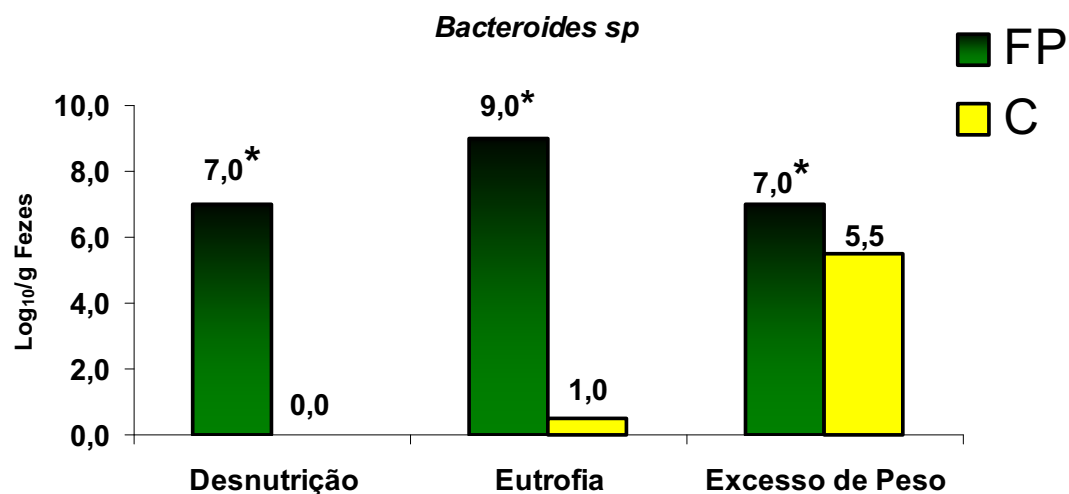
FP = Grupo de 50 crianças com fissura de palato

C = Grupo Controle

Figura 4 – Mediana da contagem logarítmica de *Lactobacillus sp* nas fezes das 61 crianças com e sem malformação craniofacial dos grupos **FP** e **C** de acordo com a avaliação nutricional. Bauru-SP, 2009.

De acordo com a avaliação nutricional, observou-se que, independentemente do diagnóstico nutricional, a concentração de *Lactobacillus sp* foi maior no grupo **FP**.

A composição da microbiota intestinal, em termos de *Bacteroides sp* das crianças dos grupos **FP** e **C** de acordo com a avaliação nutricional está apresentada na Figura 5.



Estatística = Teste não paramétrico de Mann-Whitney

* Análise Estatística: $p = 0,087$

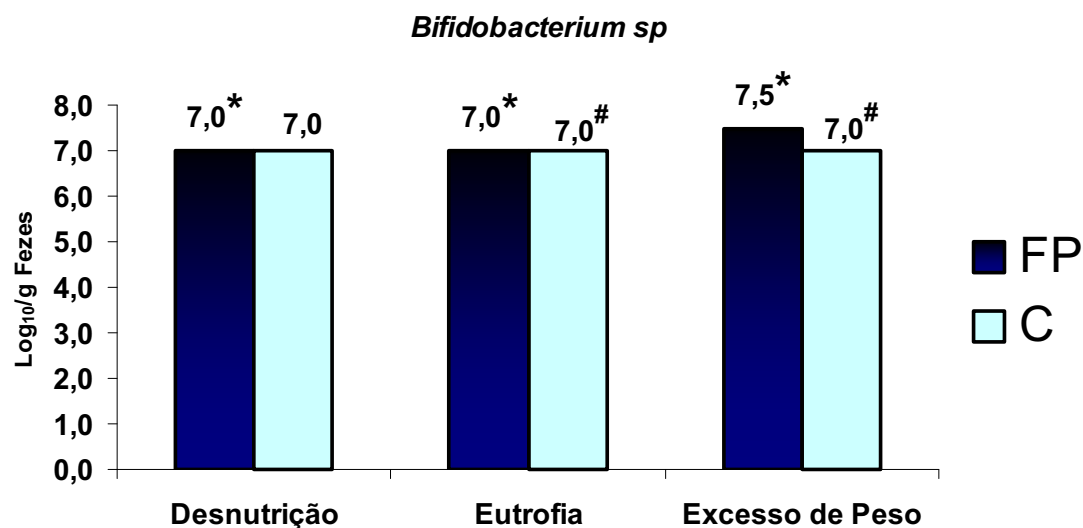
FP = Grupo de 50 crianças com fissura de palato

C = Grupo Controle

Figura 5 – Mediana da contagem logarítmica de *Bacteroides sp* nas fezes das 61 crianças com e sem malformação craniofacial dos grupos **FP** e **C** de acordo com a avaliação nutricional. Bauru-SP, 2009.

De acordo com a avaliação nutricional, observou-se que a concentração de *Bacteroides sp* foi maior no grupo **FP**.

A composição da microbiota intestinal, em termos de *Bifidobacterium sp* das crianças dos grupos **FP** e **C** de acordo com a avaliação nutricional está apresentada na Figura 6.



Estatística = Teste não paramétrico de Mann-Whitney

* Análise Estatística: $p < 0,05$

Análise Estatística: $p = 0,05$

FP = Grupo de 50 crianças com fissura de palato

C = Grupo Controle

Figura 6 – Mediana da contagem logarítmica de *Bifidobacterium sp* nas fezes das 61 crianças com e sem malformação craniofacial dos grupos **FP** e **C** de acordo com a avaliação nutricional. Bauru-SP, 2009.

De acordo com a avaliação nutricional, observou-se que a concentração de *Bifidobacterium sp* não apresentou diferença significativa entre os grupos **FP** e **C**.

A composição da microbiota intestinal, em termos de *Lactobacillus sp*, *Bacteroides sp* e *Bifidobacterium sp* das crianças dos grupos **FP** e **C** do nível socioeconômico médio e sem excesso de peso está apresentada na Tabela 9.

Tabela 9 – Mediana da contagem logarítmica de *Lactobacillus sp*, *Bacteroides sp* e *Bifidobacterium sp* nas fezes das 14 crianças dos grupos FP e C do nível socioeconômico médio e sem excesso de peso. Bauru-SP, 2009

Microbiota Intestinal (Log10/g Fezes)		<i>Lactobacillus sp</i>	<i>Bacteroides sp</i>	<i>Bifidobacterium sp</i>
Grupos				
FP	(n = 9)	6,0	8,0	7,0
C	(n = 5)	3,0	0,0	7,0
Estatística		p = 0,062	p = 0,003	p = 0,592

Estatística = Teste não paramétrico de Mann-Whitney

FP = Grupo de crianças com fissura de palato

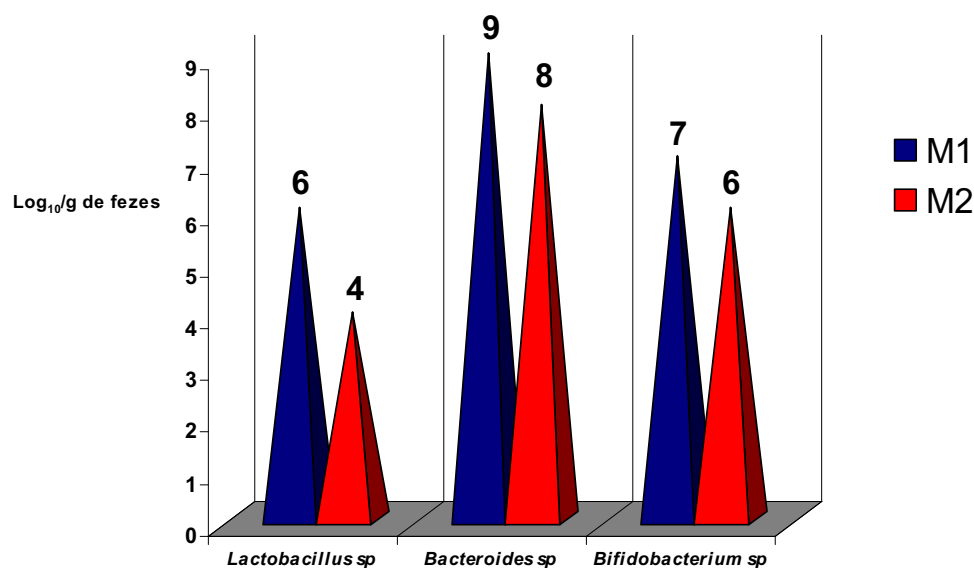
C = Grupo Controle

A frequência de *Bacteroides sp* foi maior no grupo **FP** ($p < 0,003$). Para *Lactobacillus sp*, houve maior frequência no grupo **FP** com tendência à significância ($p = 0,062$). Para *Bifidobacterium sp*, não houve diferença significativa entre os grupos.

G) Contagem de *Lactobacillus sp*, *Bacteroides sp* e *Bifidobacterium sp* nas fezes das crianças com e sem malformação nos momentos M1 e M2.

A composição da microbiota intestinal, em termos de *Bacteroides sp*, *Lactobacillus sp* e *Bifidobacterium sp* do grupo de pacientes com fissura de palato nos momentos **M1** e **M2** está apresentada na Figura 7.

Comparação da Microbiota Intestinal em M1 e M2



M1 = Momento antes do tratamento com cefazolina em palatoplastia e sem uso de antimicrobianos nos últimos 30 dias

M2 = Momento após 24 horas do tratamento com cefazolina em cirurgia de palato

Estatística: Teste t

Análise Estatística para *Lactobacillus sp*: $p = 0,001$

Análise Estatística para *Bacteroides sp*: $p = 0,006$

Análise Estatística para *Bifidobacterium sp*: $p = 0,026$

Figura 7 – Mediana da contagem logarítmica de *Lactobacillus sp*, *Bacteroides sp* e *Bifidobacterium sp* nas fezes das 18 crianças com malformação craniofacial do grupo **FP** nos momentos **M1** e **M2**. Bauru-SP, 2009.

