

UEA

UNIVERSIDADE
DO ESTADO DO
AMAZONAS

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA**

RODRIGO MACIEL ALENCAR

**CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA DO MICROBIOMA BACTERIANO
INTESTINAL DE COMUNIDADES AMERÍNDIAS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

**MANAUS
2017**

RODRIGO MACIEL ALENCAR

**CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA DO MICROBIOMA BACTERIANO
INTESTINAL DE COMUNIDADES AMERÍNDIAS NA AMAZÔNIA
BRASILEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

**Orientador: Prof. Dr. Cleiton Fantin Rezende
Coorientador: Prof. Dr. José Gregorio Martínez**

**MANAUS
2017**

RODRIGO MACIEL ALENCAR

**CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA DO MICROBIOMA BACTERIANO
INTESTINAL DE COMUNIDADES AMERÍNDIAS NA AMAZÔNIA
BRASILEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Data da aprovação: 14 / 12 / 2017

Banca Examinadora:

Dra. Enedina Nogueira de Assunção
Universidade Federal do Amazonas

Dra. Fabíola da Costa Rodrigues
Fundação Alfredo da Matta

Dr. Cleiton Fantin Rezende
Universidade do Estado do Amazonas

**MANAUS
2017**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

A368c	<p data-bbox="502 1243 1260 1467">Alencar, Rodrigo Maciel Caracterização taxonômica do microbioma bacteriano intestinal de comunidades ameríndias na Amazônia brasileira / Rodrigo Maciel Alencar. Manaus : [s.n], 2017. 92 f.: color.; 21 cm.</p> <p data-bbox="502 1489 1260 1713">Dissertação - PGSS - Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2017. Inclui bibliografia Orientador: Fantin, Cleiton Coorientador: Martínez, José Gregorio</p> <p data-bbox="502 1736 1260 1953">1. Microbioma intestinal. 2. Resistência aos antibióticos. 3. Yanomami. I. Fantin, Cleiton (Orient.). II. Martínez, José Gregorio (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Caracterização taxonômica do microbioma bacteriano intestinal de comunidades ameríndias na Amazônia brasileira</p>
-------	---

*Dedico aos meus pais
Elisabete e Roberto Alencar*

AGRADECIMENTOS

À Deus

Aos meus pais pela educação que me deram e pelo total incentivo à minha formação acadêmica.

Às minhas irmãs Thaísa e Gabriela pelo apoio de sempre durante toda a minha vida e pela ajuda com suas experiências acadêmicas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Cleiton Fantin, pela oportunidade, ensinamentos, confiança e contribuição durante o andamento da pesquisa.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Gregorio Martínez, pela oportunidade, ensinamentos, parceria e pela presença durante praticamente todo o trabalho.

Ao Prof. Dr. Rudi Emerson de Lima Procópio pela ajuda na execução de parte dos experimentos.

À Prof. Patrícia Melchionna Albuquerque por conceder estrutura e material na execução de parte do trabalho.

A todos os professores do MBT que contribuíram para a minha formação.

Agradecimento especial à Bárbara pela paciência e pelo apoio a todas as minhas decisões tomadas.

Às meninas da microbiologia Paola, Jessica, Rosiane e Milena pelas experiências compartilhadas no decorrer dos trabalhos.

À Priscila, Sandra e Valéria pela grande ajuda no decorrer do trabalho, desde as primeiras reuniões para autorização da pesquisa até a última etapa do experimento.

À todas as pessoas que contribuíram de certa forma a este trabalho: amigos do MBT, colegas do laboratório da UEA, UFAM e CASAI (seria uma lista imensa de nomes aqui).

À CAPES pelo auxílio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas pela oportunidade.

Muito obrigado!

RESUMO

O intestino humano abriga milhões de bactérias, que em conjunto são conhecidas como microbioma ou flora intestinal. Investigar o microbioma intestinal humano de comunidades tradicionais nos traz informações relevantes de como eram os estados ancestrais do microbioma nas primeiras civilizações humanas e como ocorreram as mudanças ao longo do tempo. Portanto, o objetivo desta pesquisa foi caracterizar taxonomicamente o microbioma intestinal de comunidades ameríndias tradicionais Yanomami dentro da Amazônia brasileira e verificar o perfil de resistência de *Escherichia coli* contra os antibióticos mais utilizados pela medicina. Para isso, foram coletadas amostras fecais de 18 indígenas Yanomami moradores em aldeias nas áreas dos estados de Roraima e Amazonas, e de 12 indivíduos não-Yanomami moradores da cidade de Manaus-AM. Inicialmente, após a extração de DNA bacteriano das fezes, foi realizada uma análise por sequenciamento de nova geração da região 16S do rRNA, que permitiu a identificação taxonômica das bactérias que compõem o microbioma intestinal. Em seguida foi avaliada a resistência de *E. coli*, isoladas diretamente das amostras fecais, contra sete antibióticos da medicina moderna (Ampicilina, Penicilina, Ciprofloxacina, Cefalexina, Canamicina, Gentamicina e Tetraciclina) através de antibiograma. Foi encontrada uma diferença entre a população Yanomami e a população de Manaus quando comparado os principais gêneros encontrados na composição do microbioma intestinal, principalmente em relação as bactérias características de populações com estilo de vida tradicional, como *Prevotella* e *Treponema*. Já em relação ao perfil de susceptibilidade de *E. coli*, foram observados altos níveis de resistência por parte das bactérias dos Yanomami, apenas Gentamicina foi capaz de inibir o crescimento das bactérias de todos os indivíduos Yanomami. Diferentemente das bactérias dos indivíduos de Manaus, que apresentaram um perfil de sensibilidade para seis dos sete antibióticos testados. Apesar do contato com as populações urbanizadas, os Yanomami do território brasileiro ainda mantêm no seu microbioma intestinal as bactérias de uma comunidade tradicional.

Palavras chave: Microbioma intestinal, Resistência aos antibióticos, Yanomami

ABSTRACT

The human gut houses millions of bacteria, which together are known as microbiome or intestinal flora. Investigating the human gut microbiome of traditional communities brings us relevant information on how the ancestral microbiome states were in early human civilizations and how changes occurred over time. Therefore, the objective of this research was to characterize the gut microbiome taxonomically of traditional Amerindian societies within the Brazilian Amazon and verify the resistance profile of *Escherichia coli* against the antibiotics most used by medicine. For this, fecal samples were collected from 18 Yanomami Indians living in villages in the areas of Roraima and Amazonas, and 12 non-Yanomami individuals living in Manaus. Initially, a new generation sequencing analysis of the 16S rRNA region was carried out, which allowed the taxonomic identification of the bacteria that make up the intestinal microbiome. The resistance of *E. coli*, isolated from fecal samples, was evaluated against seven antibiotics of modern medicine (Ampicillin, Penicillin, Ciprofloxacin, Cephalexin, Kanamycin, Gentamicin and Tetracycline) by antibiogram. A difference was found between the Yanomami population and Manaus population when compared to the main genera found in the composition of the intestinal microbiome, especially in relation to the bacteria characteristic of populations with traditional lifestyle, such as *Prevotella* and *Treponema*. In relation to the susceptibility profile of *E. coli*, high levels of resistance were observed by the Yanomami bacteria, only Gentamicin was able to inhibit the growth of the bacteria. Differently from the bacteria of Manaus individuals, who presented a sensitivity profile for six of the seven antibiotics tested. Despite the contact with the urbanized populations, the Yanomami of the Brazilian territory still maintains in their intestinal microbioma the bacteria of a traditional community.

Key words: Gut microbiome, Antibiotics Resistance, Yanomami.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1: Porcentagem de resistência de <i>Escherichia coli</i> aos antibióticos.....	68
---	----

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

- Figura 1. Distribuição do território Yanomami na América do Sul.....21
- Figura 2. Expansão dos Yanomami e primeiros registros de contatos com homem branco ao longo dos seus territórios.....22

CAPÍTULO I

- Figura 1. Distribuição território Yanomami.....32
- Figura 2. Abundância de Bacteroidetes e Firmicutes no microbioma intestinal dos indivíduos Yanomami.....36
- Figura 3. Abundância de Bacteroidetes e Firmicutes no microbioma intestinal dos indivíduos de Manaus.....37
- Figura 4. Comparação de abundância de Bacteroidetes e Firmicutes encontrada no microbioma intestinal dos indivíduos Yanomami e de Manaus.....38
- Figura 5. Comparação entre os gêneros bacterianos exclusivos de Manaus e Yanomami.....39
- Figura 6. Comparação do número de gêneros bacterianos identificados40
- Figura 7. Abundância de *Prevotella*.....41
- Figura 8. Abundância de *Bacteroides*41
- Figura 9. Abundância de *Lactobacillus*.....42
- Figura 10. Abundância dos doze principais gêneros encontrados nos grupos estudados (excluindo *Prevotella*).....43
- Figura 11. Abundância relativa de gêneros encontrados nos microbiomas intestinais Abundancia de *Lactobacillus* encontradas nos grupos estudados43
- Figura 12 Análise de componentes principais (PCA) entre os gêneros identificados mais abundantes.....44
- Figura 13. Análise de componentes principais (PCA) entre os grupos por faixa etária analisando a diferença devido à ausência ou presença de cada OTU nos grupos.....45
- Figura 14. Análise de componentes principais (PCA) entre os grupos por faixa etária analisando a abundância dos gêneros identificados nos grupos.....45

Figura 15. Dendrograma de similaridade (99%) entre os grupos de faixa etária.....46

Figura 16. Índices de diversidade alfa (ace) para as duas populações.....47

CAPÍTULO II

Figura 1. Análises de Neighbor Joining.....67

Figura 2. Relações de ancestralidade para a determinação de padrões de dispersão de *E. coli* por análise de Máxima Verossimilhança.....67

Figura 3. Classificação das cepas de *E. coli* testadas contra os antibióticos segundo a *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI*.....69

Figura 4. Antibiograma para o antibiótico Cefalexina.....70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC – *American Type Culture Collection*

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

CASAI – Casa de Apoio à Saúde do Índio

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CTAB – Brometo de cetiltrimetilamônio

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DSEI-Y – Distrito Sanitário de Especial Indígena Yanomami

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

OMS – Organização Mundial da Saúde

OTUs – Unidades Taxomômicas Operacionais

PCA – Análise de Componentes Principais

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Microbioma intestinal humano	15
2.1.1 Composição e modulação pela alimentação.....	15
2.1.2 Doenças intestinais	16
2.1.3 Resistência aos antibióticos	18
2.2 Comunidades ameríndias Yanomami.....	20
2.3 Estudo dos Microbiomas.....	23
2.3.1 Ferramentas.....	23
2.3.2 Projetos Microbioma Humano	25
3 OBJETIVOS	27
3.1 Geral	27
3.2 Específicos	27
CAPÍTULO I	28
CAPÍTULO II	60
4 DISCUSSÃO GERAL	74
5 CONCLUSÃO	75
6 REFERÊNCIAS	76
7 APÊNCIDE	81
Tabela 1. Concentração das amostras de DNA.....	81
Tabela 2. Combinações primers/barcode	82
Tabela 3. Sequências barcodes	83
Tabela 4. ANOVA/Tuckey - Ampicilina	85
Tabela 5. ANOVA/Tuckey – Penicilina	85
Tabela 6. ANOVA/Tuckey – Ciprofloxacina	85
Tabela 7. ANOVA/Tuckey – Cefalexina	85
Tabela 8. ANOVA/Tuckey – Canamicina.....	86
Tabela 9. ANOVA/Tuckey – Gentamicina.....	86
Tabela 10. ANOVA/Tuckey – Tetraciclina.....	86
8 ANEXOS	87
8.1 Folha de Rosto	87
8.2 Carta de Anuência DSEI-Y	88
8.3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	90

1 INTRODUÇÃO

O intestino humano abriga milhões de bactérias, que em conjunto são conhecidas como microbioma ou flora intestinal. Alguns estudos demonstram que habitantes de áreas industrializadas possuem uma diversidade menor de microrganismos, se comparados com caçadores e coletores de alimentos, por exemplo, da África, Peru e Papua Nova-Guiné (OBREGON-TITO et al., 2015), aspecto preocupante, pois a ausência de diversidade bacteriana também tem sido relacionada à obesidade, diabetes e diversas doenças autoimunes, como alergias, doença de Crohn e colite ulcerativa (GIONGO et al., 2011; YATSUNENKO et al., 2012).

A interação hospedeiro-micróbio torna-se determinante nos processos fisiológicos do hospedeiro, podendo afetar positivamente respostas imunes, o comportamento e inclusive ser responsável pela homeostase metabólica dos mesmos (HENAO-MEJIA et al., 2012). Existe um incremento acelerado do interesse pelo estudo de microbiomas intestinais de comunidades humanas com formas de subsistência tradicionais (caçadores, agricultores e coletores), pois permite descobrir novas evidências sobre os estados ancestrais dos microbiomas e as mudanças históricas na interação hospedeiro-micróbio, como por exemplo, quais bactérias estão faltando em nossa flora intestinal? Quais bactérias estamos perdendo? E como estão relacionadas com os hábitos alimentícios, estilos de vida e algumas doenças das novas civilizações? (OBREGON-TITO et al., 2015). De fato, muitas dessas pesquisas têm permitido gerar ferramentas dietéticas como probióticos de cepas humanas perdidas, de extrema importância na nossa flora para a prevenção de doenças, ou inclusive, o desenvolvimento de métodos como transplante do microbioma fecal (WEIL & HOHMANN, 2015), utilizado para o tratamento de doenças intestinais graves, como aquelas causadas por *Clostridium difficile*, em casos em que a resistência antibiótica prevalece e estes não possuem mais efeitos na erradicação da bactéria.

Apesar da grande importância para transformar a saúde e a medicina humana, a diversidade microbiana intestinal tem sido pouco explorada,

principalmente em relação às populações humanas ancestrais ou com estilos de vida tradicionais. Sabe-se também que o microbioma humano estudado até hoje, remota ou urbana, possui uma grande diversidade de genes de resistência aos antibióticos (BARTOLONI et al., 2009; SOMMER, DANTAS & CHURCH, 2009), porém não existe uma detecção de genes de resistência por parte destas bactérias aos antibióticos da era moderna em sociedades dentro da Amazônia brasileira. Desconhecimento que aumenta o risco de ameaça e vulnerabilidade destas comunidades ameríndias. Nesse último ponto, já foi comprovado que a resistência aos antibióticos da medicina moderna por parte destas comunidades constitui uma das maiores ameaças para as mesmas (CLEMENTE et al., 2015).

No Brasil, as comunidades com estilos de vida tradicionais são os povos indígenas e até o momento, cerca de 80% desses povos habitam as regiões da Amazônia brasileira. Essas sociedades, vivendo em ambientes diversificados, apresentam imensa variabilidade em termos de tempo e formas de contato, alimentação e formas de subsistência, englobando desde grupos que vivem em contextos urbanos, em transição e até os ditos 'isolados' (PINA DE BARROS, 2003). Essa riqueza de etnias representa para a Amazônia brasileira um grande potencial, inigualável comparado com qualquer outro local do mundo, na possibilidade de conhecer estes estados mais primitivos e ancestrais do microbioma humano, o processo de transição dos mesmos como resposta aos estilos de vida urbanizados e sua relação com as doenças. Apesar disso, não existem estudos na Amazônia brasileira relacionados com esta nova temática, a qual, sem dúvida, representa uma nova alternativa na busca de soluções para algumas doenças das sociedades contemporâneas. Uma abordagem simultânea de caracterização dos microbiomas nestes estados da transição e o perfil de sensibilidade de *Escherichia coli* pode fornecer informações para a criação de políticas de saúde pública voltadas para as comunidades Yanomami da Amazônia brasileira. Portanto, o estudo teve como objetivo caracterizar taxonomicamente o microbioma bacteriano intestinal de comunidades indígenas Yanomami e avaliar o perfil de sensibilidade a alguns antibióticos de *E. coli* encontrados no microbioma desses indígenas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Microbioma intestinal humano

2.1.1 Composição e modulação pela alimentação

O corpo humano abriga uma variedade enorme de microrganismos que em conjunto são conhecidos como microbioma. Nesse conjunto de microrganismos são encontrados bactérias, fungos e vírus (BÄCKHED et al., 2012) e seus respectivos genes importantes para definir a sua composição e função. Dentre todos os microbiomas do corpo humano, o microbioma intestinal é aquele que possui uma maior diversidade de microrganismos, consequentemente aquele que tem funções metabólicas importantes. Para cada célula humana encontrada no intestino, existem aproximadamente 100 células bacterianas totalizando cerca de 100 trilhões de microrganismos (WU e LEWIS, 2013). Ao todo se estima que o microbioma intestinal humano abriga mais de 1.000 espécies bacterianas diferentes (SENDER, FUCHS e MILO, 2016). A maior classe bacteriana encontrada no microbioma intestinal humana pertence ao filo Bacteroidetes e ao filo Firmicutes (ECKBURG et al., 2005; TREMAROLI & BÄCKHED, 2012).

