

Kátia Galeão Brandt

Análise molecular da microbiota fecal de recém-nascidos saudáveis

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Orientadora: Magda Carneiro-Sampaio

Área de concentração: Pediatria

São Paulo

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Brandt, Kátia Galeão

Análise molecular da microbiota fecal de recém-nascidos saudáveis / Kátia Galeão Brandt. -- São Paulo, 2008.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Pediatria.

Área de concentração: Pediatria.

Orientadora: Magda Carneiro-Sampaio.

Descritores: 1.Intestinos/microbiologia 2.Recém-nascido 3.Técnica de tipagem bacteriana 4.Reação em cadeia da polimerase

USP/FM/SBD-383/08

Dedicatória

À *Deus*, por Sua presença em minha vida.

Ao *Prof Luiz Rachid Trabulsi*, em quem surgiu
o sonho de ver esta pesquisa se realizar.

Agradecimentos

Ao meu pai, *Carlos Brandt*, cuja seriedade e paixão pela medicina e pela ciência me atraíram pelos mesmos caminhos. Se tantas vezes na vida sua ajuda me foi necessária, neste desafio ela foi vital.

Ao meu marido, *Felipe Santos*, por seu apoio e tolerância ilimitados, por seu incentivo e valorização, por ter física e emocionalmente assumido um pouco do meu lado mãe, tornando possível a conclusão deste trabalho.

Aos meus filhos, *Pedro* e *Gabriel*, que compreenderam meu afastamento e esperaram ansiosamente o fim desta pesquisa; por me terem nutrido de alegria.

À minha mãe, *Francesca*, por sempre ter acreditado, por seu apoio estratégico com as crianças e por suas intercessões em forma de orações.

Aos meus irmãos *Karla*, *Karina* e *Carlos*, pela segurança da certeza de que não importam os caminhos, e às vezes as distâncias, sempre teremos um ao outro.

À *Profa Magda Carneiro-Sampaio*, por me ter “presenteado” com este projeto, por ter compartilhado a segurança da sua experiência, Por não ter desistido frente aos obstáculos e principalmente por sempre ter posto, de maneira sincera e serena, a felicidade e a segurança da minha família à frente da vontade de ver esta pesquisa se concluir.

À *Profa Marina Martinez*, por ter tornado concreto o sonho do Prof Trabulsi, pela determinação e envolvimento, por não ter medido esforços para concluir esta pesquisa, pelo prazer de ter lhe conhecido e ter contado com sua orientação.

À *Profa Crala Taddei*, por ter operacionalizado esta pesquisa, por ter me apresentado ao fantástico mundo da biologia molecular, por sua tolerância com minha inexperiência, por sua prestativa orientação.

À *Elizabeth Harummy*, por seu competente envolvimento com esta pesquisa, pela sua capacidade intelectual executando as complexas análises estatísticas, pela também tolerância com meu pouco conhecimento de sua área.

À toda equipe do *Laboratório da Profa Marina Martinez*, tendo sido este um projeto adotado por todos.

À *Mariza*, por ter me nutrido com a literatura necessária, por me ter ajudado sempre com simpatia e presteza.

À equipe do *CSE Butantã*, que me acolheram e viabilizaram o acompanhamento das crianças, pelos ensinamentos adquiridos, pelo exemplar trabalho realizado, pela ajuda prestativa de todos, particularmente de *Dra Aparecida, Dra Jaqueline e Dra Fillumena*.

À *Márcia* que aceitou, com competência exemplar, a extenuante tarefa de concluir esta tese comigo.

À *Suzy* e *Jô* que assumiram com competência e envolvimento minha casa e meus filhos.

Às *mãe das crianças*, por terem se envolvido com a realização desta pesquisa, pelos bons relacionamentos vividos, agradeço a todas, mas em especial à *Ana Carolina, Maria de Fátima, Adriana e Fábria*.

“It takes a village to raise a child”

Provérbio africano

“O conhecimento não nos é dado.

É preciso encobri-lo por nós
mesmos, depois de uma viagem
que ninguém nos pode
poupar ou fazer por nós”.

Marcel Proust

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Microbiota intestinal	16
1.2 Métodos laboratoriais para estudo da microbiota fecal	25
2. MÉTODOS	30
2.1 Caracterização do estudo e amostragem	31
2.1.1 Local do estudo	31
2.1.2 Período do estudo	31
2.1.3 Tipo de estudo	31
2.1.4 Seleção – Tamanho da amostra	31
2.1.5 Critérios de inclusão	32
2.2 Procedimentos	32
2.2.1 Coleta do material fecal	32
2.2.2 Análise molecular da microbiota fecal	33
2.2.2.1 <i>Construção de biblioteca 16S rDNA</i>	33
2.2.2.2 <i>Pesquisa de bifidobactérias por Real-time PCR</i>	35
2.2.3 Apresentação dos dados	36
2.2.4 Acompanhamento das crianças e registro de informações	36
2.2.5 Considerações éticas	37
3. RESULTADOS	38
3.1 Dados relativos aos indivíduos	39
3.2 Dados relativos às bibliotecas 16S rDNA	41
3.2.1 Clonagem e seqüenciamento	41

3.2.2 Perfil bacteriano da microbiota fecal ao longo do primeiro mês de vida – Análise de tendência grupal	42
3.2.2.1 Biblioteca 16S rDNA do 2º dia de vida	42
3.2.2.2 Biblioteca 16S rDNA do 7º dia de vida	42
3.2.2.3 Biblioteca 16S rDNA do 30º dia de vida	44
3.3 Real-time PCR para bifidobactéria – tendência grupal	45
3.4 Perfil bacteriano da microbiota fecal ao longo do primeiro mês de vida – Análise individual após uso de antibiótico	45
3.4.1 Biblioteca 16S rDNA do 2º dia de vida – criança 3	45
3.4.2 Biblioteca 16S rDNA do 7º dia de vida	46
3.4.3 Biblioteca 16S rDNA do 30º dia de vida – criança 3	46
3.5 Real-time PCR para bifidobactéria – criança 3	48
4. DISCUSSÃO	49
4.1 Escolha do tema	50
4.2 Considerações sobre o grupo	50
4.3 Considerações metodológicas	51
4.4 Considerações sobre a análise dos dados	52
4.5 Comparação entre bibliotecas	53
4.6 Considerações sobre os principais grupos bacterianos	54
4.7 Uso de antibiótico em uma criança e as repercussões sobre a composição da microbiota	60
4.8 Possível impacto da composição da microbiota na imunomodulação do hospedeiro	62
5. CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS	66
APÊNDICE	79
Apêndice 1. Formulário de consentimento livre e esclarecido	80
ANEXOS	82
Anexo 1. Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário – HU-USP	83
Anexo 2. Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina - USP	84

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