Foi observada diminuição do número de UFCs de *Bacteroides sp*, *Lactobacillus sp* e *Bifidobacterium sp* estatisticamente significativa, em crianças do grupo **FP** tratadas com cefazolina em cirurgia de palato.

5 – Discussão

5 – DISCUSSÃO

Diversos estudos demonstram que a colonização do corpo humano por micro-organismos ocorre no início da vida. O cólon abriga diversas comunidades de micro-organismos aeróbios e anaeróbios, cujo número ultrapassa a soma de todas as células somáticas e germinativas do próprio organismo ⁽¹⁸⁾. Estes micro-organismos constituem uma comunidade ecologicamente dinâmica (microbiota) e desempenham atividades metabólicas em nível local (mucosa intestinal) e sistêmico ⁽³⁹⁻⁴³⁾. A partir do nascimento, o trato gastrointestinal é colonizado por muitos micro-organismos ingeridos através dos alimentos e pelo contato com o meio ambiente ^(1, 44-47). Os anaeróbios predominam no cólon, com cerca de 10^{11} organismos por grama de fezes. Diversos fatores podem influenciar a **MI**, entre eles a idade do indivíduo, modo do nascimento (parto normal ou cirúrgico), dieta, localização geográfica, cirurgias do trato gastrointestinal, etnia, uso de mamadeiras, hospitalização e uso de antibiótico ^(1, 38-42, 47). Outro fator a ser considerado é o genótipo de cada malformado, uma vez que o controle da colonização estaria relacionado à disponibilidade e qualidade dos sítios de adesão na mucosa intestinal, visto que a permanência das bactérias no intestino depende de ligação a um sítio de adesão, caso contrário a bactéria seria eliminada pelo peristaltismo ⁽⁴⁸⁾. Nesse sentido, a participação das malformações craniofaciais, bem como suas repercussões na alimentação infantil, e também a utilização frequente de antimicrobianos poderia contribuir para modificações da **MI**.

As fissuras labiopalatinas são exemplos de malformação craniofacial, resultante de alterações (ou defeitos) congênitas que envolvem a região do crânio e da face. Diversos estudos demonstram que sua etiologia é complexa e está ligada a múltiplos fatores, genéticos e ambientais. As fissuras labiais, com ou sem fissura de palato, são etiologicamente independentes das fissuras de palato isoladas. As primeiras têm incidência maior no gênero masculino e as fissuras de palato isoladas no gênero feminino. Além disso, estas últimas estão mais associadas às síndromes e anomalias congênitas múltiplas e sofrem ainda maior influência de fatores ambientais do que as fissuras de lábio, com ou sem fissura de palato ⁽⁴¹⁻⁵⁰⁾.

Não se encontram facilmente estudos da **MI** relacionada a malformação craniofacial. Nesse sentido, o presente estudo investigou diferenças na composição da **MI** de crianças com fissura labiopalatina, de ambos os sexos e faixa etária entre um e quatro anos, sem uso de antimicrobianos, enfocando três gêneros de bactérias anaeróbias consideradas importantes para a saúde do indivíduo: *Bifidobacterium sp*, *Lactobacillus sp* e *Bacteroides sp* ^(1, 51, 52).

A literatura científica sobre **MI** apresentou crescimento expressivo na última década ^(1-4, 6-15, 17, 18, 38-48, 50-57). Seus mecanismos de ação vêm sendo investigados experimentalmente, indicando que bactérias dos grupos *Bifidobacterium sp*, *Lactobacillus sp* e *Bacteroides sp* exercem seus efeitos competindo com patógenos, modificando o ambiente intestinal pela redução do pH, em consequência dos produtos da fermentação, interagindo e modulando resposta imunológica local e sistêmica, entre outros ⁽⁴⁵⁻⁵⁷⁾. Segundo Souza & Scarcelli ⁽⁵³⁾, qualquer modificação na microbiota indígena do hospedeiro implica em perturbações dessa população. Essa modificação, em grande parte,

deriva do uso indiscriminado de drogas antimicrobianas, especialmente antibióticos, havendo a substituição da microbiota indígena por organismos resistentes ⁽⁵³⁾. Não foram encontradas informações relacionadas à influência da antibioticoprofilaxia por cefazolina na **MI**. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a **MI** de crianças com fissura de palato, atendidas em um hospital especializado e verificar a influência da antibioticoprofilaxia com cefazolina em cirurgia de palato.

Considerando-se que no HRAC-USP a indicação das cirurgias de palato se faz após as crianças completarem 12 meses, o presente estudo foi constituído por pacientes com fissura de palato entre um e quatro anos de idade.

Em relação ao gênero, pouco se sabe a respeito de sua associação com a **MI** e a malformação craniofacial em crianças com até quatro anos. Neste estudo, não foram encontradas diferenças do tipo de fissura de palato, em relação aos gêneros masculino e feminino.

No que se refere à procedência, observou-se que a maioria dos pacientes era proveniente do estado de São Paulo, sendo o restante deles originários de vários estados brasileiros. Trabalhos realizados no HRAC-USP, como o de Vieira & Pereira ⁽⁵⁸⁾, Peres et al ⁽⁵⁹⁾ e Arena et al. ⁽⁶⁰⁾ também encontraram esse resultado, o que reforça a importante área de abrangência do HRAC-USP, que se configura como um centro de referência em sua especialidade único no país, atendendo pelo Sistema Único de Saúde (SUS) ⁽⁵⁸⁻⁶⁰⁾.

Diversas pesquisas demonstram a influência da dieta na **MI** ^(2, 3, 8-10). A alimentação do indivíduo, por sua vez, está relacionada com sua condição

socioeconômica. Neste estudo, observou-se que a maioria dos pacientes pertencia a estratificações socioeconômicas baixo inferior e baixo superior. Esses resultados concordam com estudos de Vieira & Pereira ⁽⁵⁸⁾ e dados nacionais apresentados por Borgo ⁽⁶¹⁾, em 2001, em reunião da Organização Mundial da Saúde ⁽⁶¹⁾, mostrando que 86% dos pacientes com malformação craniofacial, matriculados no HRAC-USP, eram oriundos de classe socioeconômica baixa. As crianças com malformação craniofacial do grupo **FP**, de nível socioeconômico médio e baixo, apresentaram características semelhantes da **MI**.

A **MI** de uma criança apresenta colonização inicial por bactérias da microbiota vaginal e fecal de sua mãe e/ou por bactérias do ambiente, conforme o parto, natural ou cirúrgico ^(4, 42, 62, 63). Contudo, o tipo de alimentação, aleitamento natural ou artificial é de grande importância, pois o leite materno proporciona uma **MI** de composição predominante por *Bifidobacterium sp* e *Lactobacillus sp*, enquanto que o aleitamento artificial, de 40% a 60% desses micro-organismos ^(4, 42), podendo encontrar-se, também, bactérias dos gêneros *Clostridium sp*, *Staphylococcus sp* e *Bacteroides sp* ⁽⁴²⁾. Os *Bacteroides sp* aparecem no trato gastrintestinal de neonatos em, aproximadamente, dez dias após o nascimento, entretanto as crianças amamentadas pela mãe apresentam números expressivos de *Bacteroides sp* somente após o desmame ⁽⁴³⁾. O presente estudo revelou que as fezes de crianças com fissura de palato, comparadas às do grupo controle, apresentaram concentração elevada de *Bacteroides sp*, com discreto aumento de lactobacilos e nenhuma diferença de *Bifidobacterium sp*. Em recentes estudos, diversos autores ^(62, 64-68) demonstraram haver uma percentagem

menor de bactérias da família *Bacteroidetes* e maior do grupo das *Firmicutes* associadas à obesidade tanto em seres humanos como em ratos “germfree”. Seguindo essa linha de raciocínio, observou-se que grande parte das crianças com fissura de palato se apresentava eutrófica no momento do estudo devido às orientações de condições pré-cirúrgicas recebidas pela equipe do HRAC-USP, enquanto que a maioria das crianças do grupo controle tinha sobrepeso e obesidade.

Segundo Moraes & Neto ⁽⁶⁹⁾, a **MI** é benéfica para o indivíduo quando há simbiose com o hospedeiro, isto é, equilíbrio entre as necessidades e efeitos recíprocos ⁽⁶⁹⁾. Pesquisadores como Kallioäki et al. ⁽⁶⁸⁾, Marchand & Vandenplas ⁽⁶³⁾ relatam em seus estudos que a **MI** do neonato, do lactente e do adulto se forma de modo gradual e sequencial, adquirindo características estáveis em torno dos dois anos de idade ^(70, 71). Segundo Almeida et al. ⁽⁷²⁾, a microbiota intestinal materna é a fonte natural das bactérias que colonizam o recém-nascido, e o parto cirúrgico ou normal deverá influir de modo considerável ⁽⁷²⁾, sendo necessários de seis a 12 meses para que uma microbiota semelhante à de um adulto se instale. No presente estudo, foi observado que todas as crianças sem malformação craniofacial nasceram de parto cirúrgico, enquanto que as do grupo com fissura de palato, em sua maioria, nasceram de parto cirúrgico. Quanto à associação do tipo de parto com a frequência de *Bacteroides sp*, *Lactobacillus sp* e *Bifidobacterium sp*, a presente pesquisa demonstrou não haver diferença significativa entre os três grupos, o que talvez possa ser explicado pelo fato dessa avaliação ter sido realizada em crianças com mais de 12 meses de idade.