A formação do microbioma intestinal é iniciada a partir do nascimento do bebê, logo ao passar pelo canal vaginal da mãe, e as bactérias (principalmente *Lactobacillus*) são assim transferidas para o filho, ou ainda as bactérias da pele da mãe, caso o nascimento seja a partir de cesárea. (PALMER et al., 2007). Os bebês que nascem de parto natural começam a desenvolver um microbioma diferente daqueles que têm um nascimento por cesárea e isso poderá ter uma influência na saúde dessas crianças no futuro, pois o microbioma de alguns bebês que nascem pelo parto cesariano está relacionada com a obesidade na vida adulta (MUELLER et al., 2015; RIGON et al., 2012).

A fonte de alimentação é um fator de fundamental importância para a composição do microbioma intestinal humano. Desde a alimentação pelo leite materno, o microbioma intestinal humano vem sendo moldado, com diferenças significativas dependendo do tipo de alimentação (leite e sólidos), podendo

apresentar uma maior abundância de probióticos no microbioma de crianças apenas alimentadas com leite nos primeiros dois anos de vida (THOMPSON et al., 2015). A composição do microbioma intestinal vai sendo alterada a partir da introdução de outros alimentos para complementar a alimentação com o leite materno, que são os alimentos sólidos que podem estar relacionados com a vida adulta (LI, ZHOU e LIU, 2013). As bactérias são responsáveis ainda pela degradação de alguns tipos de alimentos característicos, e caso essa fonte de alimentação seja alterada, essas bactérias irão perdendo espaço na flora intestinal alterando assim a sua composição, e abrindo oportunidade para outras bactérias oportunistas (FILIPPIS et al., 2015; FLINT et al., 2012).

O microbioma intestinal tem papel fundamental para respostas imunológicas, defesa contra patógenos, uma melhor capacidade metabólica, no comportamento e desenvolvimento gastrointestinal (HENAQ-MEJIA et al., 2012). Estudos com comunidades tradicionais demonstraram que o microbioma dessas sociedades remotas possui uma enorme diversidade de microrganismos quando comparados com as populações industrializadas, pois essas sociedades vivem de uma alimentação basicamente rica em fibras, com pouca ingestão de gorduras, e assim foi verificado a ausência de doenças e a não utilização ou pouca utilização de antibióticos da medicina moderna (CLEMENTE et al., 2015; DE FILIPPO et al., 2010; MARTÍNEZ et al., 2015; OBREGON-TITO et al., 2015; SCHNORR et al., 2014; YATSUNENKO et al., 2012). Já as comunidades industrializadas que possuem um microbioma desenvolvido de forma diferente tende a ter seu sistema imunológico também alterado e assim corre um maior risco de doenças autoimunes e alergias (BLASER e FALKOW, 2009; HOOPER, LITTMAN e MACPHERSON, 2012). Outras doenças também vêm sendo relacionadas com o microbioma intestinal, como por exemplo, também obesidade e diabetes (CLEMENTE et al., 2015; GIONGO et al., 2011).

2.1.2 Doenças intestinais

As alergias relacionadas aos alimentos dependem dos fatores ambientais importantes para intestino, principalmente quando esses fatores acabam afetando as bactérias comensais, podendo assim alterar a composição e levar ao mau funcionamento do sistema imunológico (PURCHIARONI et al., 2013). Já

as doenças inflamatórias intestinais, principalmente doença de Crohn e colite ulcerativa, são as doenças responsáveis pelas maiores causas de diarreia, dores intestinais, ocasionalmente seguidas de febre e sangramento retal. A doença de Crohn é uma inflamação em qualquer órgão do gastrointestinal, principalmente a parte inferior do intestino delgado e também do intestino grosso. A colite ulcerativa é caracterizada por úlceras próximas ao cólon (KASER, ZEISSIG e BLUMBERG, 2010) e dificilmente são separadas uma da outra, sendo classificadas como doenças inflamatórias intestinais. Pacientes com colite ulcerativa foram associados com uma boa taxa de bactérias da família Enterobacteriaceae, enquanto que Gammaproteobacteria no intestino são relacionados com a doença de Crohn (GUINANE e COTTER, 2013; LI et al., 2012).

Estudos relacionando à obesidade com o microbioma intestinal, sempre indicaram a abundância de Firmicutes e redução de Bacteroidetes, tanto para em testes realizados em camundongos quanto para humanos (LEY, 2010). Essa relação entre Bacteroidetes e Firmicutes também é encontrada no microbioma intestinal de pacientes com diabetes tipo 2 (REMELY et al., 2016). Foram encontrados em pacientes com diabetes tipo 2 algumas espécies como *Akkermansia muciniphilia*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides vulgatus*, *Peptostreptococcus anaerobius* e bactérias do gênero *Clostridium*, oportunistas que levam a outras inflamações (QIN et al., 2012, REMELY et al., 2016).

Em contrapartida desses agentes patógenos encontrados no intestino humano, existem microrganismos benéficos à saúde humana que são nossos aliados contra essas doenças intestinais inflamatórias, os probióticos. Os probióticos surgem como solução para algumas inflamações e irritações relacionadas com os microrganismos do intestino. Segundo a Organização Mundial de Saúde, os probióticos são definidos como os organismos vivos que conferem benefício à saúde do hospedeiro quando utilizados de maneira adequada. Os probióticos geralmente do gênero *Lactobacillus* podem restaurar a composição da flora intestinal, introduzindo metabólitos melhorados ao hospedeiro, produzindo ácido lático a partir da glicose, podendo ser uma forma

de tratamento ou prevenção de algumas inflamações intestinais, (HEMARAJATA e VERSALOVIC, 2013).

Outra ferramenta importante para a erradicação dessas doenças é o transplante do microbioma fecal (WEIL e HOHMANN, 2015). A infecção causada por *Clostridium difficile* é uma das principais causas de morte por infecções no intestino. A *C. difficile* está presente no microbioma de até 20% dos adultos, e não causa nenhum dano ao hospedeiro saudável com bons hábitos de higiene e alimentação. Porém com o uso de alguns antibióticos para o tratamento de outras infecções, a *C. difficile* se manifesta, pois apresenta uma resistência aos antibióticos utilizados em outros tratamentos, produzindo toxinas e causando colites e diarreias agudas. Como resposta aos tratamentos não eficazes utilizando antibióticos, o transplante do microbioma fecal permite que o paciente receba de um doador saudável e compatível, fezes tratadas em laboratório com soro fisiológico, por via oral ou anal, onde a flora intestinal é rapidamente recuperada pela alteração da sociedade microbiana, uma alternativa para a eliminação das bactérias da flora intestinal que são resistentes aos antibióticos modernos (GANC et al., 2015).

Sabendo-se que o nosso microbioma intestinal evolui conosco e a nossa saúde depende de certa forma desses microrganismos, torna-se importante manter um equilíbrio na sua composição, com a utilização de probióticos na alimentação ou em casos mais graves a alteração da composição do microbioma por meio de transplante é uma sugestão para evitar desenvolvimento de algumas patologias nos hospedeiros ou ainda uma forma de terapia para o caso de pacientes que sofrem com doenças intestinais (GUINANE e COTTER, 2013). Além de doenças intestinais graves, o uso de vários antibióticos também traz a possibilidade da seleção microbiana, onde as bactérias se tornam menos sensíveis e mais resistentes aos antibióticos, sendo assim difícil a sua erradicação e uma preocupação para a medicina (BÄCKHED et al., 2012).

2.1.3 Resistência aos antibióticos

O uso de antibióticos modernos pode trazer algumas complicações devido ao seu uso excessivo, causando desequilíbrio do microbioma intestinal. Sobre

este ponto, estudos recentes indicam que a resistência aos antibióticos da medicina moderna por parte de comunidades tradicionais constitui uma das maiores ameaças para as mesmas. Sabe-se que o microbioma humano estudada até hoje, seja ela remota ou urbana, possui uma grande diversidade de genes de resistência aos antibióticos (BARTOLONI et al., 2009; SOMMER, DANTAS e CHURCH, 2009).

Os antibióticos surgiram como uma solução para as infecções bacterianas que afetavam a humanidade, principalmente durante a Segunda Guerra mundial. A descoberta da Penicilina por Alexander Fleming foi um grande marco, pois foi o primeiro antibiótico descoberto a ter grande sucesso. Porém, a resistência ao antibiótico causou um problema de saúde na mesma década, pela rápida adaptação e capacidade de resistir ao antibiótico por parte de algumas bactérias. Com o passar dos anos, novos antibióticos foram sendo descobertos, utilizados com sucesso, e sendo contratados com a resistência das bactérias anos depois. Nos dias atuais a situação é ainda pior, sendo que algumas bactérias são capazes de resistir a vários antibióticos tradicionais (as chamadas superbactérias) devido ao uso excessivo, prescrição inadequada ou uso sem acompanhamento médico (VENTOLA, 2015).

As bactérias são capazes de adquirir a resistência por vários mecanismos como introdução de genes exógenos, transposons ou mutações. Entre esses vários mecanismos estão as mutações espontâneas, transferência horizontal, seja por transformação, conjugação ou transdução, e ainda devido a pequenas populações hipermutantes (verificadas principalmente em *Escherichia coli*), que são capazes de elevar a sua taxa de mutação rapidamente quando estão sob seleção (BENNETT, 2008; DZIDIC, SUSKOVIC e KOS, 2008).

A utilização desses medicamentos por um período prolongado e sem um acompanhamento médico pode causar o surgimento de uma superbactéria com resistência à vários tipos de antibióticos. Isso é um aspecto mais agravante ainda nas comunidades tradicionais, pois um primeiro contato com esses medicamentos pode trazer riscos com infecções mais agravantes. Clemente et al., (2015) encontraram 28 genes funcionais de resistência no microbioma

intestinal e oral de ameríndios isolados mesmo sem nenhum contato prévio com as sociedades modernas, um achado muito importante para a equipe de saúde que faz um acompanhamento junto a essas comunidades para evitar uma maior exposição dos antibióticos e que a resistência bacteriana também seja um problema futuro para aquela comunidade.

2.2 Comunidades ameríndias Yanomami

As sociedades ameríndias são as primeiras civilizações que habitavam a América antes mesmo das primeiras navegações europeias chegarem ao continente com os seus colonizadores. De acordo com a teoria do povoamento das Américas pelo Estreito de Bering, as populações migraram da Ásia para a América através de uma passagem que ligava os dois continentes (RASMUSSEN et al., 2014), ou também por uma viagem pelo Oceano Pacífico através de navegações (PERKINS, 2013). Essas comunidades se reproduziram, permaneceram nas novas terras e continuaram com as mesmas fontes alimentação, costumes e religiões até a chegada dos europeus.

Os povos Yanomami vivem em uma sociedade de caçadores/agricultores localizados ao norte da floresta tropical no Brasil e também na Venezuela (Figura 1) cujo contato com a sociedade contemporânea é relativamente recente (TOURNEAU, 2010) (Figura 2). O território Yanomami possui quase 192.000 km², na região dos afluentes da margem direita do rio Branco e esquerda do rio Negro. Atualmente existem cerca de 35.000 Yanomami vivendo nas tribos no Brasil e na Venezuela (Instituto Sócio Ambiental, 2016).

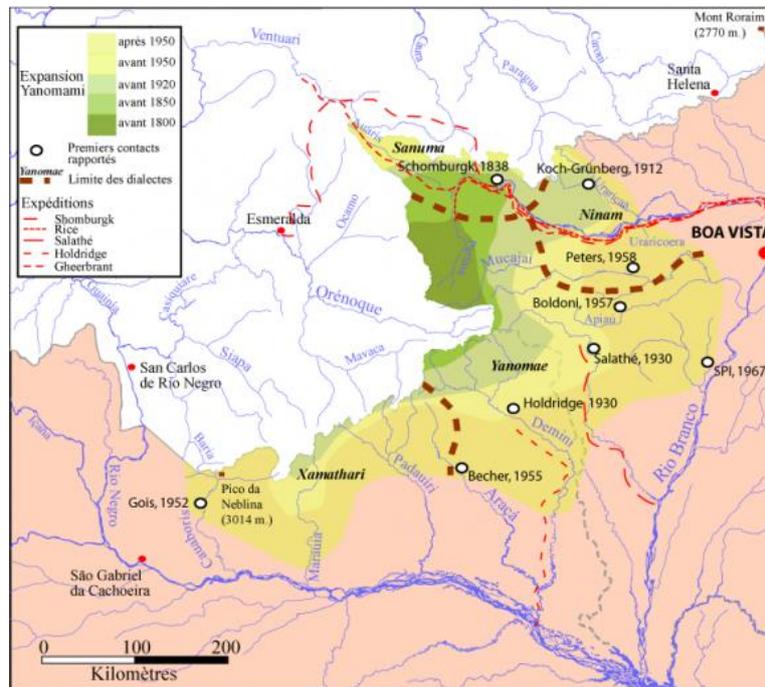
Figura 1. Distribuição do território Yanomami na América do Sul.



Fonte: Instituto Socioambiental (2009)

A população Yanomami no Brasil tem cerca de 19.247 pessoas, distribuídas em 251 comunidades (Serviço de Epidemiologia – DSEI Yanomami, 2010) em uma área de 96.649 km². Dentro do Amazonas, a população Yanomami é a única, até hoje conhecida, comunidade tradicional que possui todos os estágios de transição para a urbanização: populações completamente isoladas (Tribo na Venezuela), em processo de urbanização (populações rurais nos estados do Amazonas e Roraima) e com membros já urbanizados (membros moradores na cidade de Manaus-AM e Boa Vista-RR). Desses três estágios, só um tem sido estudado até hoje. A tribo isolada na Venezuela teve seu microbioma caracterizado funcional (genes de resistência antibiótica) e taxonomicamente. O trabalho pioneiro realizado por Clemente et al., (2015) analisaram uma população humana ancestral completamente isolada (há cerca de 11 mil anos), a mais antiga de que se tenha registro.

Figura 2. Expansão dos Yanomami e primeiros registros de contatos com homem branco ao longo dos seus territórios.



Fonte: Tourneau (2010)

Mesmo com a complexidade da descoberta, estudos de caracterização de microbiomas intestinais de indivíduos da tribo Yanomami experimentando processo de industrialização/urbanização ou já imersos em ambientes urbanos/industrializados, não foram realizados até hoje. Deste modo, entendemos que nossos achados podem agregar informações relevantes para minimizar os riscos de ameaça e vulnerabilidade à saúde destas comunidades indígenas, bem como ampliar o entendimento e a busca de soluções para algumas doenças das sociedades contemporâneas e/ou urbanizadas, relacionados a seu estilo de vida.

As aldeias Yanomami no Brasil estão distribuídas nos territórios dos estados de Roraima e do Amazonas, sendo algumas delas com acesso a cidades próximas, como por exemplo Barcelos (Amazonas) e Boa Vista (Roraima), e outras aldeias bastante isoladas, com acesso restrito, onde o contato da equipe de saúde indígena só é possível através de deslocamento com helicópteros. A parte médica é de responsabilidade do Distrito Sanitário Especial

Indígena Yanomami (DSEI-Y), onde possuem identificados e localizados 37 Pólos-Base com uma equipe médica para cada região das aldeias com o auxílio de transportes aéreos, fluviais ou terrestres para o contato com as tribos. Os Yanomami contam ainda com a Casa de Apoio à Saúde do Índio (CASAI) em Boa Vista para o alojamento dos indígenas que necessitam de medicamentos e tratamentos mais adequados, onde recebem vacinação, vermíctidas e antibióticos, para tratar de enfermidades comuns na população como febre e diarreias (FREITAS, 2008).

Os Yanomami alimentam-se basicamente de sementes, raízes e frutos da floresta, e semanalmente comem da caça e da pesca. A mandioca é um desses principais alimentos e seve ainda como matéria prima para a fabricação de uma massa para a sua alimentação, o bijú, e também para o preparo do chibé (mandioca e água basicamente) que é diariamente consumido, e também o caxiri, bebida com um alto teor alcoólico. Praticamente todos os Yanomami, desde a sua infância já fazem o uso do benehé, constituído por folhas de tabaco enroladas em cinzas que ficam na boca (na região entre os dentes e os lábios inferiores), sendo uma prática da cultura indígena dessa etnia fazer o uso do tabaco desde os primeiros anos da infância (FREITAS, 2008).