Em seus estudos, Palmer et al. ⁽⁷³⁾ relatam que a composição da **MI** infantil é bastante variável e menos estável ao longo do tempo. No primeiro ano de vida, o trato gastrointestinal da criança progride da esterilidade para colonização extremamente densa, culminando com uma mistura de micro-organismos semelhante à de um adulto ⁽⁷³⁾. Os fatores que determinam a composição microbiana intestinal de um indivíduo ao longo do tempo ainda são pouco compreendidos. Novak et al. ⁽⁷⁴⁾ demonstraram que lactentes alimentados com leite materno têm **MI** diferente dos que são alimentados com fórmulas lácteas. Os primeiros têm predomínio de *Bifidobacterium sp* e *Lactobacilos sp*, e os alimentados com fórmulas apresentam mais coliformes e *Bacteroides sp* ^(74, 75). Estudos de Hopkins et al. ⁽⁷⁶⁾, empregando a técnica da PCR em tempo real, revelaram grande aumento da concentração de *Bacteroides sp* nas fezes de crianças entre sete e 24 meses de idade. Penders J e colaboradores ⁽⁷⁷⁾ observaram densa colonização por *Bacteroides sp*, *Lactobacillus sp* e *Bifidobactérium sp* em 1.032 crianças com idade de 30 dias e concluíram que a alimentação infantil apresentou um impacto significativo sobre a **MI**. ⁽⁷⁷⁾. Não são encontrados relatos de aleitamento materno ou fórmulas lácteas que mostrem a influência na **MI** de crianças com malformação craniofacial. Os resultados obtidos nesta análise sugerem que a falta de aleitamento materno, bem como a dificuldade de ingerir outros alimentos, ocorrida na grande maioria das crianças com fissura palatina tenham contribuído para a ocorrência da maior porcentagem de crianças desnutridas no grupo com malformação craniofacial. A associação da malformação, da dificuldade alimentar e o estado nutricional devem ter influenciado na **MI**. A presente pesquisa revelou ainda, que com a falta de aleitamento materno, a maioria das crianças com e sem fissura de palato apresentaram concentrações

maiores de *Bacteroides sp*, concordando com estudos de Stark PL & Lee A ⁽⁷¹⁾. Vale ressaltar que as concentrações de *Bifidobacterium sp* e *Lactobacillus sp* não foram diferentes entre as crianças que receberam aleitamento materno por mais ou menos de seis meses.

Outro fator importante que tem sido associado à modificação da **MI** é o uso de antimicrobianos. Diversos estudos têm demonstrado que as terapias antimicrobianas são capazes de induzir mudanças rápidas e importantes na **MI** ⁽¹⁾. A antibioticoprofilaxia por cefazolina, indicada em cirurgias de palato no HRAC-USP, tem como objetivo prevenir a infecção no sítio cirúrgico e/ou sistêmica que eventualmente possa ocorrer ⁽³⁵⁾. Chuo e colaboradores ⁽⁷⁷⁾ estudaram a microbiota nasal, da garganta e ouvido de crianças com fissura labiopalatina, com idade entre um e 26 meses, concluindo que estas apresentavam risco significativo de infecção por *Staphylococcus aureus* nas cirurgias primárias de lábio e ou palato ⁽⁷⁷⁾. Contudo, seria necessário realizar exames bacteriológicos no pré-operatório para identificar micro-organismos patogênicos, bem como estabelecer protocolos adequados para o uso profilático de antibióticos em queiloplastias e palatoplastias ⁽⁷⁷⁾. Fernandes e colaboradores ⁽⁷⁸⁾ compararam a eficácia da cefazolina endovenosa utilizada como esquema profilático, em pacientes com fraturas de mandíbula tratados com fixação aberta (placas e parafusos), avaliando a incidência de infecção local e concluíram que o índice de infecção foi comparável em ambos os grupos, não havendo diferença entre antibioticoprofilaxia com cefazolina endovenosa apenas na indução ou prolongado por 24 horas no pós-operatório ⁽⁷⁸⁾. Segundo Caniello ⁽⁷⁹⁾, septoplastias são consideradas cirurgias potencialmente contaminadas, e não têm necessidade de antibioticoprofilaxia

por cefazolina, pelo baixo risco de infecção pós-operatória. O uso de antibióticos de maneira indiscriminada pode levar a sérias complicações, como reações tóxicas, redução do estímulo à formação de anticorpos, além de representar um alto custo financeiro e poder estimular um relaxamento de uma boa técnica cirúrgica ^(71, 79-81). A incidência de reações alérgicas a antibióticos varia entre 0,7% a 10%, sendo que anafilaxia fatal ocorre em um a cada 25 mil pacientes ⁽⁷⁹⁾. Segundo Wise e colaboradores ⁽⁸²⁾, estima-se que de 20 a 50% dos antibióticos utilizados em seres humanos são desnecessários ^(77, 82).

O presente estudo observou que, 24 horas após o tratamento profilático com cefazolina em cirurgia de palato, houve redução significativa na quantidade de micro-organismos dos gêneros *Bifidobacterium sp*, *Lactobacillus sp* e *Bacteroides sp*. Estudos de Monreal & Pereira ⁽¹⁾ demonstraram que, no segundo momento, após antibioticoterapia com amoxicilina, pacientes com infecções do trato respiratório apresentavam redução das mesmas bactérias. De modo geral, no HRAC-USP, os pacientes recebem alta hospitalar 24 horas após realizem a palatoplastia, retornando somente após um ano para novas avaliações. Assim, não foi possível avaliar a **MI** em outros momentos para verificar o impacto e o tempo de recuperação desta, conforme estudos de Monreal & Pereira ⁽¹⁾ e Souza & Pereira ⁽²⁾.

A diminuição desses micro-organismos pode representar diversos prejuízos para o hospedeiro, sendo um dos principais a diminuição da resistência à colonização por micro-organismos patogênicos. Uma vez identificados, podem ser minimizados pela equipe de saúde pela utilização de medidas relativas à conduta terapêutica e alimentar, visando reduzir a influência nociva sobre o ecossistema gastrointestinal do paciente.

Por fim, observou-se no presente estudo que a **MI** das crianças com fissura palatina foi diferente das do grupo **C**, particularmente os níveis de *Bacteroides sp* estiveram elevados. Novos estudos, acompanhando a concentração destes micro-organismos, devem ser realizados a fim de se conhecer as possíveis repercussões clínicas, imunológicas e nutricionais durante o desenvolvimento dos indivíduos com fissura palatina.

Além disso, há necessidade de investigações posteriores que informem quais fatores relacionados ao tratamento cirúrgico estariam implicados na alteração da microbiota intestinal, como, por exemplo, medicações de uso rotineiro em momentos pré, trans e pós-cirúrgicos, e o estresse cirúrgico. O que o presente estudo demonstrou, com pioneirismo, é a influência da malformação craniofacial na formação da **MI**.

Diante da importância da **MI** na saúde humana, o presente estudo verificou que o tratamento de cefazolina em cirurgia de palato poderia influenciar na concentração de bactérias anaeróbias do cólon infantil. Em face de tais evidências, sugere-se que cirurgiões responsáveis pelo tratamento corretivo de fissuras labiopalatinas analisem a necessidade de administração deste antibiótico, especialmente considerando sua repercussão na **MI**.

6 – Considerações finais

6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando a importância da microbiota intestinal para a saúde do hospedeiro, o presente estudo identificou as influências possíveis que as malformações craniofaciais podem desencadear sobre a microbiota intestinal, bem como impacto que esta sofre após o tratamento com cefazolina em cirurgia de palato.

Entre os parâmetros avaliados neste estudo, a faixa etária, as condições socioeconômicas e o tipo de parto das crianças, sugerem que os mesmos não foram capazes de promover modificações diretas sobre a microbiota intestinal.

No entanto, a malformação craniofacial influenciou a composição da microbiota intestinal. Foi observado aumento na quantidade de UFCs/g de fezes dos microrganismos *Bacteroides* sp e *Lactobacillus* sp nas crianças com fissura de palato. A malformação dificulta a ingestão de nutrientes e, muitas vezes, inviabiliza o aleitamento materno, comprometendo a evolução clínico-nutricional e predispondo a criança à infecção. Vale ressaltar que a comunicação entre as cavidades oral e nasal prejudica ainda mais a alimentação do indivíduo, com perdas de alimentos pelo nariz ou aspiração dos mesmos, causando infecção respiratória e otites de repetição, sendo indispensável o uso de antibióticos, que consequentemente contribuiria para a modificação da **MI**.

A **MI** das crianças com fissura palatina apresentou diferença quando comparada ao grupo controle. Esta diferença se acentuou quando submetidas ao estresse cirúrgico e uso da cefazolina. A eficácia e a necessidade da

antibioticoprofilaxia indicada nas cirurgias para correção desta malformação são discutíveis, considerada desnecessária por muitos autores, e deve ser revista com novos estudos a fim de comprovar o efeito deletério sobre a **MI**.

Assim, é importante acompanhar a influência da antibioticoterapia sobre a **MI**. Na prescrição de antimicrobianos deve ser considerado o seu espectro de ação, sua capacidade de produzir distúrbios sobre a **MI**, a possibilidade de emergência de cepas resistentes, reações tóxicas e redução do estímulo à formação de anticorpos.

Novos estudos devem ser realizados no sentido de se esclarecer melhor as complexas interações entre a microbiota intestinal e seu hospedeiro, particularmente em indivíduos com malformação craniofacial. Diferentes métodos de análises, como biologia molecular associada à citometria de fluxo e um grupo de estudo maior poderiam confirmar estas diferenças. A análise genotípica deve ser considerada, tendo em vista que o controle da colonização estaria relacionado à disponibilidade e qualidade dos sítios de adesão na mucosa intestinal.

7 – Referências

7 – REFERÊNCIAS

1. Monreal MTFD, Pereira PCM, Lopes CAM. Intestinal microbiota of patients with bacterial infection of the respiratory tract treated with amoxicillin. *Braz J Infect Dis.* 2005; 9(4): 292-300.
2. Souza ME, Pereira PCM. Microbiota intestinal de indivíduos que sofreram acidente ocupacional com materiais biológicos e que realizaram profilaxia anti-retroviral. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2007; 40(6):653-656.
3. Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: What we know and need to know from gnotobiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 1998; 1157:70.
4. Bullen CL, Tearle PV, Willis AT. Bifidobacteria in the intestinal tract of infants: an in vivo study. *J Med Microbiol* 1976; 9:325-33.
5. Ryan JL, Projan SJ. Doenças Bacterianas. In: Parslow TG, Stites DP et al. *Imunologia Médica. Décima edição.* Guanabara Koogan; 2001. p.528-536.
6. Moreau MC, Coste M. Immune responses to dietary protein antigens. *World Rev Nutr Dietetics.* 1993; 74: 22-57
7. Van der Waaij D. Colonization resistance of the digestive tract: Clinical consequences and implications. *J Antimicrob Chemother.* 1982; 10:263-70.
8. Gibson GR, Wang X. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J Appl Bacteriol.* 1994; 77:412-20.

9. Hentges DJ. Fecal flora of volunteers on controlled diets. *Am J Clin Nutr.* 1978; 31:S123-4.
10. Marteau P, Pochart P, Flourie B, Pellier P, Santos L, Desjeux J-S, Rambaud J-C. Effect of chronic ingestion of fermented dairy product containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on metabolic activities of the colonic flora in humans. *Am J Clin Nutr.* 1990; 52:685-88.
11. Haenel H. Human normal and abnormal gastrointestinal flora. *Am J Clin Nutr.* 1970; 23:1433-39.
12. Salminen S, Isolauri E, Onnela T. Gut flora in normal and disordered states. *Chemotherapy.* 1995; 41(Suppl 1):5-15.
13. Mata LJ, Jejicanos ML, Jiménez F. Studies on the indigenous gastrointestinal flora of Guatemalan children. *Am J Clin Nutr.* 1972; 25:1380-90.
14. Moore WEC, Holdeman LV. Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl microbial.* 1974; 27:961-79.
15. Finegold SM. Interaction of antimicrobial therapy and intestinal microflora. *Am J Clin Nutr.* 1970; 23:1466-71.
16. Kurpad AV, Shetty PS. Effects of antimicrobial therapy of fecal bulking. *Gut.* 1986; 27:55-8.
17. Nordenvall B, Hallberg D, Larsson I, Nord CE. The effect of clindamycin on the intestinal flora in patients with enteric hyperoxaluria. *Scand J Gastroenterol.* 1983; 18:177-81.

18. Bhat P, Shantakumari S, Rajan D, Mathan VI, Kapadia CR, Swarnabai C, Baker SJ. Bacterial flora of the gastrointestinal tract in southern Indian control subjects and patients with tropical sprue. *Gastroenterology*. 1971; 62:11-21.
19. Silva AMP. Efeito da levofloxacina na microbiota intestinal de pacientes com pneumonia adquirida na comunidade[dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2008.
20. Lode H, vom der Höh N, Ziege S, Borner K, Nord CE. Ecological effects of linezolid versus amoxicillin/clavulanic acid on the normal intestinal microflora. *Scand J Infect Dis*. 2001; 33:899-903.
21. Solomkin J. In: Baker RJ, Fischer J. *Mastery of surgery*. Fourth edition. Philadelphia, Lippincott: Williams & Wilkins. 2001; 146-54.
22. Fairbanks DN. In: Bayley BJ, Calhoun KH et al. *Head and Neck Otolaryngology*. Third edition. Philadelphia, Lippincott: Williams & Wilkins. 2001; 47-54.
23. DeDio RM, Tom LW, McGowan KL, Wetmore RF, Handler SD, Potsic WP. Microbiology of the tonsils and adenoids in a pediatric population. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1988; 114: 763-5.
24. Lofiego JL. Embriologia. In: *Fissura Lábio-Palatina: avaliação, diagnóstico e tratamento fonoaudiológico*. Rio de Janeiro: Revinter. 1992(a). p.20-44.
25. Weckwerth PH, Marchesano LH, Lamônica Neto D, Aguiar HF. Bacteriologia da otite média crônica supurativa em crianças portadores de fissura palatal. *Rev. Bras. Med*. 1993; 50:602-10,.

-
26. Hagberg C, Larson O, Milerad Josef. Incidence of cleft lip and palate and risks of additional malformations. *Cleft Palate-Craniofacial Journal*. 1998; 35: 40-5.
 27. Trabulsi LR, Mimica I, Mimica Lycia MJ. Características dos principais Grupos de antibacterianos: espectro de ação e indicações. In: Trabulsi LR, Alterthum F et al. *Microbiologia*. São Paulo: Atheneu; 1999: 99-110.
 28. Graciano MIG, Lehfeld NAS, Neves Filho A. Critérios de avaliação para classificação sócio-econômica: elementos de atualização. *Serv Social Realid*. 1999; 8:109-28.
 29. World Health Organization. Report of a WHO Expert Committee Physical status the use and interpretation of anthropometry. Geneva, 1995.
 30. Richard ME. Weight comparisons of infants with complete cleft lip and palate. *Pediat. Nursing*. Pitman. 1994; 20: 191-6.
 31. Augusto ALP. Avaliação nutricional. In: AUGUSTO ALP, ALVES, DC, MANDARINO, IC, GERUDE, M. *Terapia nutricional*. São Paulo: Atheneu. 1993. 28-37.
 32. Weitzberg DL., Ferreini, M.T. Avaliação nutricional. In: WAITZBERG, D.L. *Nutrição enteral e parenteral na prática clínica*. Rio de Janeiro: Atheneu; 1995. p.127-52.
 33. 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. 315p.
 34. Gilson RS. *Antropometric assessment: a laboratory manual*. Oxford: Oxford University Press. 1993. p.79-100

-
35. Waitzbert DL, Ferrini MT. Exame físico e Antropometria. In: Waitzberg DL. Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica. 3 ed. São Paulo: Atheneu; 2000: p. 255-78.
 36. Zilberstein B, Quintanilha AG, Santos MAA, Pajecki D, Moura EG, Alves PRA et al. Digestive tract microbiota in healthy volunteers. Clinics. 2007; 62(1): 47-54.
 37. Curi PR. Metodologia e análise da pesquisa em ciências biológicas. 2nd ed. Botucatu: Tipomic; 1998.
 38. Savage DC. Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract. Savage, Annu. Rev. Microbiol. 1977; 31: 107-33.
 39. Kurokawa K, Itoh T, Kuwahara T, Oshima K, Toh H et al. Comparative Metagenomics Revealed Commonly Enriched Gene Sets in Human Gut Microbiomes. DNA Research. 2007; 14, 169–181.
 40. Mueller S, Saunier K, Hanisch C, Norin E, Alm L. et al. Differences in Fecal Microbiota in Different European Study Populations in Relation to Age, Gender, and Country: a Cross-Sectional Study. Appl. Environ. Microbiol. 2006; 72, 1027–1033.
 41. Mai V, Draganov PV. Recent advances and remaining gaps in our knowledge of associations between gut microbiota and human health. World J Gastroenterol. 2009; 15, 81-85.
 42. Hattori M, Taylor TD. The Human Intestinal Microbiome: A New Frontier of Human Biology. DNA RESEARCH. 2009; 16: 1–12,.
 43. Mitsou EK, Kirtzalidou E, Oikonomou I, Liosis G, Kyriacou A. Fecal microflora of greek health neonates. Anaerobe. 2008; 14: 94-101,.

-
44. Simon GL, Gorbach SL. Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology*. 1984. 86:174-93.
 45. Norin KE, Gustafsson BE, Lindblad BS, Midtvedt T. The establishment of some microflora associated biochemical characteristics in feces from children during the first years of life. *Acta Paediatr Scand*. 1985; 74:207-12.
 46. Sullivan A, Edlund C, Nord CE. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *Lancet Infect Dis*. 2001; 1:101-14.
 47. Simon GL, Gorbach SL. The human intestinal microflora. *Dig Dis Sci*. 1986; 31:147S-62S.
 48. Brandt KG, Sampaio MMSC, Miuki CJ. Importância da microflora intestinal. *Pediatria (São Paulo)*; 2006; 28(2):117-27.
 49. Souza Freitas, J.A. de. Centro de Pesquisa e Reabilitação de Lesões Lábio Palatais. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. 1974.
 50. Moore, K L, - Aparelho branquial. In: *Embriologia Clínica*, segunda edição. Rio de Janeiro, Interamericana. 1977; Cap. 10, p. 154-85.
 51. Nielsen OH, Jorgensen S, Pedersen K, Justesen T. Microbiological evaluation of jejunal aspirates and faecal samples after oral administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria. *J Appl Bacteriol*. 1994; 76:469-74.
 52. Forbes BA, Sahm DF, Wissfeld AS. Microbial taxonomy. In: Bailey WR, Scott EG *Diagnostic Microbiology*. St Louis: Mosby; 1998. p. 87-93.
 53. Souza CAI, Scarcelli E. Agregação por microrganismos da microbiota endógena. *Arq. Inst. Biol*. 2000; 67(2):275-81.

-
54. O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports*. 2006; 7: 688–93.
55. Morais MB, Jacob CMA. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. *J Pediatr*. 2006; 82(5):189-97.
56. Wexler HM. Bacteróides: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. *Clin Microbiol Rev*. 2007; p 593-621.
57. Camp JG, Kanther M, Semova I, Rqwls JF. Patterns and Scales in Gastrointestinal Microbial Ecology. *Gastroenterology*. 2009; 136:1989-2002.
58. Vieira NA, Pereira PCM. Gastroenteritis by rotavirus in a hospital specialized in children with craniofacial malformation. In: 10th INTERNATIONAL CONGRESS on Cleft Palate and Related Craniofacial Anomalies, 2005, Durban. *CLEFT 2005*. 2005; 1:p 222.
59. Peres SPBA, Arena EP, Marques IL, Moreira FL. 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.
60. Arena EP, Peres SPBA. 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*. 2005. p. 222.