Apesar disso os diferentes grupos Yanomami causam uma diversidade em muitos aspectos para a etnia. Alguns polos possuem contato direto com garimpeiros nas suas terras, esses com maiores riscos de contaminação por algumas doenças, outros consomem alimentos já industrializados como arroz e feijão, possuem domesticação de animais e fazem viagens constantes a cidade para comprar roupas, facões, panelas, bebidas alcoólicas, etc. Em alguns subpolos, os missionários da igreja Católica incentivam as crianças e jovens a não consumirem as bebidas alcoólicas, o que é confirmado pelo respeito e confiança que os indígenas possuem nos religiosos.

2.3 Estudo dos Microbiomas

2.3.1 Ferramentas

O cultivo de bactérias de microbiomas pelas práticas tradicionais da microbiologia é capaz de isolar alguns microrganismos e identificá-los em nível

de espécie, porém essa prática depende de vários meios de culturas diferentes e crescimentos em várias condições para a obtenção de crescimento de até 50% das bactérias cultiváveis do intestino humano (CLEMENTE et al., 2015; ECKBURG et al., 2005). Os antigos métodos para a identificação molecular dependiam do crescimento das bactérias em placa, e seguiam de extração de DNA dessas colônias, amplificação e clonagem desses fragmentos amplificados para a criação de bibliotecas genômicas. Uma posterior identificação por sequenciamento em sequenciador automático dos fragmentos clonais, e finalmente a identificação por comparação em banco de dados. Porém a desvantagem seria de que apenas as espécies bacterianas que apresentaram crescimento seriam identificadas, perdendo talvez mais da metade das espécies existentes no microbioma. Portanto, esse métodos antigos subestimavam a verdadeira diversidade existente.

Atualmente a ferramenta mais utilizada em estudos para identificação taxonômica e filogenia dos microrganismos presentes nos microbiomas é o sequenciamento de nova geração utilizando o gene 16S do rRNA (CLEMENTE et al., 2015; MARTÍNEZ et al., 2015; OBREGON-TITO et al., 2015; SCHNORR et al., 2014). O gene 16S do rRNA possui nove regiões variáveis (V1-V9) que são utilizadas para identificação ou analisar a diversidade bacteriana em microbiomas. Cada região variável tem uma vantagem para identificação de certos tipos de bactérias (principalmente patógenos), porém a região que consegue distinguir o maior número de espécies/gêneros de determinada amostra é a região hipervariável V4, sendo realizados diversos estudos dessa região assim como a regiões V1-V2, V5-V6, em alguns casos (CHAKRAVORTY et al., 2007; CLEMENTE et al., 2015; MARTÍNEZ et al., 2015; YANG, WANG e QIAN, 2016).

Atualmente para uma melhor análise do 16S é necessário uma plataforma de sequenciamento de nova geração. Esses sequenciadores proporcionaram a análise de genomas completos em poucas horas e uma sequência de alto rendimento, sendo uma possibilidade para sequenciar genomas bacterianos completos com uma certa facilidade (CAPORASO et al., 2012). A utilização da Bioinformática e Bioestatística também se tornam indispensáveis para a

realização dos estudos taxonômicos dos microbiomas. Vários pacotes de conjuntos de *softwares* já estão disponíveis para os pesquisadores, assim como plataformas online com banco de dados e inputs já disponíveis para se realizar *blast* das sequências e assim identificar o conjunto de bactérias de cada indivíduo (HUSE et al., 2014; SCHLOSS et al., 2009).

2.3.2 Projetos Microbioma Humano

Com o avanço da tecnologia de sequenciamento de nova geração uma nova tendência foi lançada em meados de 2008, quando foi proposto o sequenciamento do microbioma humano, participando cerca de 80 instituições de pesquisa com um financiamento de R\$ 360 milhões de reais, sendo finalizado em 2012. O Projeto Microbioma Humano (PMH) identificou as comunidades microbianas de 18 localidades diferentes do corpo humano, com relevância para a saúde humana, onde foram encontrados 5.140.472 milhões de genes bacterianos e pouco mais de 10.000 mil espécies bacterianas presentes no microbioma humano de uma pessoa saudável. Além disso, os resultados mostraram que o microbioma intestinal humano é responsável pela produção de anti-inflamatórios que o nosso genoma não é capaz de produzir, importante na composição da flora intestinal de pessoas com a doença de Crohn e colite ulcerativa (CONSORTIUM, 2012; CONSORTIUM, 2012).

Além do PMH, outro projeto foi desenvolvido na Europa por 15 instituições de pesquisas em oito países diferentes chamado MetaHIT (Metagenômica do Trato Intestinal Humano). O projeto visava principalmente ter um maior entendimento sobre duas preocupações agravantes da população europeia: a obesidade e as doenças inflamatórias intestinais, criando um catálogo de 3.3 milhões de genes, verificando a frequência do genoma dos microrganismos em determinados indivíduos e relacioná-los com algumas doenças (QIN et al., 2010). O MetaHIT e o PMH são utilizados como banco de dados fundamentais para a realização de estudos comparativos de caracterização de microbiomas intestinais humanos atualmente, servindo assim como uma ferramenta bioinformática importante para explorar ainda mais esse universo bacteriano.

O estudo do microbioma humano é um caminho a ser seguido atualmente para a pesquisa e de grande importância para a saúde. A revista *Science* realizou a criação da *Unified Microbiome Initiative* (UMI), um ambicioso esforço de pesquisa envolvendo cientistas de instituições dos Estados Unidos para focalizar nos estudos dos microbiomas, assim como a revista *Nature*, que fez uma proposta para a implantação da *International Microbiome Initiative* (IMI), uma rede de pesquisa com a finalidade de ter um maior compartilhamento de informações sobre os microbiomas e incentivar mais pesquisas voltadas para a diversidade microbiológica em todo o planeta. Esses novos convênios, estudos e pesquisas mostram que a investigação dos microbiomas tem uma importância atual para a área da saúde e uma grande possibilidade para novas descobertas e novos conhecimentos (ALIVISATOS et al., 2015; DUBILIER, MCFALL-NGAI e ZHOU, 2015).

Apesar destas novas pesquisas sobre a investigação de microbiomas humanos ainda não existem estudos que caracterizem uma população na Amazônia brasileira. Uma avaliação da composição dos microbiomas nestes estados da transição e também a do perfil de sensibilidade de *Escherichia coli* pode fornecer informações para a criação de políticas de saúde pública voltadas para as comunidades Yanomami da Amazônia brasileira. Portanto, o estudo teve como objetivo caracterizar taxonomicamente o microbioma bacteriano intestinal de comunidades indígenas Yanomami e avaliar o perfil de sensibilidade a alguns antibióticos de *E. coli* encontrados no microbioma desses indígenas.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Caracterizar taxonomicamente o microbioma intestinal de uma sociedade ameríndia tradicional dentro da Amazônia brasileira e comparar com o microbioma intestinal de uma população urbanizada de Manaus-AM.

3.2 Específicos

- Identificar molecularmente as bactérias que compõem o microbioma intestinal.
- Avaliar a diversidade dos microbiomas e a relação com os estilos de vida.
- Examinar a resistência de isolados de *Escherichia coli* do microbioma intestinal Yanomami contra alguns antibióticos modernos.

CAPÍTULO I

O microbioma intestinal dos Yanomami na Amazônia brasileira

O microbioma intestinal dos Yanomami na Amazônia brasileira

Alencar, R.M.¹; Martínez, J.G.^{1,2}; Fantin, C.¹

¹ Grupo de pesquisa em Genética Molecular e Citogenética, Laboratório de Genômica e Proteômica, Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Avenida Carvalho Leal 1777 - Cachoeirinha, Manaus, Brasil.

² Laboratório de Evolução e Genética Animal, Departamento de Genética, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Av. Gal. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, Setor Sul, Coroado I, Manaus, Brasil.

Resumo

O microbioma intestinal humano de comunidades tradicionais estão sendo alvo de estudos recentes devido a relação da composição do microbioma com a saúde, e também devido ao avanço das tecnologias de sequenciamento de nova geração. O objetivo desta pesquisa foi caracterizar taxonomicamente o microbioma intestinal da etnia Yanomami, uma sociedade de caçadores-coletores no norte da floresta amazônica brasileira. Foi feito um sequenciamento da região V1-V2 do gene 16S do rRNA das amostras fecais dos indígenas Yanomami e indivíduos da cidade de Manaus-AM para uma melhor comparação. Foi encontrada uma diferença entre a população Yanomami e população de Manaus quando comparado os principais gêneros encontrados na composição do microbioma intestinal, principalmente em relação as bactérias características de populações com estilo de vida tradicional, como *Prevotella* e *Treponema*, além de uma grande abundância do gênero *Lactobacillus*. Porém, quando analisados os índices de diversidade bacteriana, as duas populações apresentaram índices similares de diversidade alfa. Apesar do contato com as populações urbanizadas, os Yanomami do território brasileiro ainda mantêm no seu microbioma intestinal as bactérias de uma comunidade tradicional, apesar da distância geográfica, de alimentação e estilo de vida. Ainda assim, a população de Manaus se mostrou com uma certa proximidade, em relação a diversidade bacteriana, da população Yanomami.

Palavras chave: 16S rRNA, Microbioma intestinal, Yanomami.

INTRODUÇÃO

Com o avanço da tecnologia do sequenciamento de nova geração, o estudo do microbioma intestinal humano já foi possível ter uma maior compreensão de como estão relacionados a composição do microbioma intestinal com a saúde de cada indivíduo. Com o sequenciamento do gene 16S do rRNA por uma plataforma de nova geração é possível identificar as bactérias que estão presentes no intestino humano a partir de técnicas independentes de cultivo, tendo assim um maior conjunto de resultados em relação ao crescimento de colônias bacterianas (CONSORTIUM, 2012). Alguns estudos com essa nova tecnologia demonstraram a importância de se manter uma alta diversidade bacteriana em nosso microbioma, algo que já foi verificado em habitantes de comunidades tradicionais, como sociedades de caçadores e coletores de alimentos, por exemplo, da África, Peru e Papua Nova-Guiné (OBREGON-TITO et al., 2015). E em contra partida, as populações industrializadas apresentam em sua composição bacteriana intestinal uma ausência dessa diversidade, sendo este um resultado importante, já que a baixa diversidade de bactérias tem sido relacionada à obesidade, diabetes e diversas doenças autoimunes, como alergias, doença de Crohn e colite ulcerativa (GIONGO et al., 2011; YATSUNENKO et al., 2012).

Atualmente existem estudos relacionados com a composição do microbioma intestinal de comunidades tradicionais, pois permitem descobrir novas evidências sobre os estados ancestrais dos microbiomas e as mudanças históricas na interação hospedeiro-micróbio (GIRARD et al., 2017; GOMEZ et al., 2016; MARTÍNEZ et al., 2015; SCHNORR et al., 2014; SMITS et al., 2017). Assim podemos tentar responder algumas perguntas como por exemplo, quais bactérias estão faltando em nossa flora intestinal? Quais bactérias estamos perdendo? E como estão relacionadas com os hábitos alimentícios, estilos de vida e algumas doenças das novas civilizações? Porém, poucos são os estudos investigando comunidades ameríndias (CLEMENTE et al., 2015; OBREGON-TITO et al., 2015; YATSUNENKO et al., 2012).

Apesar da grande importância para transformar a saúde e a medicina humana, a diversidade microbiana intestinal tem sido pouco explorada, principalmente em relação às populações humanas ancestrais ou com estilos de vida tradicionais. Desconhecimento que aumenta o risco de ameaça e vulnerabilidade destas comunidades indígenas, pois não há informações necessárias para a criação de políticas de saúde pública voltadas para as comunidades Yanomami. Portanto, este estudo teve como objetivo caracterizar taxonomicamente o microbioma bacteriano intestinal de comunidades Yanomami na Amazônia brasileira e comparar com uma população de Manaus.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e processamento de amostras

Para dar início a regulamentação dos aspectos éticos, primeiramente foi estabelecida uma parceria com o Distrito Sanitário Especial Indígena Yanomami (DSEI-Y) na cidade de Boa Vista-RR, para obter a sua ajuda, acompanhamento e vigilância do processo de pesquisa, além da sua colaboração para a realização do primeiro contato com o povo Yanomami para a socialização da pesquisa, sem a necessidade da entrada em terras indígenas. A participação do povo Yanomami foi autorizada pelo líder indígena, o Sr. Davi Kopenawa e o Coordenador do DSEI-Y, o Sr. João Catalano, através do Termo de Anuência. Foi feito também um pedido de estudo do projeto ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) para verificação de Mérito científico da pesquisa, e entre outros documentos encaminhados para o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Estado do Amazonas (CEP-UEA / CONEP).

Com a autorização da pesquisa, a equipe médica da Casa de Apoio à Saúde do Índio (CASAI) na cidade de Boa Vista-RR, selecionou aqueles participantes que se encaixavam no grupo de estudo. Os grupos experimentais são: 1) Indivíduos das aldeias Yanomami distribuídas nos territórios dos estados de Roraima e Amazonas (Figura 1), sendo estas representantes do grupo semi-isolado com uma inicial influência urbana (em processo de transição). 2) Habitantes da cidade de Manaus-AM, não-Yanomami e com estilo de vida

completamente urbano desde o nascimento. A coleta de amostras fecais dos indígenas foi realizada na CASAI de Boa Vista-RR, onde foram selecionados 18 indivíduos Yanomami saudáveis, que estavam acompanhando seus familiares com alguma enfermidade na CASAI. Com o auxílio da equipe médica foram coletadas amostras fecais dos 18 Yanomami, distribuídos por cada um dos grupos de faixa etária: dois bebês de 0 a 11 meses (G 1), seis crianças até 10 anos (G 2), cinco adolescentes e jovens adultos até os 35 anos (G 3) e cinco adultos de 45 anos em diante (G 4). Do grupo da cidade de Manaus, foram coletadas 12 amostras, de indivíduos com a mesma faixa etária dos indígenas, um bebê de 0 a 11 meses (G 5), quatro crianças até 10 anos (G 6), quatro adolescentes e jovens adultos até os 35 anos (G 7) e três adultos de 45 anos em diante (G 8).

As amostras fecais dos participantes foram coletadas em recipientes de polipropileno esterilizados seguindo as considerações do manual de Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial (2014), conservadas em gelo e levadas ao Laboratório de Genômica e Proteômica da Universidade do Estado do Amazonas.



Fig. 1. Distribuição do território Yanomami. Fonte: Adaptado de Google Maps, 2017.

Além da coleta das amostras, foram também coletados os dados como sexo, idade e etnia, por informações secundárias através de dados de postos de saúde nos polos do DSEI-Y, e diretamente dos participantes do grupo de Manaus, para maiores informações a respeito dos participantes do presente estudo.

Identificação molecular do microbioma bacteriano

O DNA bacteriano foi isolado diretamente das amostras de fezes dos indígenas e dos participantes da cidade de Manaus-AM utilizando o Kit PowerSoil DNA Isolation (MoBio) seguindo as instruções do fabricante. A integridade do DNA foi verificada visualmente em transluminador UV, após as amostras serem coradas com Gel Red e submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1%. A pureza e concentração do DNA foi estimada em espectrofotômetro Nanodrop2000 (Thermo Scientific, USA) considerando apenas amostras de DNA com taxa de absorvância superior a 1.8 (alta pureza), e a concentração final do DNA extraído de no mínimo 20 ng/μL para uso no processo de amplificação via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), da região variável V1-V2 do gene rRNA 16S.

Para amplificação da região variável V1-V2 do gene rRNA 16S foram utilizados os *primers* bacterianos 27F (V1 *primer forward*) (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 338R (V2 *primer reserve*) (5'-TGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'). Tais *primers* possuem os adaptadores A (A1-A8) e P₁ (P₁₁ - P₁₇), os quais são necessários para o sistema de sequenciamento na plataforma IonTorrent PGM. Os adaptadores possuem uma região curta de 12 a 15 pares de bases chamada de *barcode* (identificador molecular), a qual permitiu distinguir bioinformaticamente as bibliotecas correspondentes a cada amostra depois do sequenciamento, segundo a faixa etária de cada grupo experimental.

Para a reação da PCR foi utilizado o seguinte protocolo: 0,2U de Taq DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific), tampão da Taq DNA polimerase 1X (Thermo Fisher Scientific), MgCl₂ 1,5 mM (Invitrogen), 5 pmol do *primer forward*

contendo os adaptadores “A”, 5 pmol do *primer reverse* contendo os adaptadores “P₁”, dNTPs 0,2 mM (Invitrogen), 2 µL de DNA (~25ng/µL), e 18,4 µL de água ultra pura para completar um volume final da reação de 30 µL. As amostras foram levadas para o termociclador automático e o perfil da PCR foi o seguinte: desnaturação inicial a 95°C por 30 segundos; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento dos *primers* a 64°C por 15 segundos, e extensão a 72°C por 15 segundos; e uma extensão final a 72°C por cinco minutos. Ao final, 2 µL do produto da PCR foram corados com 2 µL de Gel Red, e aplicados em gel de agarose a 1% para confirmação da amplificação através da eletroforese, visualizado em transluminador UV, no Laboratório de Genômica e Proteômica da Universidade do Estado do Amazonas.

Foram feitas quatro réplicas de PCR para cada indivíduo, totalizando cerca de 120 µL por indivíduo. As bibliotecas foram purificadas pelo método de *beads* magnéticas e em seguida submetidas ao Pippin Prep, para a seleção do fragmento de DNA específico para o sequenciamento de nova geração. Em seguida as bibliotecas foram novamente purificadas, desta vez pelo método de colunas (Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit, GE Healthcare Life Sciences, USA). Uma vez purificada, cada biblioteca foi quantificada através de fluorimetria (Qubit® 2.0 Fluorometer, Life Science, USA) seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, as bibliotecas foram mescladas de maneira equimolar (100 ng por amostra) e levadas para o Ion One Touch para a amplificação clonal, e logo em seguida foi realizado o sequenciamento em IonTorrent PGM (Life Technologies, USA) utilizando o kit 400bp no chip 318 IonPGM, no Laboratório de Genômica na Universidade Federal do Amazonas, em ambos os casos, seguindo as recomendações do fabricante.

A análise dos dados foi realizada utilizando o programa Mothur (SCHLOSS et al., 2009), no Centro Nacional de Secuenciación Genómica, na Universidad de Antioquia, Colômbia. Inicialmente, as sequências foram convertidas do formato BAM para o formato FASTQ. O programa PRINSEQ lite foi utilizado para retirar as sequências menores e as sequências inespecíficas que não continham *barcode* e iriam atrapalhar na contagem das sequências. Em seguida o programa Mothur foi utilizado de acordo com o seu manual. Os

primeiros comandos geraram oito grupos de acordo com a faixa etária distribuída em cada uma das duas populações estudadas: das populações Yanomami e Manaus, de acordo com a identificação de *barcodes* perfeitos encontrados nas sequências. Em seguida foi criado o complemento reverso das fitas de DNA sequenciadas, e foram selecionadas as sequências com qualidade superior a 25 de *Phred Score*. Posteriormente foram utilizados vários comandos com a finalidade de remover o máximo de sequências contendo erros (seja do processo de PCR ou do próprio sequenciamento), ao final alinhando todas as sequências filtradas. As sequências com similaridades de no mínimo 97% foram agrupadas em *clusters*, cada *cluster* chamado de Unidade Taxonômica Operacional (OTU). Com todas as sequências filtradas foi feita a comparação com o banco de dados bacteriano RDP do gene 16S do rRNA. Assim, cada sequência identificada recebeu um código, e esse código corresponde a uma OTU identificada no banco de dados. Ao final, o programa gerou uma tabela contendo a identificação taxonômica de todos os grupos de faixa etária dos Yanomami e Manaus, com todas as informações complementares como, número de OTUs observadas, cobertura da composição do microbioma e número de sequências. Realizada a identificação taxonômica, foi analisada a diversidade bacteriana (alfa) de cada grupo de faixa etária. Para isso apenas uma linha de comando foi necessária para que o programa rodasse todas as análises estatísticas e determinasse qual o melhor índice de diversidade alfa para as amostras.

Após as análises em Mothur foram utilizados os programas Minitab, MEGA e Treefinder para as posteriores análises estatísticas, e o programa OriginPro para a construção dos gráficos.

RESULTADOS

Na corrida do Ion Torrent nós tivemos um total de 7.445.524 leituras, das 30 amostras de DNA bacteriano, com um carregamento de 79% das amostras no chip, com um enriquecimento de 100% e uma amplificação clonal de 90%. Os tamanhos dos fragmentos tiveram média de 272 pares de base, com uma moda de 384 pares de base, tamanho aproximado dos nossos fragmentos de interesse.

Nós obtivemos um total de 279.827 leituras (± 9.327 sequências/amostra) após todas as análises no Mothur. A identificação dos grupos de faixa etária dos Yanomami e dos indivíduos de Manaus chegou até o nível de gênero, onde foram encontrados: 14 Filos, 23 Classes, 36 Ordens, 72 Famílias e 147 OTUs para gênero, sendo que 71 dessas OTUs foram identificadas.

Dentre os filos encontrados, a maior abundância pertence aos filos Bacteroidetes e Firmicutes. Na população Yanomami foi encontrada uma grande abundância de Bacteroidetes em relação a Firmicutes, isso para todas as faixas etárias (Fig. 2). Na população de Manaus, bebês, crianças e adultos apresentaram uma abundância similar aos indígenas, porém em idosos a maior classe bacteriana encontrada pertence ao filo Firmicutes (Fig. 3). A abundância absoluta para todos os táxons identificados no presente estudo foi calculada na frequência das sequências encontradas dividida pelo número de indivíduos de cada grupo por faixa etária.

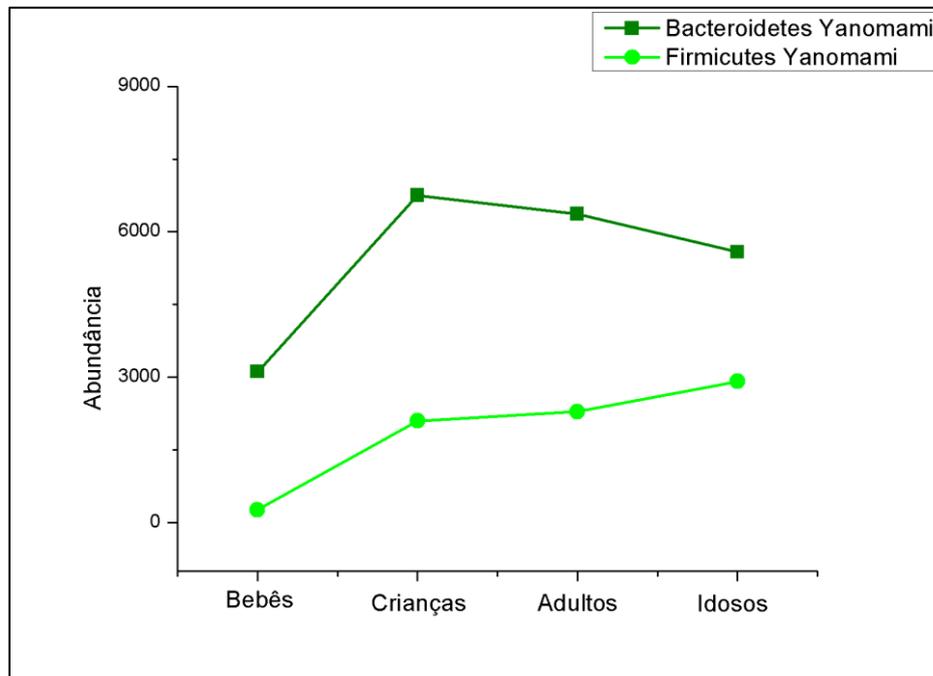


Fig. 2. Abundância de Bacteroidetes e Firmicutes no microbioma intestinal dos indivíduos Yanomami. Dentre todas as faixas etárias, os Bacteroidetes apresentam uma maior frequência na população indígena.

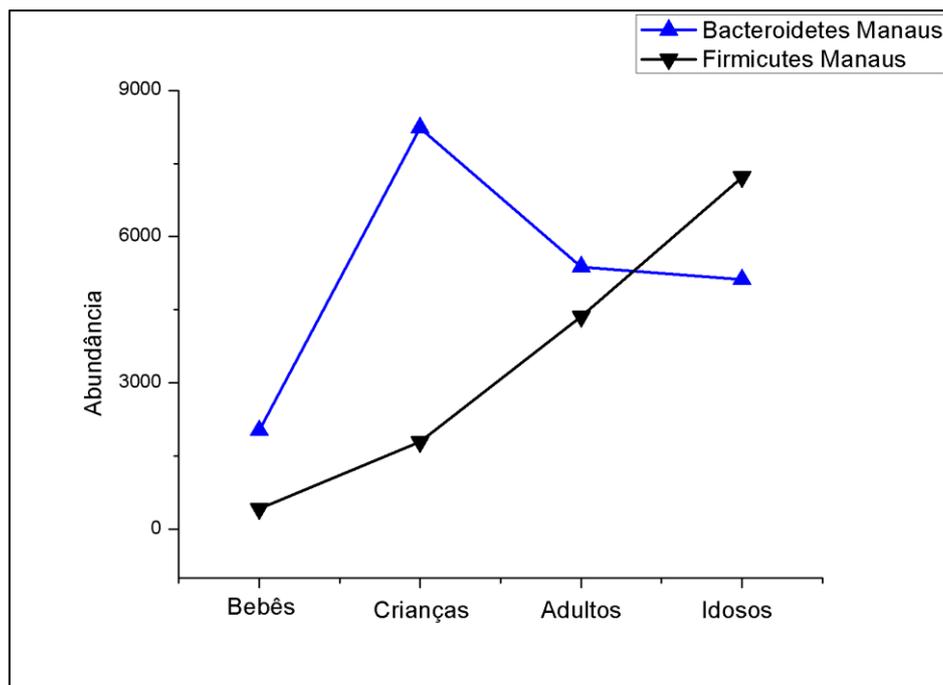


Fig. 3. Abundância de Bacteroidetes e Firmicutes no microbioma intestinal dos indivíduos de Manaus. O filo Bacteroidetes foi encontrado com uma maior frequência nos bebês e nas crianças, enquanto que as bactérias do filo Firmicutes estavam mais abundantes no microbioma intestinal dos adultos e idosos.

Quando comparadas as abundâncias de Bacteroidetes e Firmicutes entre as duas populações é possível verificar a diferença entre as localidades. Bacteroidetes é mais abundante nos Yanomami, e Firmicutes é mais abundante nos indivíduos de Manaus (Fig. 4). A única variância foi entre o grupo das crianças de Manaus, onde a abundância de Bacteroidetes foi maior, enquanto que a maior abundância de Firmicutes foi encontrada nas crianças Yanomami. O teste de χ^2 confirmou a diferença tanto para Bacteroidetes ($P\text{-Value} = 0.000$) quanto para Firmicutes ($P\text{-Value} = 0.000$) entre os Yanomami e indivíduos de Manaus.

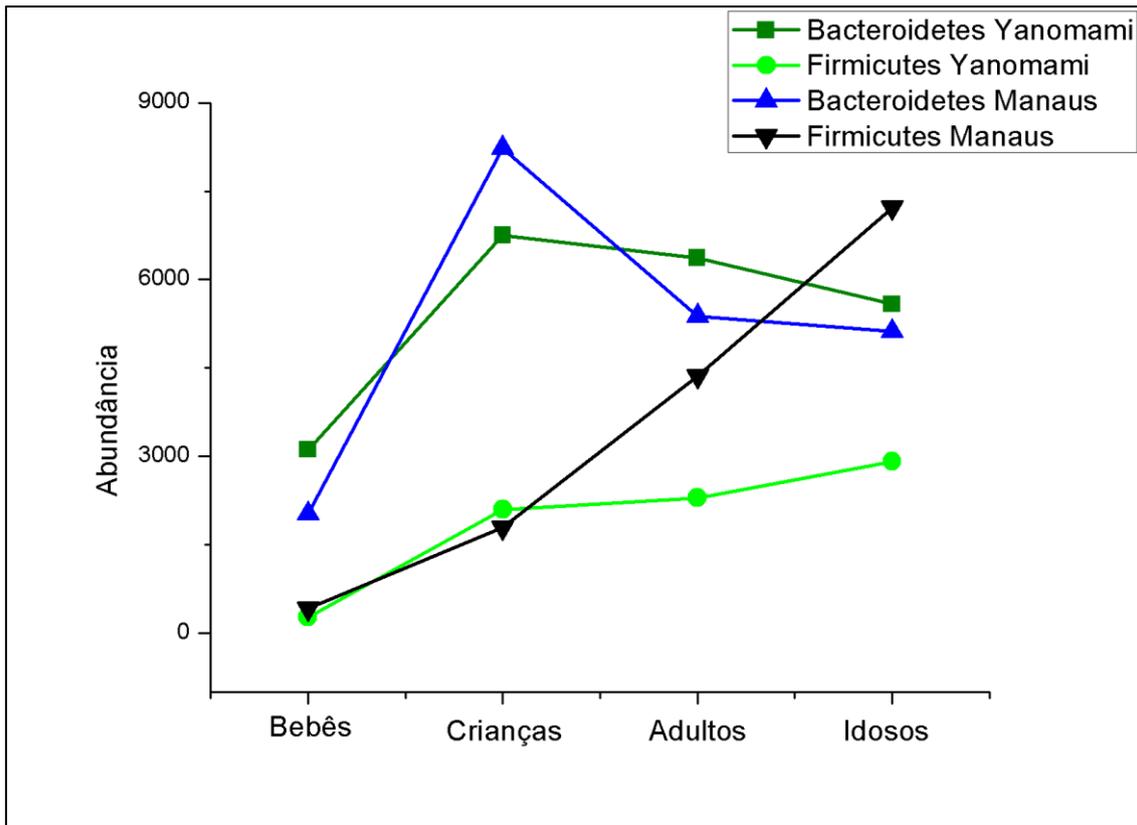


Fig. 4. Comparação de abundância entre Bacteroidetes e Firmicutes encontrada no microbioma intestinal dos indivíduos Yanomami e de Manaus. Bacteroidetes com maior abundância nos Yanomami e Firmicutes com maior abundância nos indivíduos de Manaus, com exceção do grupo de crianças de Manaus.

Em relação ao gênero, foram identificados 71 dentre os microbiomas dos indivíduos Yanomami e indivíduos de Manaus. Dentre esses gêneros, 60 são compartilhados entre as duas populações, sendo dos 11 gêneros restantes, seis exclusivos para os Yanomami e cinco para os indivíduos de Manaus (Fig. 5). Nos indivíduos de Manaus foram encontrados *Turicibacter*, *Mitsuokella*, *Pseudoflavonifractor*, *Parasutterella* e *Megamonas*. Nos indivíduos Yanomami foram encontrados *Pluralibacter*, *Exiguobacterium*, *Rhodococcus*, *Peptostreptococcus*, *Succinivibrio* e *Treponema*.

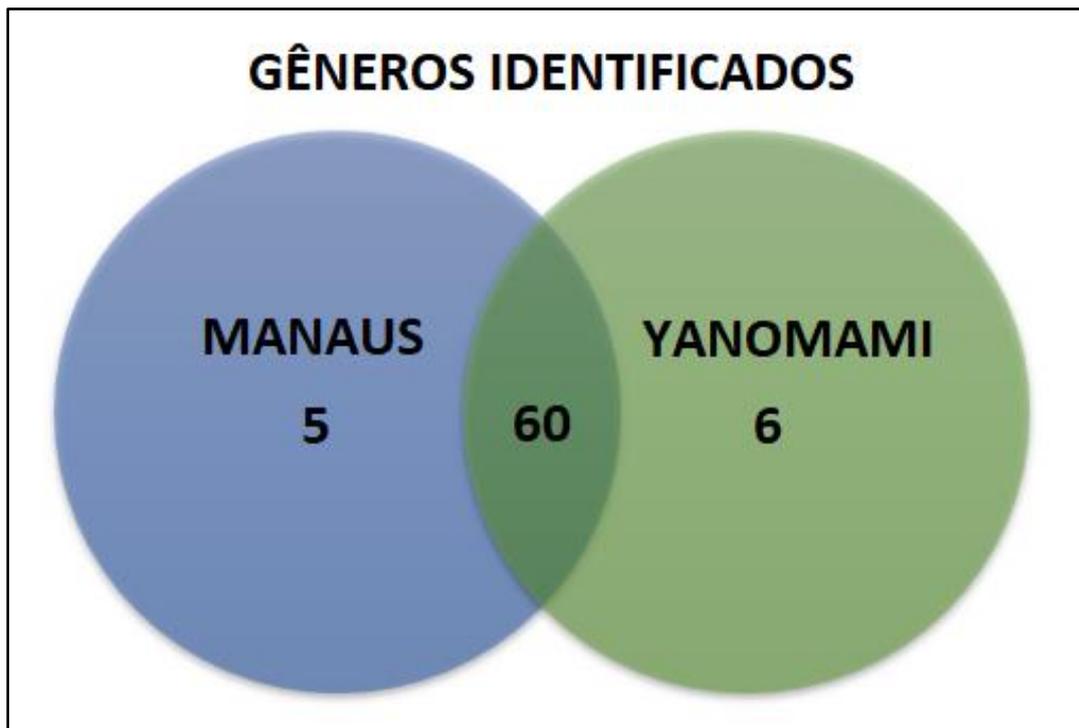


Fig. 5. Comparação entre os gêneros bacterianos exclusivos de Manaus e Yanomami, e os gêneros compartilhados entre as duas populações.