61. Borgo HC. 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: 42-3.
62. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardins ER, and Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006. 444:1027-131.
63. Marchand J, Vandenplas Y. Administração de Microrganismos em benefício do hospedeiro: Mitos e fatos. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2000; 12:1077-88.
64. Gill SR, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, and Nelson DE. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*. 2006; 312:1355-9.
65. Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, and Gordon JI. Obesity Alters gut microbial ecology. *Nproc. Natl. Acad Sci. USA* 2005; 102:11070-5.
66. Ley RE, Turnbaugh P, Klein S, and Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associates with obesity. *Nature*. 2006; 444: 1022-3.
67. DiBaise JK, Zhang H, Crowell MD, Krajmalnik-Brown R, Anton Decker G and Rittmann BE. Gut Microbiota and Its Possible Relationship With Obesity. *Mayo Clin Proc*. 2008; 83(4):460-469
68. Kalliomäki M, Collado MC, Salminen S and Isolauri E. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *Am J Clin Nutr*. 2008; 87:534-8.

-
69. Moraes MB, Neto UF. Enteropatia Ambiental. Estudos Avançados. 2003; 17(43): 137-48.
70. Hattori M, Taylor TD. The Human Intestinal Microbiome: A New Frontier of Human Biology. 2009. 16: 1-12.
71. Stark PL, Lee A. The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life. Med Microbiol. 1982; 15(2):189-203.
72. Almeida LB, Marinho CB, Soua CS, Cheib VBP. Disbiose intestinal. Ver Brás Nutri Clin. 2009; 24(1):58-65.
73. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA and Brown PO. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. Plos Biology. 2007; 5(7):1556-73.
74. Novak FR, Almeida JAG, Vieira GO and Borba LM. Colostro humano: fonte natural de probióticos? J Pediatr. 2001; 77 (4): 265-70.
75. Rolf RD. The rolo of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. J Nutr. 2000; 130 Suppl. 2S: 396S-402S.
76. Hopkins MJ, Macfarlane GT, Furie E, Fite A and Macfarlane S. Characterisation of intestinal bacteria in infant stools using real-time PCR and northern hybridization analyses. FEMS Microbiol Ecol. 2005; 54: 77-85.
77. Chuo CB, Timmons MJ. The Bacteriology of Children Before Primary Cleft Lip and Palate Surgery. Cleft Palate-Craniofacial Journal. 2005; 42(3): 272-6.

-
78. Fernandes HADR, Oliveira e Cruz GAZOR e Freitas RS. Antibioticoprofilaxia em fratura de mandíbula. 2009; 12(1):21-4.
 79. Caniello M, Passerotti GH, Goto EY, Voegels RL e Butugan O. Uso de antibióticos em septoplastias: é necessário? Rev. Bras. Otorrinolaringol. [online]. 2005; 71(6):734-738.
 80. Weimert T,, Yoder MG. Antibiotics and nasal surgery. Laryngoscope 1980; 90(4):667-72.
 81. Yoder MG, Weimert TA. Antibiotics and topical surgical preparation solution in septal surgery. Otolaryngol Head Neck Surg. 1992; 106:243.
 82. Wise R, Hart T, Cars O, Streulens M, Helmuth R, Huovinen P and Sprenger M. Antimicrobial resistance. Br Med J. 1998; 317-609-610.

8 – ANEXOS**Anexo 1**

Ofício nº 206/2006-SVAPEPE-CEP

Bauru, 03 de agosto de 2006.

Prezado(a) Senhor(a)

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado "*Microbiota intestinal de crianças com anomalias craniofaciais tratadas com cefazolina em cirurgia de palato*", de autoria de NARCISO ALMEIDA VIEIRA desenvolvido sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação.

Na reunião de **26 de julho de 2006** o parecer do relator, **aprovando o projeto**, foi aceito pelo Comitê, considerando que não existem infrações éticas pendentes para início da pesquisa. Solicitamos a V.Sª a gentileza de comunicar o parecer ao pesquisador e anexar o presente ofício ao projeto, pois o mesmo será necessário para futura publicação do trabalho.

O pesquisador fica responsável pela entrega no Serviço de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão dos relatórios semestrais, bem como comunicar ao CEP todas as alterações que possam ocorrer no projeto.

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

Atenciosamente

A handwritten signature in black ink, reading "Alceu S. Trindade Jr.", is written over the typed name.

PROF. DR. ALCEU SÉRGIO TRINDADE JUNIOR

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do HRAC-USP

Ilmo(a) Sr(a)

Dr. Paulo Câmara Marques Pereira

Laboratório de Análise Clínica – HRAC/USP

Rua Sílvio Marchioni, 3-20 Bauru - SP Brasil
Caixa Postal 1501 CEP 17 012-900
Tel. 55 14 3235 8421 Fax: 55 14 3234 7818
E-mail: anag@usp.br

Anexo 2

FICHA DO SERVIÇO SOCIAL

RG nº

I - Investigação Diagnóstica

1 - Classificação Sócio-Económica: _____ 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 económica 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	()	01 - 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	()	1 - Própria
6	7	8	9	10	()	2 - Financiada
5	6	7	8	9	()	3 - Alugada
4	5	6	7	8	()	4 - Cedida
2	3	4	5	6	()	5 - Outras. Espec.
0	0	0	1	2	()	_____

Obs.: Número de cômodos _____ cômodos

Continua

Continuação

7 - Tipo: ☐ 1. tijolos ☐ 2. madeira ☐ 3. tijolos e madeira ☐ 4. outros Espec.: ☐

8 - Zona (localização): ☐ 1. rural ☐ 2. urbana ☐ 3. suburbana ☐

9 - Infra-estrutura: ☐ 1. água encanada ☐ 2. mina ☐ 1. esgoto ☐ 2. fossa ☐ 1. luz elétrica ☐ 2. lâmpada ☐

10 - Nível Ocupacional: ☐ 1. ativo ☐ 2. aposentado ☐ 3. pensionista ☐ 4. desempregado ☐

Ocupação - Maior nível ocupacional / responsável ☐ ☐

Pontos		1. Empresários	Especificação / Vínculo / Relações
13	()	2. Trabalhadores da alta administração	
11	()	3. Profissionais liberais autônomos	
10	()	4. Trabalhadores assalariados administrativos, técnicos e científicos	
9	()	5. Trabalhadores assalariados	
7	()	6. Trabalhadores por conta própria/autônomos:	
7	()	Com empregado	
6	()	7. Sem empregado	
5	()	8. Pequenos produtores rurais: com empregado	
3	()	9. Sem empregado	
3	()	10. Empregados domésticos: urbanos	
2	()	11. Rural	
1	()	12. Trabalhadores rurais assalariados, volantes e assemelhados	

11- Setor: ☐ 1. primário (recursos da natureza) ☐ 2. secundário (atividades industriais) ☐ 3. terciário (comércio e prestação de serviços)

Observação: ☐ 1. público ☐ 2. privado ☐

II - Recursos para Reabilitação

Cidade / Estado (trajeto) _____ Hs ou Km: _____

Recursos para retornos (próprio, C.A., T.F.D., Coordenadores, Associações) _____

Prazo para comunicação de retorno: _____

Periodicidade dos retornos: _____

Recursos para tratamento local (odonto, fono, etc): _____

Expectativas: _____

Problemas de saúde ou deficiências: _____

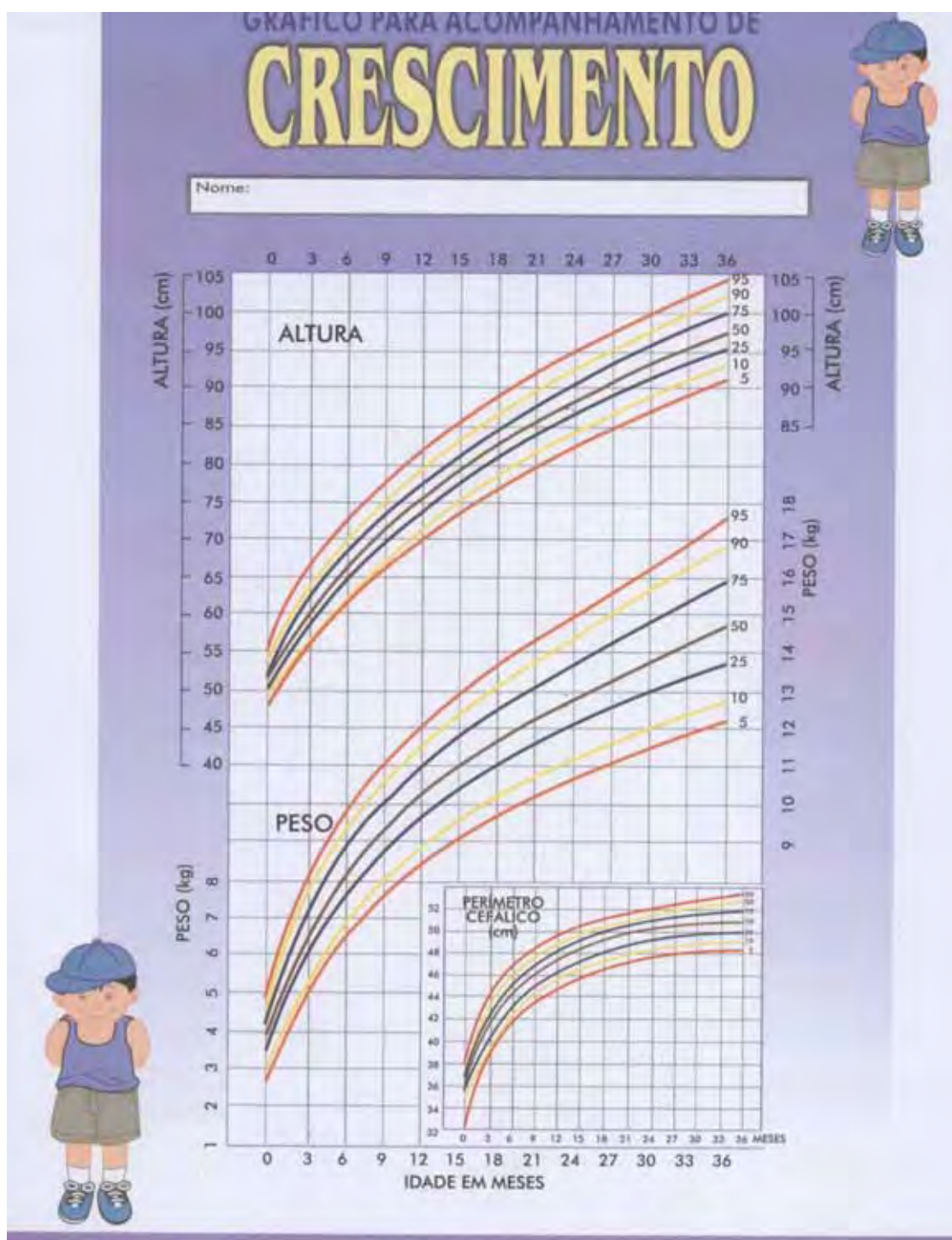
III - Parecer / Intervenção do Serviço Social:

Data: ____ / ____ / ____ Assistente Social: _____

☐ Código CPD

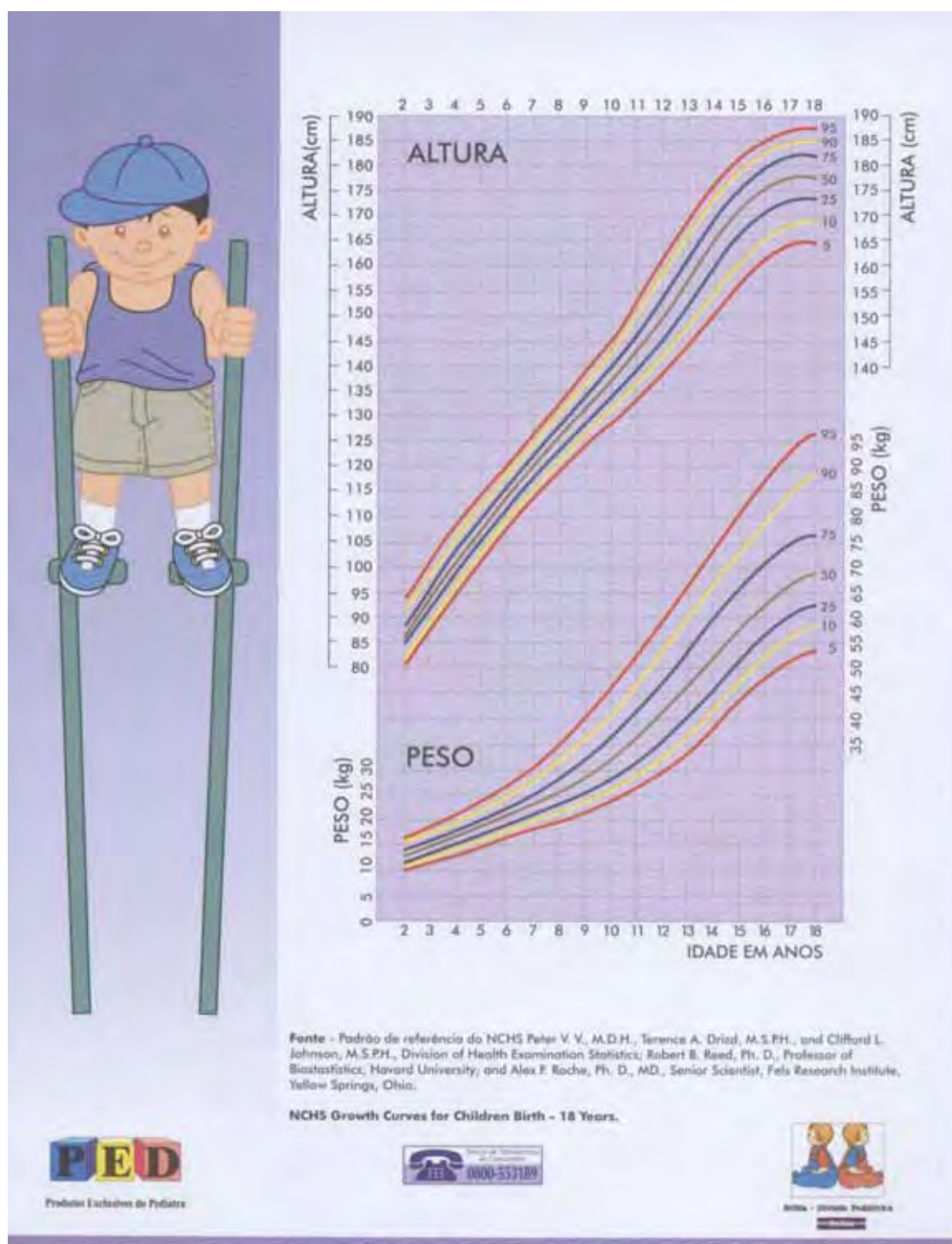
09/97

Anexo 3



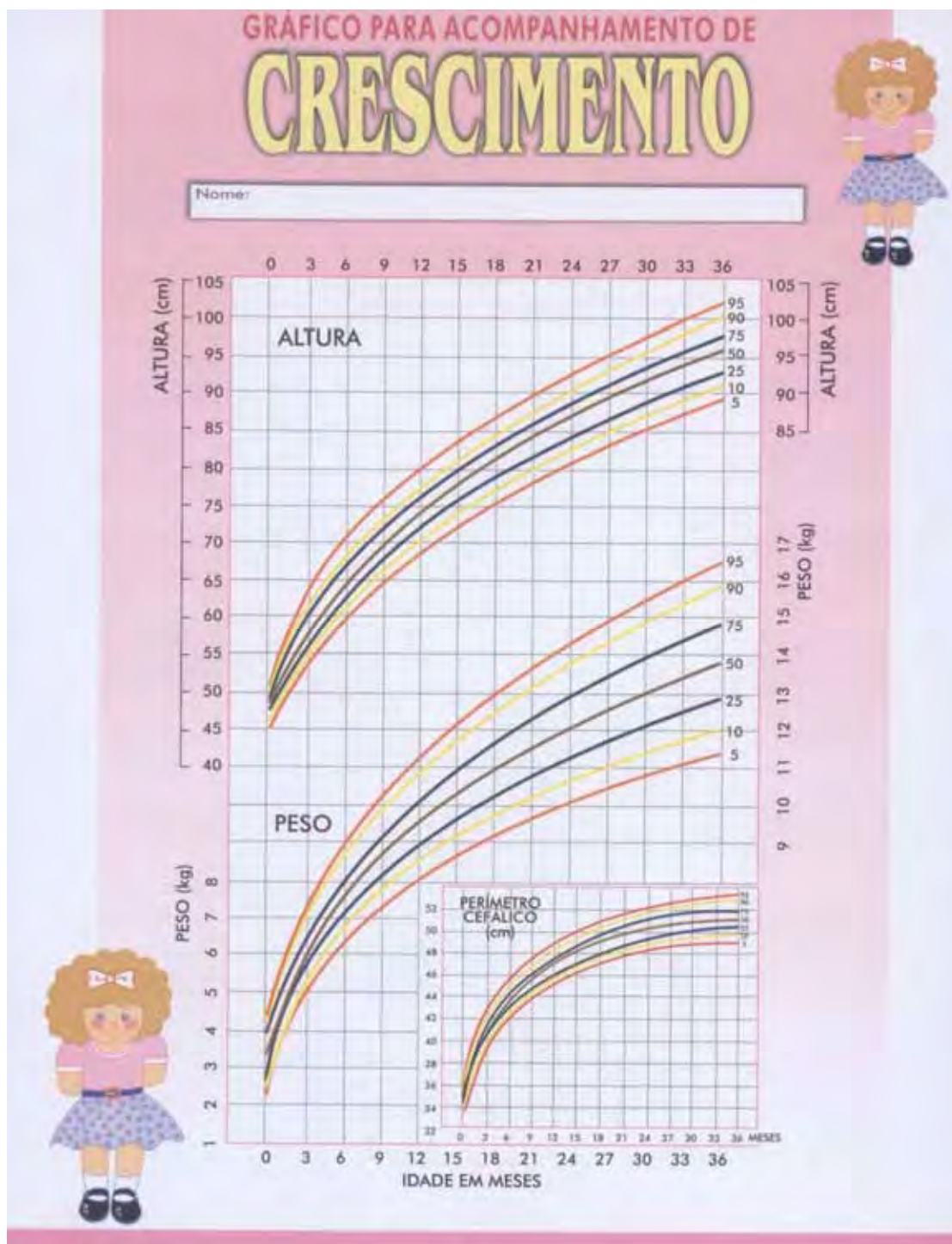
Continua

Continuação



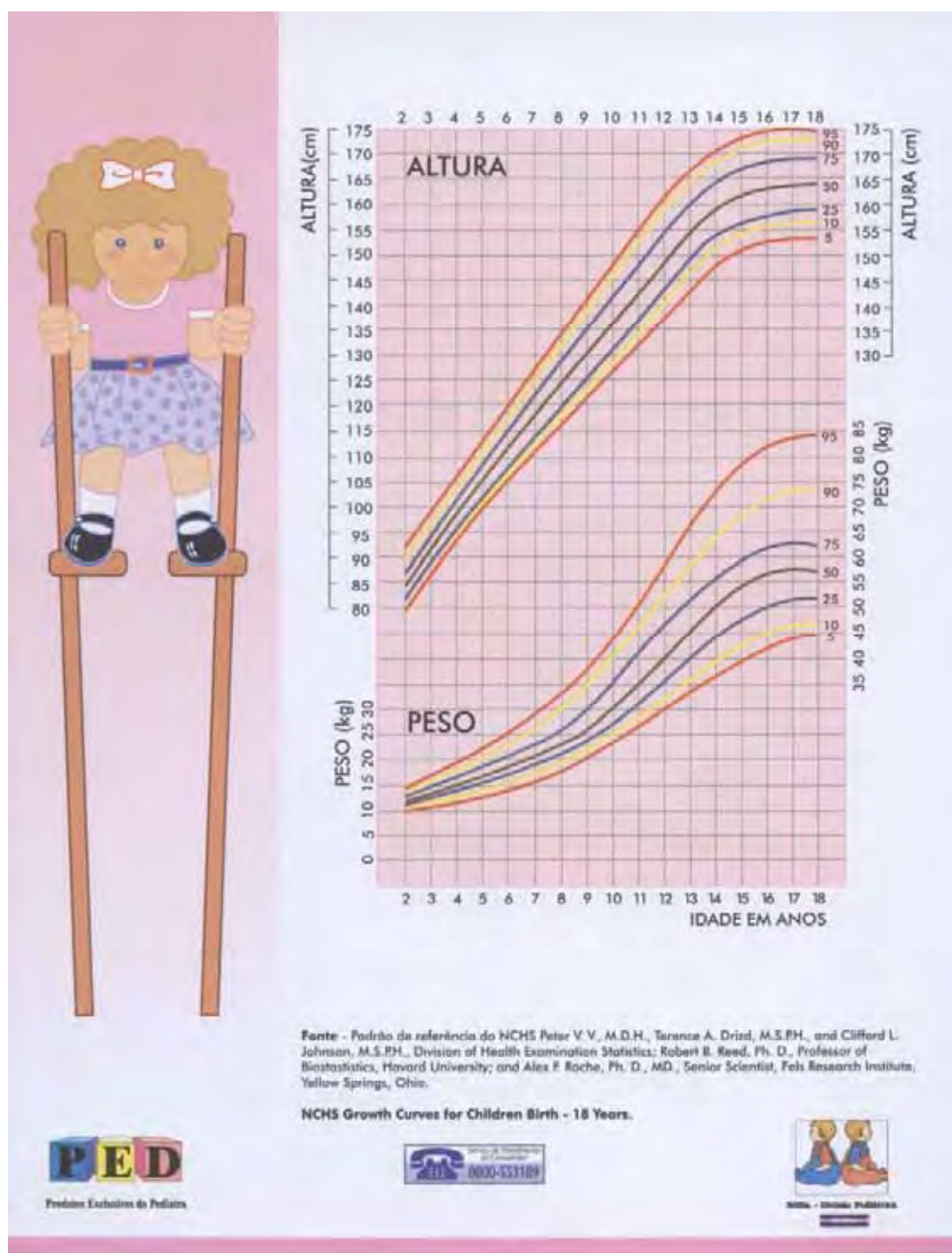
Continua

Continuação



Continua

Continuação



9 – *Apêndices*

9 – APÊNDICES

Apêndice 1

CARTA DE INFORMAÇÃO AO SUJEITO DA PESQUISA

Título: “MICROBIOTA INTESTINAL DE CRIANÇAS COM ANOMALIAS CRANIOFACIAIS TRATADAS COM CEFAZOLINA EM CIRURGIA DE PALATO”

Justificativa:

- Todas as pessoas possuem alguns germes 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 germes e assim dificultar a sua recuperação.

A referida pesquisa tem como objetivo:

- Identificar a presença e a quantidade destes germes em amostras de fezes.

Procedimentos:

- Solicitamos sua participação neste estudo, e para isso será necessário que nos forneça pequena quantidade de fezes, sangue e algumas informações necessárias para avaliarmos a presença e a quantidade destes germes.
- Com esses resultados será possível oferecer orientações relativas à alimentação, como forma de melhorar a quantidades destes germes que trazem benefícios à saúde.

Garantias:

- Acesso às informações sobre os procedimentos e benefícios relacionados à pesquisa; liberdade para retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem prejuízos; sigilo e privacidade.
- Assim que existam resultados estes serão apresentados para vocês em consultas a serem agendadas conforme rotina do hospital;
- Todos os resultados de exames laboratoriais estarão disponíveis no prontuário geral do paciente em nosso hospital e só serão acessados mediante a requisição da família ou do profissional qualificado.
- "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 na Unidade de Ensino e Pesquisa ou pelo telefone (14) 3235-8421"

Estou ciente também de que minha participação é voluntária e dela posso desistir a qualquer momento, sem explicar os motivos e sem comprometer meu tratamento no HRAC.

Bauru, ____/____/2007

Nome do sujeito ou responsável: _____

Assinatura do sujeito ou responsável: _____

Nome do pesquisador responsável: Prof. Ms. Narciso Almeida Vieira

Assinatura do pesquisador responsável: _____

Apêndice 2**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 da **CARTA DE INFORMAÇÃO AO SUJEITO DA PESQUISA**, devidamente explicada 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: “**MICROBIOTA INTESTINAL DE CRIANÇAS COM ANOMALIAS CRANIOFACIAIS TRATADAS COM CEFAZOLINA EM CIRURGIA DE PALATO**”, realizada por: Prof. Ms. Narciso Almeida Vieira nº do Conselho CRBio-1: 06.350/01-D, sob orientação do Prof.Dr: Paulo Câmara Marques Pereira, nº do Conselho: CRM 37.675.

Fica claro que o sujeito da pesquisa ou seu representante legal, poder a qualquer momento retirar seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornaram-se 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 2007.

Assinatura do Sujeito da Pesquisa
Responsável
ou responsável

Assinatura do Pesquisador

*** A SER PREENCHIDO, SE O SUJEITO DA PESQUISA NÃO FOR O PACIENTE.**

Nome do Pesquisador Responsável: Prof. Ms. Narciso Almeida Vieira