Foi analisado e comparado ainda o número de gêneros encontrados dentre os grupos, compartilhados ou não (Fig. 6). Na composição encontrada foi verificado um aumento do número de gêneros de acordo com a idade de cada indivíduo, resultado já esperado dentre todas as populações humanas. O número encontrado entre as duas populações foi bem similar, com exceção do grupo dos bebês, já que o número de gêneros dos Yanomami foi 30% superior ao número encontrado nos bebês de Manaus.

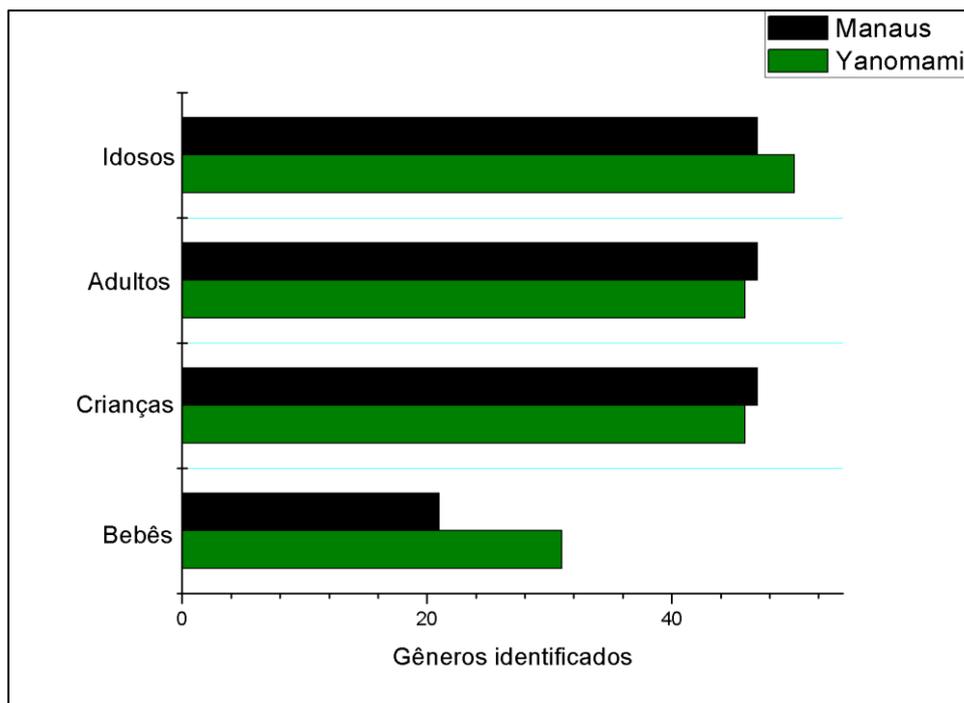


Fig. 6. Comparação do número de gêneros bacterianos identificados entre a população Yanomami e a população de Manaus.

Em relação à composição do microbioma intestinal dos Yanomami, a maior classe pertence ao gênero *Prevotella*. Essas bactérias apresentaram uma abundância maior no microbioma dos Yanomami no total. Mas analisando por grupo de faixa etária, foi verificado que as crianças de Manaus têm uma abundância maior dessas bactérias, sendo uma exceção para este gênero comparando todas as faixas etárias (Fig. 7). Já a população de Manaus apresentou uma grande abundância de *Bacteroides*, enquanto que a população Yanomami tinha níveis baixos do gênero para todas as faixas etárias (Fig. 8).

O segundo gênero mais abundante encontrado no microbioma intestinal dos Yanomami pertence ao gênero *Lactobacillus*. Importante em nosso organismo, esses probióticos estão presentes em todos os indivíduos indígenas e são encontrados em menor número no intestino dos indivíduos de Manaus (Fig. 9), sendo assim essas bactérias benéficas ainda estão presentes no microbioma intestinal destes indígenas.

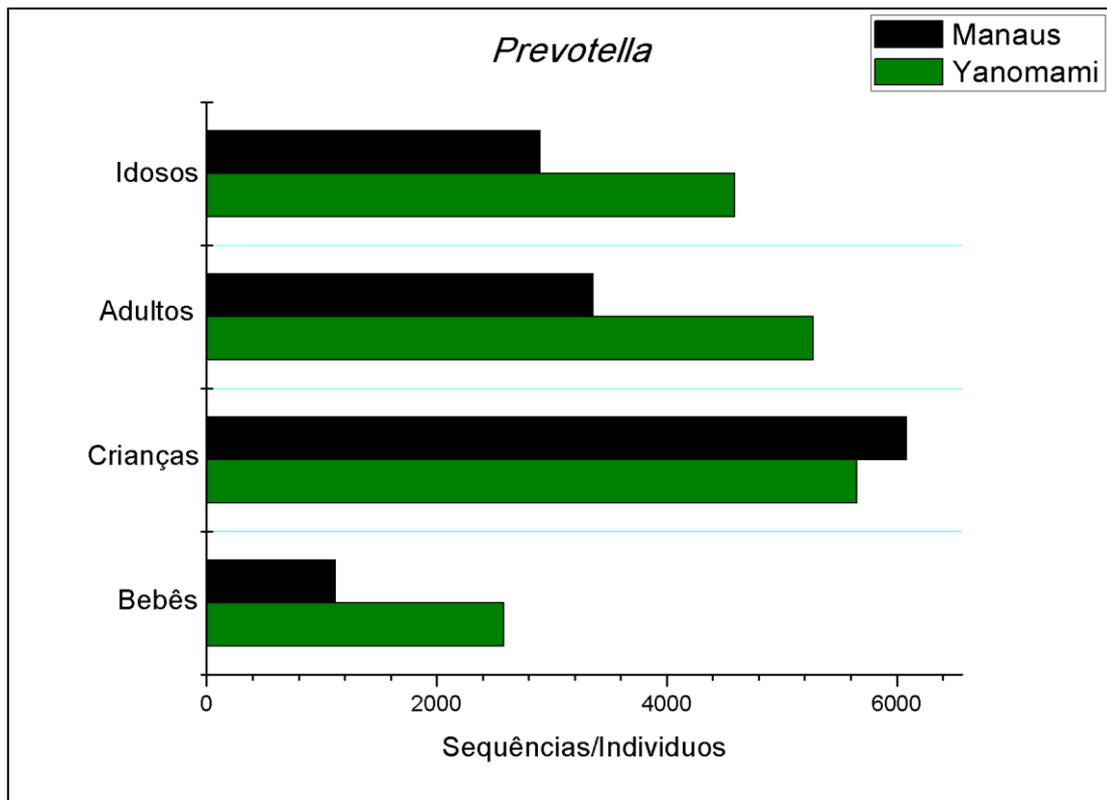


Fig. 7. Abundância de *Prevotella*. Gráfico mostra o número de sequências encontrado nas populações Yanomami e população de Manaus por faixa etária.

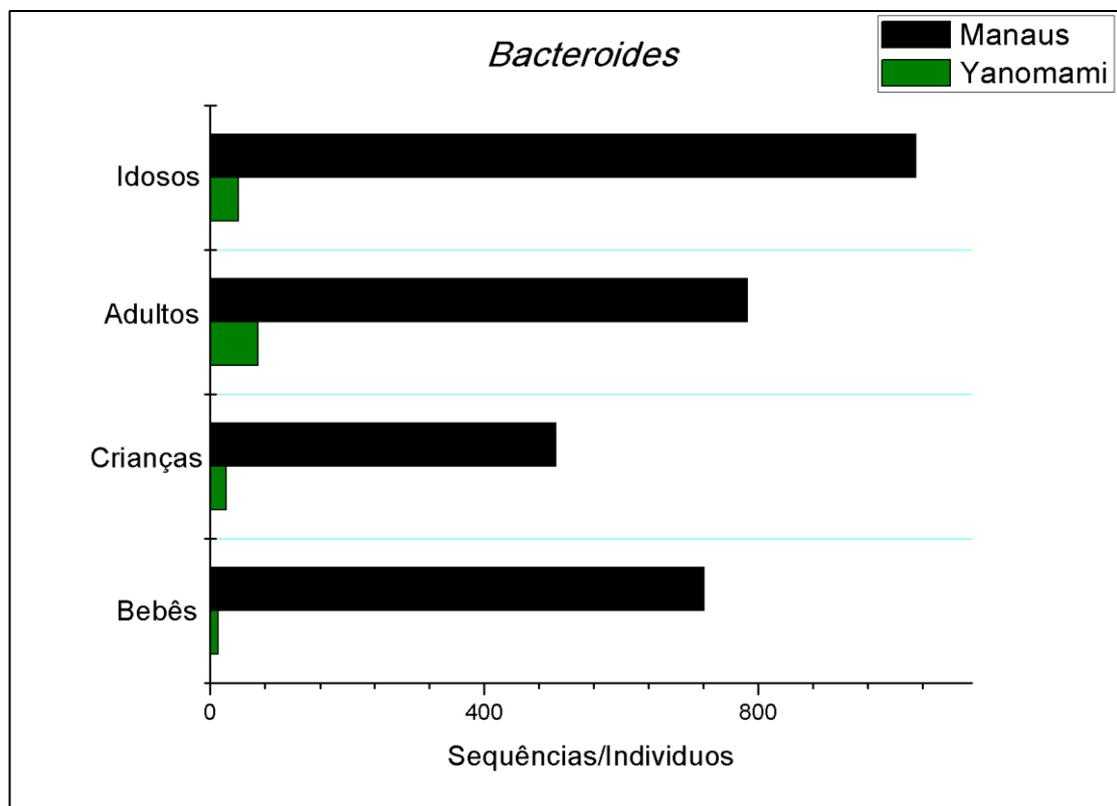


Fig. 8. Abundância de *Bacteroides*. Gráfico mostra o número de sequências encontrado nas populações Yanomami e população de Manaus por faixa etária.

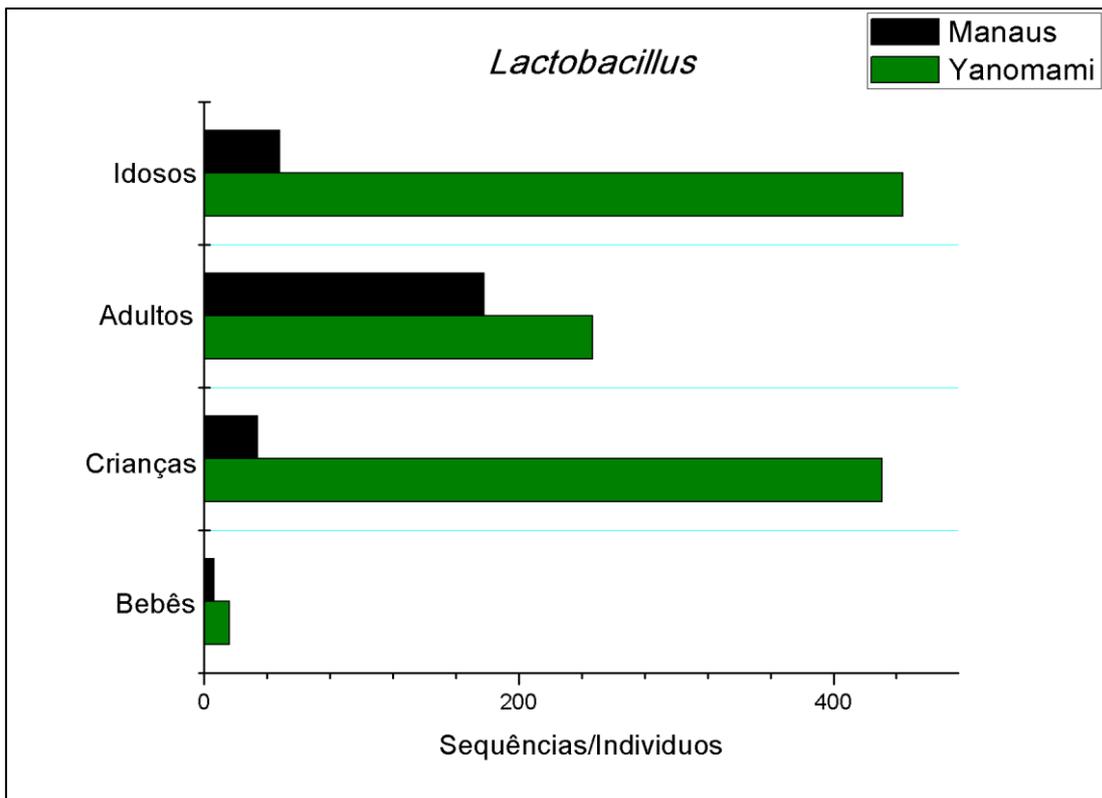


Fig. 9. Abundância de *Lactobacillus* encontradas nos grupos estudados.

Quando comparados os doze gêneros mais abundantes (no mínimo 500 sequências/indivíduo) identificados no microbioma intestinal das duas populações é possível verificar uma pequena diferença entre as duas populações estudadas. Foi verificada uma diferença significativa entre gêneros característicos de populações urbanizadas (por exemplo *Bacteroides*) e populações tradicionais (por exemplo *Lactobacillus*). Também foi verificado uma diferença entre as duas populações para outros gêneros (Fig. 10). Quando analisada a composição dos microbiomas dos Yanomami e indivíduos de Manaus lado a lado, foi verificada uma diferença de abundância relativas de todos os gêneros encontrados (Fig. 11). No teste de análise de componentes principais (PCA) foi confirmada a variância entre os gêneros identificados, e mostrou quais desses gêneros está causando essa variância na composição do microbioma intestinal das duas populações (Fig 12).

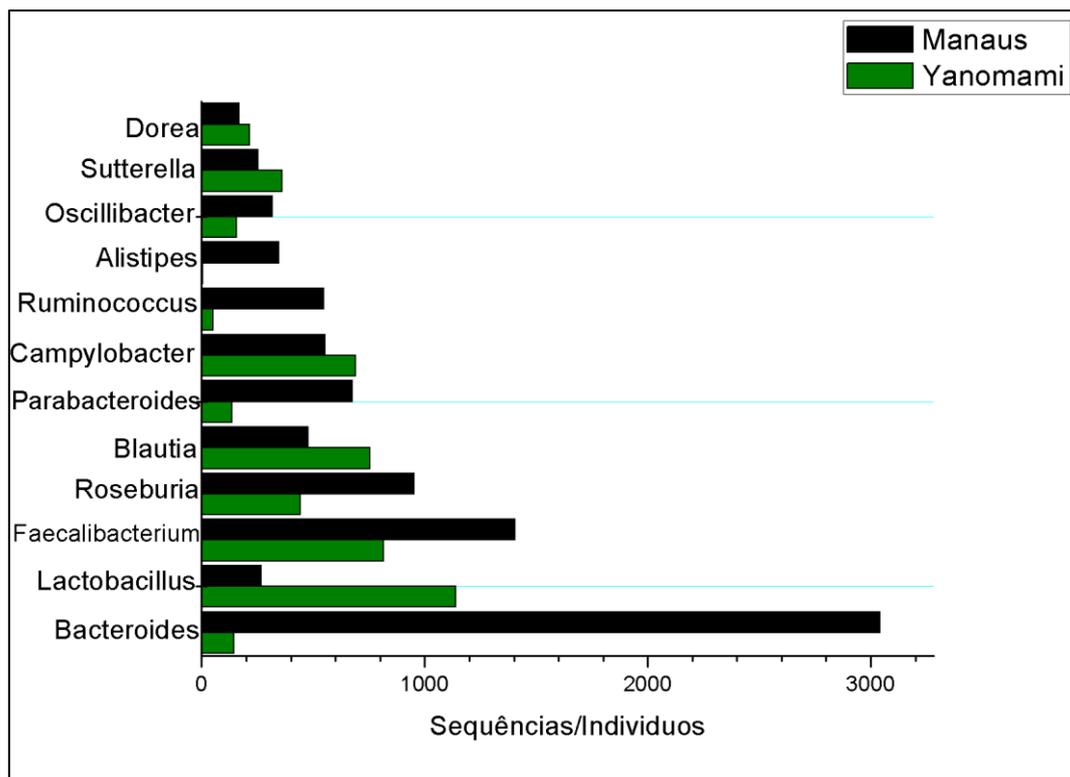


Fig. 10. Abundância dos doze principais gêneros encontrados nos grupos estudados (excluindo *Prevotella*). Diferenças significativas foram encontradas entre os dois grupos experimentais para alguns gêneros.

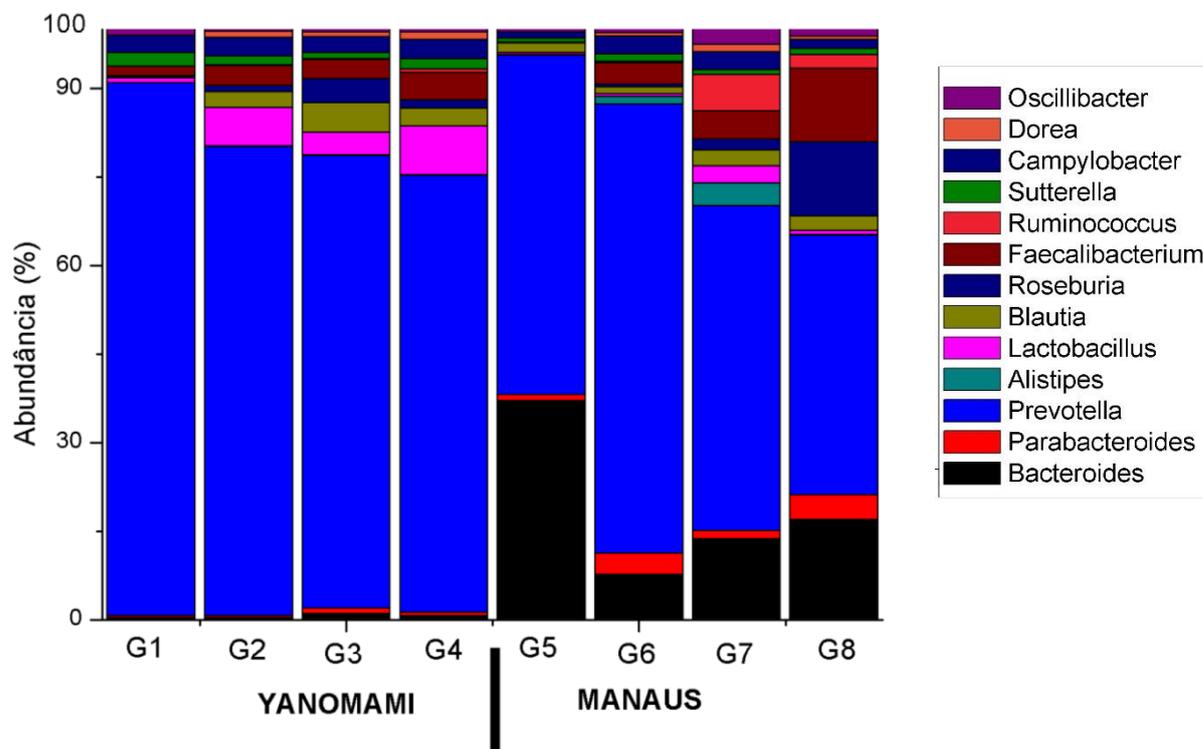


Fig. 11. Abundância relativa de gêneros encontrados nos microbiomas intestinais. População Yanomami: G1 bebês, G2 crianças, G3 adultos e G4 idosos. População de Manaus: G5 bebês, G6 crianças, G7 adultos, G8 idosos.

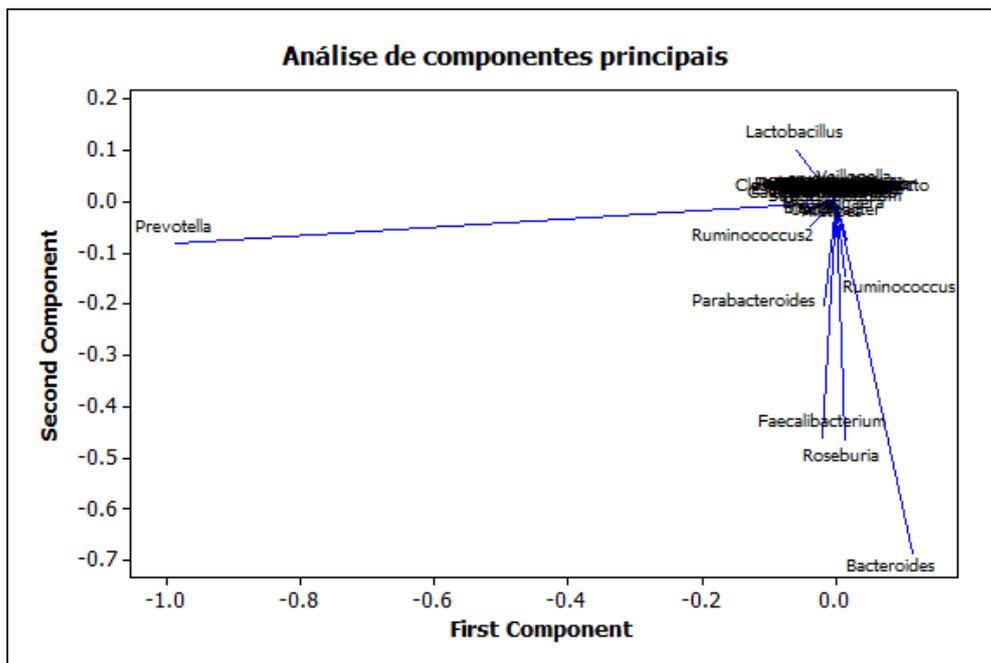


Fig. 12. Análise de componentes principais (PCA) entre todos os gêneros identificados. *Prevotella* e *Bacteroides* são os dois gêneros com maior abundância nos Yanomami e Manaus, respectivamente, são os gêneros que apresentaram uma maior variância nos dados.

Com o intuito de determinar se as composições dos microbiomas intestinais do grupo Yanomami e Manaus eram similares ou não, foi feita uma PCA que mostrou homogeneidade entre os grupos, tanto em termos das OTUs (gêneros) presentes/ausentes entre os grupos (Fig. 13), quanto para a abundância dos mesmos (Fig. 14). Assim, não foi possível separar completamente ou de maneira significativa os grupos baseados nestas variáveis composicionais dos microbiomas. Apesar disso, o microbioma Yanomami se mostra mais homogêneo entre seus membros do que o microbioma de Manaus, cuja variância interna chega a ser a mais alta. Quando realizada a abordagem de análise de similaridade de 99%, baseado em distâncias Euclidianas das abundâncias de OTUs presentes em cada grupo, foi possível separar melhor os Yanomami de Manaus. Apesar disso, a composição do microbioma das crianças (G6) de Manaus ficaram mais similares aos Yanomami do que aos próprios indivíduos de Manaus (Fig. 15).

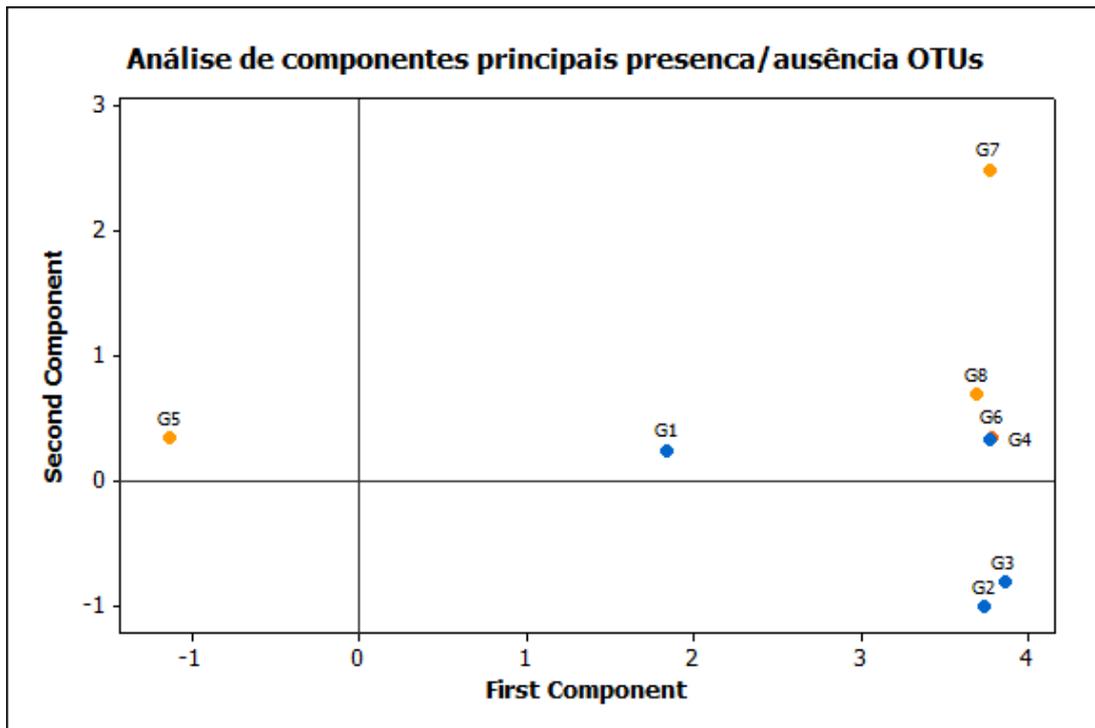


Fig. 13. Análise de componentes principais (PCA) entre os grupos por faixa etária analisando a diferença devido à ausência ou presença de cada OTU nos grupos. População Yamomami: G1 bebês, G2 crianças, G3 adultos e G4 idosos. População de Manaus: G5 bebês, G6 crianças, G7 adultos, G8 idosos.

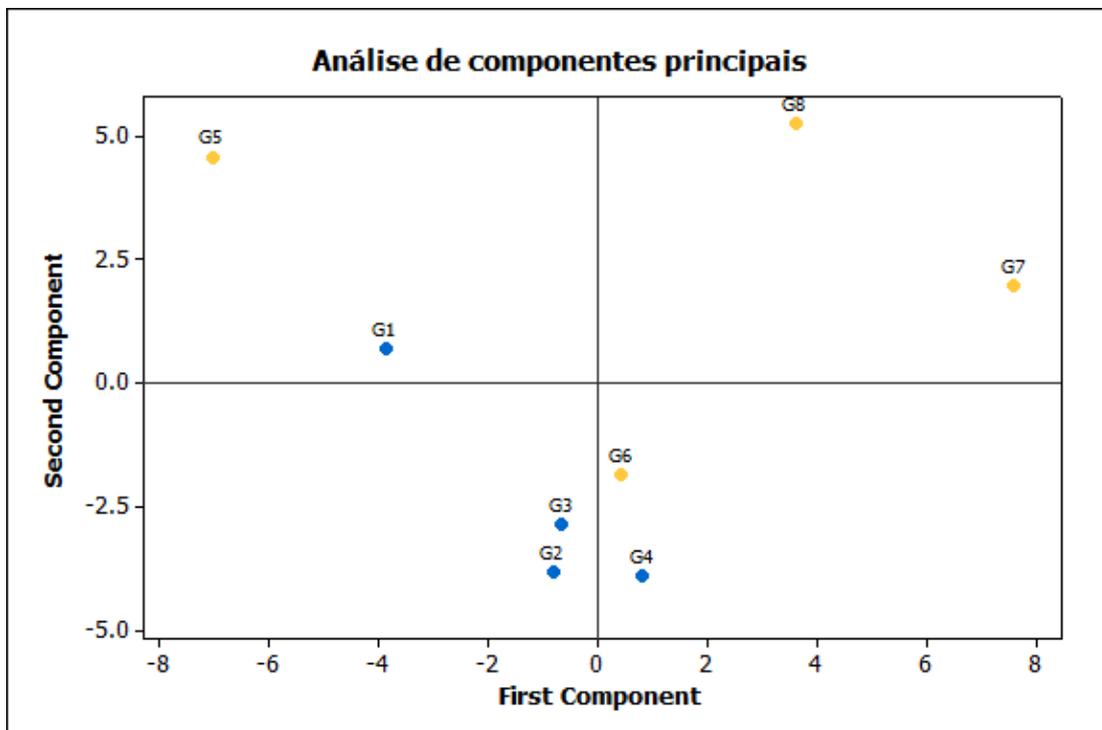


Fig. 14. Análise de componentes principais (PCA) entre os grupos por faixa etária analisando a abundância dos gêneros identificados nos grupos. População Yamomami: G1 bebês, G2 crianças, G3 adultos e G4 idosos. População de Manaus: G5 bebês, G6 crianças, G7 adultos, G8 idosos.

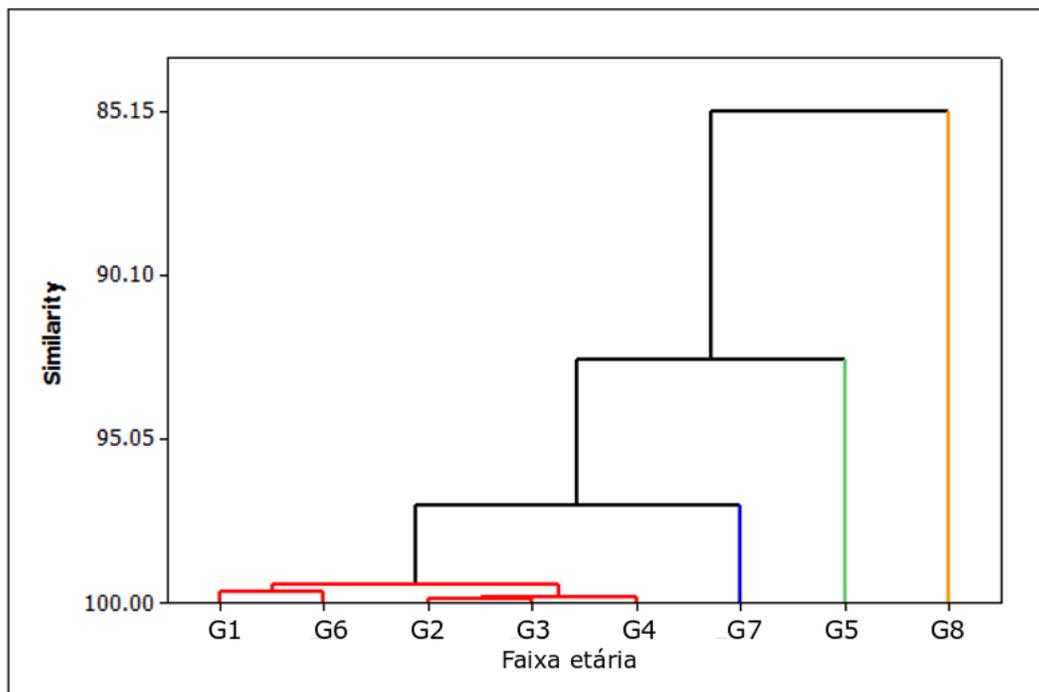


Fig. 15. Dendrograma de similaridade (99%) de microbiomas intestinais entre os grupos de faixa etária para Yanomami e manauaras em termo de abundância de OTUs. População Yamomami: G1 bebês, G2 crianças, G3 adultos e G4 idosos. População de Manaus: G5 bebês, G6 crianças, G7 adultos, G8 idosos.

Já em relação à diversidade bacteriana, os índices de diversidade alfa mostraram um comportamento de tendência similar para as duas populações (Fig. 16), com uma diversidade estatisticamente maior para os Yanomami no índice ace ($T\text{-Value} = 5.86$; $P\text{-Value} = 0.010$). Quando analisada a correlação entre o estilo de vida (tradicional=Yanomami x industrializado=Manaus) e a diversidade bacteriana, os resultados mostraram serem significativos para dita hipótese ($X^2 = 9063.081$, $DF = 3$, $P\text{-Value} = 0.000$), permitindo afirmar que o estilo de vida afeta a diversidade bacteriana.