Endereço do Pesquisador Responsável: Av. Orlando Ranieri, 7-108 – Bloco 31 – Apto.: 13

Cidade: Bauru – Estado: São Paulo – CEP: 17047-001

Telefone: (14) 3203-8013 – E-mail: narvieira@centrinho.usp.br

Endereço Institucional: Rua Silvio Marchione, 3-20

Cidade: Bauru – Estado: São Paulo – CEP: 17012-900

Telefone: (14) 3235-8100 – Fax: (14) 3234-7818

Apêndice 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) Medicções 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? _____

Frequência evacuatória:

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

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) _____

Apêndice 4

Protocolo de Avaliação Microbiológica									
RG: _____ Paciente: _____									
Data: ____ / ____ /200__									
Flora	Momento 1								
	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	10^9
Bact.									
Bífido									
Lacto									
Flora	Momento 2								
	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	10^9
Bact.									
Bífido									
Lacto									

Apêndice 5

Avaliação Laboratorial

Nome: _____ RG: _____

Indicadores Mensurados	Valores de Referência	M1
HEMOGLOBINA (g/dL)	Acima de 11,0	
HEMATÓCRITO (%)	34 a 48	
VCM (fL)	87,0 $\pm$ 5,0	
HCM (pg)	29,0 + 2,0	
CHCM (%)	32 a 36	
LEUCÓCITOS TOTAIS (mm ³)	23 a 75	
CONTAGEM DE PLAQUETAS (mm ³)	130.000 a 400.000	

Apêndice 6

Avaliação dos pacientes quanto ao nível socioeconômico, gênero e antropometria

PACIENTE	NÍVEL SOCIAL	GÊNERO	Idade (anos)	Peso (Kg)	Altura (cm)
1 FP	BS	F	2,64	13,1	88,5
2 FP	BS	F	1,75	9,88	82
3 FP	BS	M	1,22	10,45	76
4 FP	BS	F	1,02	9,83	74
5 FP	BS	F	1,69	8,73	82,3
6 FP	BI	M	1,27	9,28	76,5
7 FP	BS	M	1,51	11,4	82,3
8 FP	BS	M	3,04	14,3	91,7
9 FP	BS	F	1,02	8,6	77
10 FP	BS	F	1,03	8,18	75
11 FP	BS	M	1,58	10,43	77,5
12 FP	BS	M	1,01	11,3	81,5
13 FP	BS	F	2,65	11,8	87,5
14 FP	BS	M	1,40	12,7	84,8
15 FP	BS	M	1,44	11,03	75,6
16 FP	BI	M	1,07	8,12	75
17 FP	BS	F	1,98	10,9	83,5
18 FP	BI	F	1,01	12,9	83,5
19 FP	M	M	1,08	10,06	76
20 FP	BS	F	1,45	9,67	76,5
21 FP	BI	F	1,25	8,4	78
22 FP	BI	M	1,74	12,75	87,5
23 FP	BI	M	2,29	11,6	76
24 FP	BS	M	1,11	9,5	76
25 FP	M	M	1,00	10,9	78
26 FP	M	M	1,15	10,07	78,1
27 FP	M	F	1,15	9,95	79
28 FP	BS	F	1,03	10,35	79,5
29 FP	BS	F	2,35	14	86
30 FP	BI	F	1,41	9,45	81
31 FP	BS	F	1,02	9	70
32 FP	M	F	1,01	9,48	75,4
33 FP	BS	F	1,02	8,92	74
34 FP	BI	F	2,24	12,4	85,5
35 FP	BS	M	1,54	10,1	83,5
36 FP	BI	F	1,73	12,63	85,3
37 FP	BS	M	2,09	11,8	84,5

Continua

Continuação

PACIENTE	NÍVEL SOCIAL	GÊNERO	Idade (anos)	Peso (Kg)	Altura (cm)
38 FP	BS	M	1,42	9,76	81,5
39 FP	M	M	2,07	12	84
40 FP	BI	F	1,28	11	80,2
41 FP	BS	F	1,64	12,12	83
42 FP	BS	F	1,68	10,26	82
43 FP	BS	M	1,01	11,3	85
44 FP	BS	F	2,01	13,23	88,1
45 FP	M	M	1,02	9,84	78
46 FP	BS	F	1,03	10,36	80,7
47 FP	BI	M	2,22	10,9	75
48 FP	M	F	1,01	10,85	74,5
49 FP	M	M	1,02	8,27	75,5
50 FP	M	M	1,14	9,78	77,2
51 C	M	F	4,05	15	95
52 C	M	M	2,90	14,43	99
53 C	M	F	1,29	12,685	84
54 C	M	F	2,25	12,5	97
55 C	M	M	1,44	12,8	82,5
56 C	M	F	1,18	12,8	89
57 C	M	M	1,61	11,1	84
58 C	M	F	1,27	10	72,5
59 C	M	M	1,19	12,3	81
60 C	M	M	1,92	12,7	83,5
61 C	M	M	2,66	15,5	90

Nível Social: BI = Baixo Inferior; BS = Baixo Superior; M = Médio.