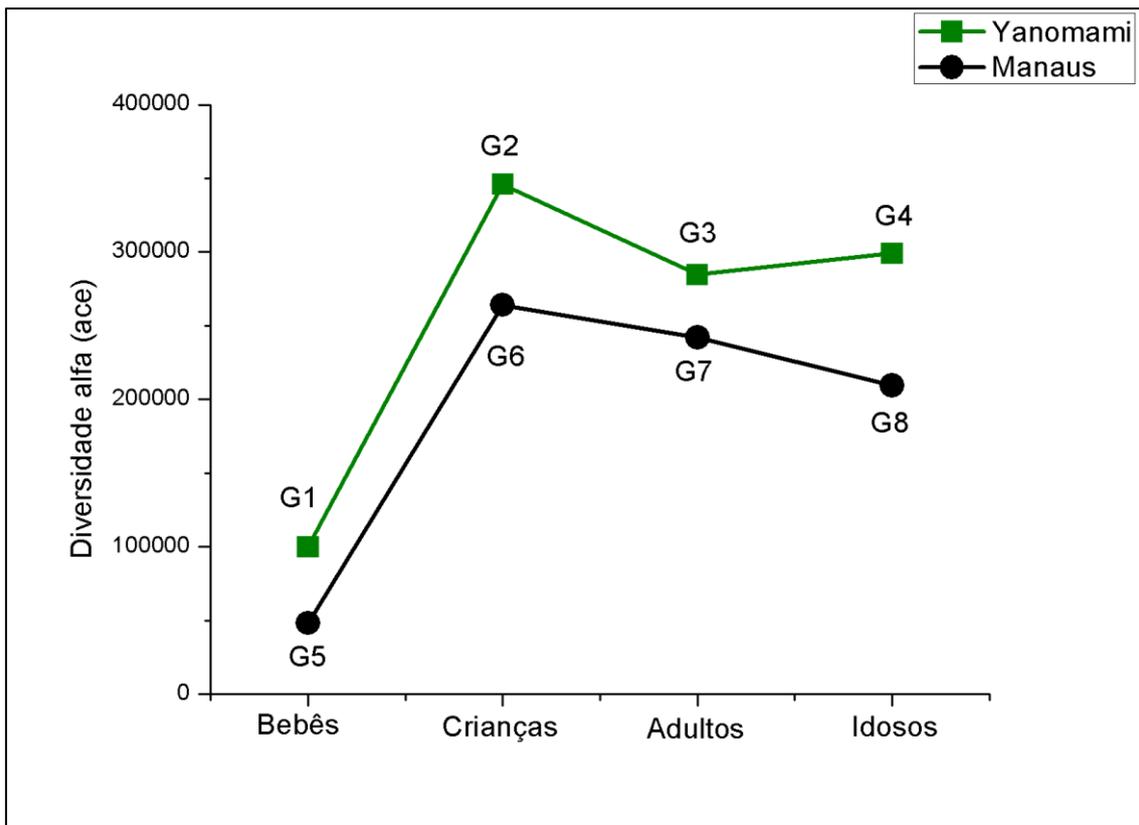


Fig. 16. Índices de diversidade alfa (ace) para as duas populações. Gráfico mostra diferentes índices de diversidade para cada grupo de idade.

DISCUSSÃO

A caracterização do microbioma intestinal da população Yanomami em fase de transição para a urbanização nos traz importantes informações para um maior entendimento sobre os estados ancestrais do microbioma humano. A composição do microbioma na população Yanomami, apesar do seu contato atual com sociedades modernas dentro do estado do Amazonas, ainda apresenta uma diferença importante quando comparada com a população de Manaus, fato que foi observado em diversos estudos onde comparavam populações industrializadas e comunidades tradicionais com contato vigente com a urbanização e seus costumes (MARTÍNEZ et al., 2015; OBREGON-TITO et al., 2015; YATSUNENKO et al., 2012). No entanto, quando comparados a nível de diversidade bacteriana, os Yanomami e os indivíduos de Manaus apresentaram níveis similares de diversidade, diferentemente do que foi encontrado nos mesmos estudos de comunidades tradicionais e populações

industrializadas, visto que essa comunidade Yanomami em fase de transição pode estar cada vez mais próxima das cidades urbanizadas.

O microbioma intestinal dos Yanomami apresentaram uma riqueza no filo Bacteroidetes em relação a Firmicutes. Este perfil de composição dessas bactérias já está presente em muitas populações tradicionais ao redor do mundo, desde os africanos até os povos ameríndios. Os povos africanos e comunidade rurais da América do Sul sempre se mostraram com essa maior abundância de Bacteroidetes pela fonte de alimentação tradicional dessas populações (DE FILIPPO et al., 2010; OBREGON-TITO et al., 2015; SCHNORR et al., 2014). Em nosso estudo, verificamos que os níveis de abundância dessas bactérias para a população Yanomami e a população de Manaus foram bastante similares, visto que a fonte de alimentação das pessoas que vivem na cidade não foi capaz de alterar drasticamente a composição do microbioma intestinal, já que foi possível preservar as bactérias de maior frequência encontrada em nossos antepassados.

Em relação a presença de Firmicutes nos Yanomami foi encontrada uma abundância já esperada para comunidades tradicionais, enquanto que o microbioma intestinal dos indivíduos de Manaus apresentou altos níveis dessas bactérias com o passar dos anos. Isso mostra como o nosso microbioma vai se alterando com o passar do tempo, bebês e crianças de Manaus apresentaram uma abundância similar de Firmicutes em comparação aos indígenas, porém na fase adulta da vida, esses níveis de abundância sobem e inclusive ultrapassam a abundância de Bacteroidetes na população idosa de Manaus. Isso pode ser um indício de como a alimentação estará influenciando na composição do microbioma para Firmicutes, visto que os níveis alteraram dentro da mesma população. Sugerimos que a alimentação na fase adulta dos indivíduos de Manaus possa estar causando essa fase de transição das bactérias, visto que é na fase adulta onde podemos estar ingerindo alimentos ricos em gordura, e essas bactérias são importante para a degradação desse tipo de alimento em nosso microbioma intestinal (CHAKRABORTI, 2015).

O principal gênero bacteriano identificado no microbioma intestinal dos Yanomami foi o gênero *Prevotella*. Este gênero é normalmente encontrado em grande abundância no microbioma intestinal de populações tradicionais que têm uma fonte de alimentação rica em carboidratos, principalmente fibras (CLEMENTE et al., 2015; DE FILIPPO et al., 2010; OBREGON-TITO et al., 2015; SCHNORR et al., 2014), diferentemente da composição encontrada em populações industrializadas que se alimentam de proteínas e gorduras animais, onde são encontrados em sua maioria o gênero *Bacteroides* (CLEMENTE et al., 2015; DE FILIPPO et al., 2010; WU et al., 2011). Em nosso estudo verificamos que a população Yanomami apresentou pouca abundância de *Bacteroides*, mantendo assim as características de um microbioma intestinal de uma comunidade tradicional. Por outro lado, Manaus apresentou uma grande abundância de *Bacteroides*, mas ainda assim foi observado uma maior abundância de *Prevotella*. Neste caso, a população de Manaus está mais próxima da população Yanomami do que qualquer outra população industrializada, comparada por exemplo, com os indígenas da Venezuela já estudados (CLEMENTE et al., 2015; YATSUNENKO et al., 2012). E isso mostra o quanto que as duas populações do presente estudo ainda possam compartilhar semelhanças em seus microbiomas.

O segundo maior gênero encontrado com maior abundância na população Yanomami foi o gênero *Lactobacillus*, presentes em todas as faixas etárias estudadas. Essas bactérias benéficas à saúde humana se mostraram abundantes no microbioma de comunidades tradicionais na África, em uma comunidade do Malawi, onde a maior classe bacteriana encontrada foi dos *Lactobacillus* (Yatsunenko et al., 2012). Essas bactérias têm um grande potencial de trazer benefícios para as comunidades tradicionais, principalmente os Yanomami já que essas bactérias podem ser utilizadas como tratamento e prevenção de diarreias (DI CERBO et al., 2016), tendo assim uma proteção natural em seu microbioma intestinal. *Blautia* é um gênero de bactérias responsável pela degradação de carboidratos complexos, e a sua composição no microbioma intestinal humana está relacionada à ausência de doenças intestinais e diabetes (CHEN et al., 2012; MURRI et al., 2013). Encontrado em

maior abundância nos indígenas, isso mostra um forte indício de que os indivíduos Yanomami não sofram com estes tipos de problemas de saúde.

As análises de PCA para a composição do microbioma intestinal dos indivíduos Yanomami e indivíduos de Manaus mostrou que não existe um agrupamento das bactérias encontradas por localidade, cada grupo por faixa etária é diferente quando comparado com a sua própria população, e nem um agrupamento por faixa etária. Pelo alto número de habitantes de Manaus e também pelos critérios para a seleção dos participantes da pesquisa, essa heterogeneidade dos indivíduos de Manaus já era de certa forma esperada, porém dentro dos povos Yanomami também foi encontrado esse perfil de diferentes componentes das bactérias do microbioma intestinal. Acreditamos que isso pode ser explicado pela forma em que estão organizadas e distribuídas as aldeias Yanomami em pólo-bases. Cada pólo-base possui suas características específicas como fonte de alimentação, formas de contato com população urbanizada, ajuda de missionários, contato com garimpeiros, entre outras coisas que fazem da população Yanomami diversa devido a sua distribuição.

Tanto a população Yanomami quanto a população de Manaus apresentaram em sua composição do microbioma intestinal algumas bactérias exclusivas da localidade. Essas bactérias podem nos dizer que apesar de estarem próximos aos estilos de vida e fonte de alimentação, ainda assim existe uma diferença entre a composição do microbioma intestinal entre essas duas populações. Nos Yanomami foram encontrados seis gêneros exclusivos, e alguns deles, ainda não tinham sido encontrados em estudos anteriores com comunidades tradicionais, como por exemplo as bactérias do gênero *Pluribacter* e *Exiguobacterium*. *Pluribacter* é um gênero relativamente recente, descrito por Brady et al., (2013), pouco se conhece sobre a função dessas bactérias não somente no microbioma, mas também no meio onde são encontradas. *Exiguobacterium* já foram encontradas em ambientes com temperaturas muito baixas, indicando que essas bactérias são termoestáveis. Além disso, já foram estudadas em microbiomas de insetos, plantas e peixes, porém nunca encontradas em microbiomas humanos (SEMOVA et al., 2012;

VISHNIVETSKAYA et al., 2009). Recentemente foi descoberto que *Exiguobacterium* isoladas do microbioma intestinal de larvas da farinha tem uma ação para degradar plástico (YANG et al., 2015), característica interessante dessas bactérias encontradas no microbioma dos Yanomami.

Rhodococcus e *Peptostreptococcus* são outros gêneros também exclusivos da população Yanomami, e assim como os primeiros citados, são poucos os estudos que tenham encontrado essas bactérias em microbioma intestinal de qualquer população no mundo. *Rhodococcus* é uma bactéria que já foi estudada com um poder de catalisação para a degradação de poluentes orgânicos, e são sempre isoladas de ambientes quentes, e estão presentes em locais como solo e água (VAN DER GEIZE e DIJKHUIZEN 2004; WANG et al., 2017). Sendo assim pode ser facilmente encontrada no microbioma intestinal dos Yanomami devido à falta de higienização dos alimentos antes de sua ingestão. As raízes, frutas, folhas e a água utilizadas pelo Yanomami não são tratadas antes do consumo e possivelmente essas bactérias se instalaram no microbioma intestinal desses indígenas. *Peptostreptococcus* é um gênero presente em várias partes do corpo humano, com uma maior abundância na microbiota vaginal de mulheres saudáveis. Essas bactérias encontradas no microbioma intestinal humano geralmente não trazem malefícios ao hospedeiro. Porém em condições de imunidade baixa, *Rhodococcus* e *Peptostreptococcus* podem causar infecções ao hospedeiro, sejam elas respiratórias, oral, abdominal, vaginal, na pele e câncer de cólon (GIGUÈRE et al., 2015; HIBBERD et al., 2017; WEINSTOCK e BROWN, 2002). Pelo que foi registrado no questionário e pelas informações secundárias da CASAI, os Yanomami não apresentaram qualquer tipo de infecções durante a nossa visita, que poderia estar relacionada a esses tipos de bactérias. Logo a presença desses gêneros não acarreta à uma diminuição da saúde dos indígenas e que essas bactérias podem viver no intestino dos Yanomami sem interferir na saúde dos mesmos.

Dois gêneros exclusivos dos Yanomami são compartilhados entre outras populações tradicionais ao redor do mundo, sejam elas ameríndias ou não. *Succinivibrio* e *Treponema* foram encontrados no microbioma intestinal de adultos e idosos indígenas. *Succinivibrio* geralmente está presente de forma

exclusiva no microbioma intestinal de comunidades compostas por caçadores-coletores, já que foram identificadas em populações tradicionais na África (MORTON et al., 2015; SCHNORR et al., 2014) e em duas populações ameríndias no Peru (OBREGON-TITO et al., 2015). *Succinivibrio* é um patógeno oportunista, e segundo Schnorr et al (2014) as populações compostas de caçadores-coletores tendem a ter mais bactérias oportunistas do que outras populações. Isso é um aspecto que pode ser observado nos povos Yanomami no Brasil visto que essas bactérias podem ser introduzidas ao microbioma intestinal humano devido à maneira que a carne de caça é preparada pelos indígenas, sem a preocupação de algum preparo para a higienização ou cozimento da carne antes do consumo. Outro gênero encontrado em comunidades tradicionais também foi encontrado com uma exclusividade para os Yanomami foi *Treponema*. Encontrado em crianças de comunidades tradicionais em Burkina Faso, comunidades de caçadores-coletores na Tanzânia e em ameríndios no Peru e na Venezuela, essas bactérias estão ausentes em populações urbanizadas dos Estados Unidos e em países da Europa (CLEMENTE et al., 2015; DE FILIPPO et al., 2010; GOMEZ et al., 2016; MORTON et al., 2015; OBREGON-TITO et al., 2015; SCHNORR et al., 2014). *Treponema* representa um grupo de bactérias que esteve presente no microbioma intestinal das primeiras civilizações humanas e se manteve até os dias atuais, mesmo com algumas alterações na alimentação e estilo de vida ao longo do tempo. Apesar de algumas espécies serem responsáveis por algumas patologias moderna, as cepas não patogênicas são bastante diferenciadas filogeneticamente e apresentam funções metabólicas importantes para o microbioma de comunidades tradicionais (OBREGON-TITO et al., 2015), importante para a população Yanomami manter essas bactérias em seu microbioma intestinal.

Em comparação com as bactérias encontradas nos Yanomami isolados da Venezuela foi verificado nos dois microbiomas intestinais uma grande abundância de *Prevotella* em relação a *Bacteroides*, e também uma boa frequência de *Succinivibrio* e *Treponema* nos indígenas venezuelanos e também nos brasileiros (CLEMENTE et al., 2015). *Oscillospira* que tem a função de degradação de carboidratos complexos no intestino grosso estavam presentes

em grande abundância no microbioma intestinal dos Yanomami da Venezuela e não foram encontrados nos Yanomami do Brasil (CLEMENTE et al., 2015; LIN et al., 2013). *Oxalobacter formigenes* foi uma das bactérias presentes no microbioma intestinal dos Yanomami venezuelanos com maior importância para a saúde dos indígenas. Com a função de degradação do oxalato de cálcio presente no intestino, elas acabam prevenindo o seu hospedeiro contra a formação de pedras nos rins, formado devido a não degradação do oxalato de cálcio (CLEMENTE et al., 2015; KNIGHT et al., 2013). Nos Yanomami brasileiros essas bactérias já não se mostraram presentes, e uma possibilidade disso é a introdução de antibióticos a essa população, já que alguns antibióticos comumente utilizados são capazes de matar essas bactérias benéficas a saúde humana (LANGE et al., 2012), como por exemplo a Cefalexina, um dos antibióticos utilizados pela CASAI para o tratamento ou prevenção de doenças nos Yanomami.