Gênero: M = Masculino; F = Feminino.

Paciente: FP = Grupo de crianças com fissura de palato; C = Grupo Controle

Apêndice 7

Avaliação Hematológica

PACIENTE	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	Leucócitos (/mm ³)	Neutrófilos (/mm ³)	Linfócitos (/mm ³)	Monócitos (/mm ³)	Eosinófilos (/mm ³)
1 FP	12,0	36	13200	5808	6336	0	8
2 FP	13,2	39	9900	4653	5049	198	0
3 FP	11,0	33	9400	6016	3196	188	0
4 FP	12,8	39	11400	2850	7524	1026	0
5 FP	11,2	38	6800	1700	4692	204	204
6 FP	12,0	37	14900	7152	7301	447	0
7 FP	11,9	35	9400	3854	5076	188	282
8 FP	12,3	37	9000	4140	4320	180	360
9 FP	12,0	38	7900	3239	3950	395	316
10 FP	10,7	32	8800	2112	5984	352	352
11 FP	11,3	34	13500	4185	8235	270	810
12 FP	8,9	29	9600	4992	4128	96	384
13 FP	12,7	39	8700	2871	5394	435	0
14 FP	11,7	36	12800	4608	7296	0	896
15 FP	12,7	38	11400	3876	6840	570	114
16 FP	10,6	32	7500	3075	4200	225	0
17 FP	13,1	39	9100	4550	4368	182	0
18 FP	10,7	33	12400	5332	5828	248	992
19 FP	10,7	34	6000	2100	3660	120	120
20 FP	10,8	33	13100	7074	5764	262	0
21 FP	11,8	36	10500	6510	3570	420	0
22 FP	10,3	32	8500	3740	4335	425	0
23 FP	12,1	38	8500	3060	4335	765	340
24 FP	13,5	41	10500	3360	6930	210	0
25 FP	12,5	37	16800	6048	10080	672	0
26 FP	11,0	33	7100	3053	3337	568	142
27 FP	12,5	37	11500	4830	6440	0	230
28 FP	11,0	35	11200	4480	6496	224	0
29 FP	12,8	38	13400	5896	6700	134	670
30 FP	12,2	37	15300	7650	6885	765	0
31 FP	12,5	37	10000	4300	5000	0	700
32 FP	11,5	35	13700	4247	9316	137	0
33 FP	11,5	35	16400	7708	8364	328	0
34 FP	11,9	36	11400	5016	6156	228	0
35 FP	10,7	33	9700	4268	4947	194	291
36 FP	11,1	36	9800	4802	4704	0	294

Continua

Continuação

PACIENTE	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	Leucócitos (/mm ³)	Neutrófilos (/mm ³)	Linfócitos (/mm ³)	Monócitos (/mm ³)	Eosinófilos (/mm ³)
37 FP	13,7	40	17500	5075	12250	175	0
38 FP	13,1	38	8000	3440	4240	320	0
39 FP	12,9	39	14900	8195	6258	447	0
40 FP	11,5	37	10800	3672	6696	108	324
41 FP	10,8	34	15500	11315	4030	155	0
42 FP	11,2	35	10600	4876	5194	212	318
43 FP	12,2	37	12000	4680	6360	360	600
44 FP	12,7	38	12000	4800	5880	120	1200
45 FP	11,2	34	14800	4736	9768	296	0
46 FP	11	34	10300	5974	3708	618	0
47 FP	12,1	36	7600	2660	4712	228	0
48 FP	12,2	36	11200	5152	4928	1120	0
49 FP	11,1	33	11900	3570	7973	357	0
50 FP	12	36	6500	2990	3120	65	325

Paciente: FP = Grupo de crianças com fissura de palato; C = Grupo Controle

Apêndice 8

Microbiota intestinal e o tipo de parto de Pacientes com e sem fissura de palato

PACIENTES	Tipo de Parto	Lac M1 (Log ₁₀ /fezes)	Lac M2 (Log ₁₀ /fezes)	Bac M1 (Log ₁₀ /fezes)	Bac M2 (Log ₁₀ /fezes)	Bif M1 (Log ₁₀ /fezes)	Bif M2 (Log ₁₀ /fezes)
1 FP	Normal	9	---	9	---	7	---
2 FP	Cirúrgico	9	2	9	8	8	6
3 FP	Cirúrgico	9	7	9	8	9	8
4 FP	Normal	9	5	9	9	9	9
5 FP	Normal	6	---	9	---	8	---
6 FP	Normal	6	---	9	---	9	---
7 FP	Normal	5	3	8	5	7	6
8 FP	Normal	7	---	6	---	8	---
9 FP	Normal	6	---	8	---	6	---
10 FP	Normal	5	4	9	7	7	7
11 FP	Cirúrgico	7	---	9	---	7	---
12 FP	Cirúrgico	3	---	9	---	8	---
13 FP	Cirúrgico	7	---	7	---	7	---
14 FP	Normal	6	---	9	---	8	---
15 FP	Cirúrgico	7	5	9	8	7	6
16 FP	Cirúrgico	7	---	7	---	7	---
17 FP	Cirúrgico	5	---	8	---	5	---
18 FP	Cirúrgico	8	6	7	7	9	8
19 FP	Cirúrgico	5	3	9	6	7	6
20 FP	Normal	8	3	9	8	6	4
21 FP	Normal	3	---	6	---	5	---
22 FP	Cirúrgico	6	5	8	1	7	5
23 FP	Normal	6	---	7	---	9	---
24 FP	Normal	6	---	9	---	7	---
25 FP	Cirúrgico	7	---	8	---	8	---
26 FP	Cirúrgico	8	6	6	6	7	6
27 FP	Cirúrgico	6	6	9	8	-7	7
28 FP	Normal	4	---	9	---	6	---
29 FP	Cirúrgico	4	---	7	---	7	---
30 FP	Normal	9	2	9	8	9	7
31 FP	Cirúrgico	8	---	9	---	9	---
32 FP	Cirúrgico	3	---	6	---	8	---
33 FP	Normal	3	0	9	9	7	7
34 FP	Cirúrgico	9	---	9	---	9	---
35 FP	Cirúrgico	6	---	7	---	5	---
36 FP	Cirúrgico	5	---	8	---	7	---
37 FP	Cirúrgico	1	---	9	---	5	---
38 FP	Normal	7	---	7	---	5	---
39 FP	Cirúrgico	4	---	9	---	7	---

Continua

Continuação

PACIENTES	Tipo de Parto	Lac M1 (Log ₁₀ /fezes)	Lac M2 (Log ₁₀ /fezes)	Bac M1 (Log ₁₀ /fezes)	Bac M2 (Log ₁₀ /fezes)	Bif M1 (Log ₁₀ /fezes)	Bif M2 (Log ₁₀ /fezes)
40 FP	Cirúrgico	6	---	8	---	6	---
41 FP	Cirúrgico	3	---	7	---	6	---
42 FP	Normal	6	3	9	7	5	5
43 FP	Cirúrgico	7	---	8	---	8	---
44 FP	Cirúrgico	6	---	7	---	7	---
45 FP	Normal	6	---	8	---	8	---
46 FP	Cirúrgico	6	4	9	8	7	6
47 FP	Normal	6	4	6	6	7	5
48 FP	Cirúrgico	7	6	9	8	8	7
49 FP	Cirúrgico	9	---	7	---	9	---
50 FP	Cirúrgico	6	4	9	7	6	6
51 C	Cirúrgico	3	---	0	---	7	---
52 C	Cirúrgico	6	---	0	---	6	---
53 C	Cirúrgico	6	---	0	---	7	---
54 C	Cirúrgico	5	---	0	---	7	---
55 C	Cirúrgico	9	---	2	---	9	---
56 C	Cirúrgico	1	---	1	---	7	---
57 C	Cirúrgico	3	---	5	---	9	---
58 C	Cirúrgico	1	---	6	---	7	---
59 C	Cirúrgico	7	---	5	---	7	---
60 C	Cirúrgico	4	---	6	---	7	---
61 C	Cirúrgico	5	---	8	---	7	---

FP = Grupo de crianças com fissura de palato

C = Grupo Controle

Lac = *Lactobacillus sp*Bac = *Bacteroides sp*Bif = *Bifidobacterium sp*

M1 = Momento antes do tratamento com cefazolina em palatoplastia e sem uso de antimicrobianos nos últimos 30 dias

M2 = Momento após 24 horas do tratamento com cefazolina em cirurgia de palato