Em relação as bactérias encontradas apenas no microbioma intestinal dos indivíduos de Manaus, todas apresentam funções metabólicas importante aos hospedeiros. *Mitsuokella* e *Pseudoflavonifractor* estão presentes normalmente no microbioma intestinal e oral de algumas pessoas, são importantes para a produção de butirato, que concede ao hospedeiro alguns efeitos anti-inflamatórios (ORDIZ et al., 2016; POLANSKY et al., 2015). Outras bactérias importantes para o sistema imunológico do hospedeiro pertencem aos gêneros *Turicibacter* e *Megamonas*, responsáveis pela expressão de proteínas que produzem propionato (POLANSKY et al., 2015; ZHONG et al., 2015). *Parasutterella* por sua vez vai expressar ácidos biliares importante para a digestão de algumas proteínas que requerem um maior tempo de digestão pelo trato gastrointestinal (OBERLI et al., 2017).

Os níveis de diversidade alfa mostraram que a população Yanomami possui uma maior diversidade bacteriana que os indivíduos de Manaus em todos os grupos de faixa etária, porém os níveis dos indivíduos de Manaus estão bem próximos aos indígenas. Esses níveis de diversidade confirmam todos os resultados descritos até o momento, que apesar da diferença geográfica e de estilo de vida, a composição do microbioma intestinal dessas duas populações

está ainda próxima uma da outra, seja pelos hábitos e/ou algum tipo de alimentação ancestral mantidos pelos indivíduos de Manaus ou também pela introdução do estilo de vida mais urbanizado aos Yanomami, já que foi verificado essa semelhança entre as duas populações. Já o dendograma de similaridade nos mostrou como podem estar organizados os grupos do presente estudo a partir de níveis de similaridade. A população Yanomami apresentou níveis de similaridade bem próximos entre os grupos de faixa etária e com isso pode se observar um grupo próximo entre eles. Já a heterogeneidade da população de Manaus ficou novamente clara nos índices de similaridade já que os grupos ficaram relativamente distantes, com uma maior diferença para o grupo das crianças de Manaus, já que elas apresentaram uma similaridade bem próxima aos Yanomami.

Em todos os resultados observados na identificação taxonômica e análise da diversidade bacteriana, foi encontrado uma característica semelhante nos dados que pode ter influenciado algumas análises: as crianças de Manaus. Esse grupo foi o que variou na abundância verificada de Bacteroidetes (maior abundância que dos Yanomami) e Firmicutes (menor abundância que dos Yanomami), apresentou o maior nível de *Prevotella* para todos os grupos de faixas etárias estudados, e menor abundância de *Bacteroides* entre os grupos de faixa etária dos indivíduos de Manaus. E por último, na análise de similaridade das OTUs encontradas, apresentou uma similaridade muito próxima aos Yanomami, sendo uma indicação que a composição do microbioma intestinal das crianças de Manaus está bem próximo ao microbioma intestinal dos Yanomami. Sugerimos que os hábitos de higiene das crianças de Manaus possam ser uma explicação para que elas possuam bactérias tão características da população indígena, visto que a partir dos dois anos de idade a criança tende a ser mais independente dos seus pais, e até os dez anos de idade possam ainda descuidar dos hábitos saudáveis de higiene antes da alimentação, o que pode estar fazendo com que abriguem em seus intestinos as bactérias características do estilo de vida dos Yanomami.

Por fim, foi caracterizado aqui o microbioma intestinal dos Yanomami brasileiros e pela primeira vez foi possível observar qual o estado dessa

composição de uma sociedade ameríndia em estado de transição para a urbanização. Foi verificado que apesar de diferenças significativas em relação a taxonomia das bactérias encontradas, e diferentes índices de diversidade bacteriana, a população Yanomami e a população de Manaus estão bem próximas no que diz respeito a composição do microbioma intestinal, seja pela manutenção de alguns hábitos alimentares ancestrais pelos indivíduos de Manaus ou pela introdução de medicamentos e alimentos típicos de cidades urbanizadas, as duas populações parecem estar compartilhando boa parte do seu microbioma intestinal. Até o momento, esse contato dos povos Yanomami com a urbanização já trazem alguns efeitos para os indígenas, como na perda de algumas bactérias importantes. A introdução dos alimentos e do uso de medicamentos da medicina moderna podem estar influenciando na composição do microbioma intestinal desses Yanomami e abre uma discussão de até onde podemos interferir no estilo de vida desses indígenas.

REFERÊNCIAS

BRADY, C.; CLEENWERCK, I.; VENTER, S.; COUTINHO, T.; DE VOS, P. Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, n. 5, p. 309-319, 2013.

CHAKRABORTI, C.K. New-found link between microbiota and obesity. **World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology**, v. 6, n. 4, p. 110-119, 2015.

CHEN, W.; LIU, F.; LING, Z.; TONG, X.; XIANG, C. Human Intestinal Lumen and Mucosa-Associated Microbiota in Patients with Colorectal Cancer. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. e39743, 2012.

CLEMENTE, J. C.; PEHRSSON, E.C.; BLASER, M.J.; SANDHU, K.; GAO, Z.; WANG, B.; MAGRIS, M.; HIDALGO, G.; CONTRERAS, M.; NOYA-ALARCÓN, O.; LANDER, O.; MCDONALD, J.; COX, M.; WALTER, J.; LYN, P.; RUIZ, J.F.;

RODRIGUEZ, S.; SHEN, N.; SONG, S.E.J.; METCALF, J.; KNIGHT, R.; DANTAS, G.; DOMINGUEZ-BELLO, M.G. The microbiome of uncontacted Amerindians. **Science Advances**, v. 1, n. 3, p. 1-12, 2015.

CONSORTIUM. A framework for human microbiome research. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 215–221, 2012.

DE FILIPPO, C.; CAVALIERI, D.; DI PAOLA, M.; RAMAZZOTTI, M.; POULLET, J.B.; MASSART, S.; COLLINI, S.; PIERACCINI, G.; LIONETTI, P. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 33, p. 14691–6, 2010.

DI CERBO, A.; PALMIERI, B.; APONTE, M.; MORALES-MEDINA, J.C.; IANNITTI, T. Mechanisms and therapeutic effectiveness of lactobacilli. **Journal of Clinical Pathology**, v. 69, n. 3, p. 187-203, 2016.

GIGUÈRE, S.; BERGHAUS, L.J.; LEE, E.A. Activity of 10 antimicrobial agents against intracellular *Rhodococcus equi*. **Veterinary Microbiology**, v. 178, p. 275-278, 2015.

GIONGO, A.; GANO, K.A.; CRABB, D.B.; MUKHERJEE, N.; NOVELO, L.L.; CASELLA, G.; DREW, J.C.; ILONEN, J.; KNIP, M.; HYÖTY, H.; VEIJOLA, R.; SIMELL, T.; SIMELL, O.; NEU, J.; WASSERFALL, C.H.; SCHATZ, D.; ATKINSON, M.A.; TRIPLETT, E.W. Toward defining the autoimmune microbiome for type 1 diabetes. **The ISME journal**, v. 5, n. 1, p. 82–91, 2011.

GIRARD, C.; Tromas, N.; Amyot, A.; Shapiro, J.B. Gut microbiome of the canadian arctic inuit. **American Society for Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 1-14, 2017.

GOMEZ, A.; PETRZELKOVA, K.J.; BURNS, M.B.; WHITE, B.A.; LEIGH, S.R.; BLEKHMANN, R. Gut microbiome of coexisting BaAka pygmies and bantu reflects gradients of traditional subsistence patterns. **Cell Reports**, v. 8, n. 14, p. 2142-2153, 2016.

HIBBERD, A.A.; LYRA, A.; OUWEHAND, A.C.; ROLNY, P.; LINDEGREN, H.; CEDGÅRD, L.; WETTERGREN, Y. Intestinal microbiota is altered in patients with colon cancer and modified by probiotic intervention. **BMJ Open Gastroenterology**, v. 3, n. 4, p. e000145, 2017.

KNIGHT, J.; DEORA, R.; ASSIMOS, D.G.; HOLMES, R.P. The genetic composition of *Oxalobacter formigenes* and its relationship to colonization and calcium oxalate stone disease. **Urolithiasis**, v. 41, n. 3, p. 187-196, 2013.

LANGE, J.N.; WOOD, K.D.; WONG, H.; OTTO, R.; MUFARRIJ, P.W.; KNIGHT, J.; AKPINAR, H.; HOLMES, R.P.; ASSIMOS, D.G. Sensitivity of human strains of *Oxalobacter formigenes* to commonly prescribed antibiotics. **Urology**, v. 79, n. 6, p. 1286-1289, 2012.

LIN, A.; BIK, E.M.; COSTELLO, E.K.; DETHLEFSEN, L.; HAQUE, R.; RELMAN, D.A.; SINGH, U. Distinct Distal Gut Microbiome Diversity and Composition in Healthy Children from Bangladesh and the United States. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e53838, 2013.

MARTÍNEZ, I.; STEGEN, J.; MALDONADO-GÓMEZ, M.X.; EREN A.M.; SIBA, P.M.; GREENHILL, A.R.; WALTER, J. The Gut Microbiota of Rural Papua New Guineans: Composition, Diversity Patterns, and Ecological Processes. **Cell Reports**, v. 11, n. 4, p. 527–538, 2015.

MORTON, E.R.; LYNCH, J.; FROMENT, A.; LAFOSSE, S.; HEYER, E.; PRZEWORSKI, M.; BLEKHMANN, R.; SÉGUREL, L. Variation in Rural African Gut Microbiota Is Strongly Correlated with Colonization by *Entamoeba* and Subsistence. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 11, p. e1005658, 2015.

MURRI, M.; LEIVA, I.; GOMEZ-ZUMAQUERO, J.M.; TINAHONES, F.J.; CARDONA, F.; SORIGUER, F.; QUEIPO-ORTUÑO, M.I. Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case-control study. **BMC Medicine**, v. 11, n. 46, p. 1-12, 2013.

OBERLI, M.; DOUARD, V.; BEAUMONT, M.; JAOUI, D.; DEVIME, F.; LAURENT, S.; CHAUMONTET, C.; MAT, D.; FEUNTEUN, S.L.; MICHON, C.; DAVILA, A.M.; FROMENTIN, G.; TOMÉ, D.; SOUCHON, I.; LECLERC, M.; GAUDICHON, C.; BLACHIER, F. Lipo-Protein Emulsion Structure in the Diet Affects Protein Digestion Kinetics, Intestinal Mucosa Parameters and Microbiota Composition. **Molecular Nutrition & Food Research**, 2017.

OBREGON-TITO, A. J.; TITO, R.Y.; METCALF, J.; SANKARANARAYANAN, K.; CLEMENTE, J.C.; URSELL, L.K.; XU, Z.Z.; TREUREN, W.V.; KNIGHT, R.; GAFFNEY, P.M.; SPICER, P.; LAWSON, P.; MARIN-REYES, L.; TRUJILLO-VILLARROEL, O.; FOSTER, M.; GUIJA-POMA, E.; TRONCOSO-CORZO, L.; WARINNER, C.; OZGA, A.T.; LEWIS, C.M. Subsistence strategies in traditional societies distinguish gut microbiomes. **Nature communications**, v. 6, p. 6505, 2015.

ORDIZ, M.I.; STEPHENSON, K.; AGAPOVA, S.; WYLIE, K.M.; MALETA, K.; MARTIN, J.; TREHAN, I.; TARR, P.I.; MANARY, M.J. Environmental Enteric Dysfunction and the Fecal Microbiota in Malawian Children. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 2, p. 473-476, 2016.

POLANSKY, O.; SEKELOVA, Z.; FALDYNOVA, M.; SEBKOVA, A.; SISAK, F.; RYCHLIK, I. Important metabolic pathways and biological processes expressed by chicken cecal microbiota. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 5, p. 1569-1576, 2015.

SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S.L.; RYABIN, T.; HALL, J.R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E.B.; LESNIEWSKI, R.A. et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537–7541, 2009.

SCHNORR, S. L.; CANDELA, M.; RAMPELLI, S.; CENTANNI, M.; CONSOLANDI, C.; BASAGLIA, G.; TURRONI, BIAGI, E.; PEANO, C.; SEVERGNINI, M.; FIORI, J.; GOTTI, R.; BELLIS, G.; LUISELLI, D.; BRIGIDI, P.B.; MABULLA, A.; MARLOWE, F.; HENRY, A.G.; CRITTENDEN, A.N. Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. **Nature communications**, v. 5, p. 3654, 2014.

SEMOVA, I.; CARTEN, J.D.; STOMBAUGH, J.; MACKEY, L.C.; KNIGHT, R.; FARBER, S.A.; RAWLS, J.F. Microbiota regulate intestinal absorption and metabolism of fatty acids in the zebrafish. **Cell & Host Microbe**, v. 12, n. 3, p. 277-288, 2012.

SMITS, S.A.; LEACH J.; SONNENBURG, E.D.; GONZALEZ, C.G.; LICHTMAN, J.S.; REID, G.; KNIGHT, R.; MANJURANO, A.; CHANGALUCHA, J.; ELIAS, J.E.; DOMINGUEZ-BELLO, M.G.; SONNENBURG, J.L. Seasonal cycling in the gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers of Tanzania. **Science**, v. 357, p. 802-806, 2017.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA. **Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML) : coleta e preparo da amostra biológica**. Barueri, São Paulo: Minha Editora, 2014.

VAN DER GEIZE, R.; DIJKHUIZEN, L. Harnessing the catabolic diversity of rhodococci for environmental and biotechnological applications. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 255-261, 2004.

VISHNIVETSKAYA, T.A.; KATHARIOU, S.; TIEDJE, J.M. The *Exiguobacterium* genus: biodiversity and biogeography. **Extremophiles**, v. 13, n. 3, p. 541-555, 2009.

WANG, H.; HU, J.; XU, K.; TANG, X.; XU, X.; SHEN, C. Biodegradation and chemotaxis of polychlorinated biphenyls, biphenyls, and their metabolites by *Rhodococcus* spp. **Biodegradation**, 2017.

WEINSTOCK, D.M.; BROWN, A.E. *Rhodococcus equi*: An Emerging Pathogen. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, p. 1379–1385, 2002.

WU, G.D.; CHEN, J.; HOFFMANN, C.; BITTINGER, K.; CHEN, Y.; KEILBAUGH, S.A.; BEWTRA, M.; KNIGHTS, D.; WALTERS, W.A.; KNIGHT, R.; SINHA, R.; GILROY, E.; GUPTA, K.; BALDASSANO, R.; NESSEL, L.; LI, H.; BUSHMAN, F.D.; LEWIS, J.D. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. **Science**, v. 334, p. 105-108, 2011.

YANG, Y.; YANG, J.; WU, W.M.; ZHAO, J.; SONG, Y.; GAO, L.; YANG, R.; JIANG, L. Biodegradation and Mineralization of Polystyrene by Plastic-Eating Mealworms. 2. Role of Gut Microorganisms. **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 20, p. 12087-12093, 2015.

YATSUNENKO, T.; REY, F.E.; MANARY, M.J.; TREHAN, I.; DOMINGUEZ-

BELLO, M.G.; CONTRERAS, M.; MAGRIS, M.; HIDALGO, G.; BALDASSANO, R.N.; ANOKHIN, A.P.; HEATH, S.C.; WARNER, B.; REEDER, J.; KUCZYNSKI, J.; CAPORASO, J.G.; LOZUPONE, C.A.; LAUBER, C.; CLEMENTE, J.C.; KNIGHTS, D.; KNIGHT, R.; GORDON, J.I. Human gut microbiome viewed across age and geography. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 222–227, 2012.

ZHONG, Y.; NYMAN, M.; FÅK, F. Modulation of gut microbiota in rats fed high-fat diets by processing whole-grain barley to barley malt. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 59, n. 10, p. 2066-2076, 2015.

CAPÍTULO II

Resistência de *Escherichia coli* isolada do microbioma intestinal dos Yanomami na Amazônia brasileira

Resistência de *Escherichia coli* isolada do microbioma intestinal dos Yanomami na Amazônia brasileira

Alencar, R.M.¹; Martínez, J.G.^{1,2}; Fantin, C.¹

¹ Grupo de pesquisa em Genética Molecular e Citogenética, Laboratório de Genômica e Proteômica, Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Avenida Carvalho Leal 1777 - Cachoeirinha, Manaus, Brasil.

² Laboratório de Evolução e Genética Animal, Departamento de Genética, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Av. Gal. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, Setor Sul, Coroado I, Manaus, Brasil.

Resumo

Os Yanomami representam uma etnia importante na região amazônica brasileira, que se encontra em estado de transição para a urbanização. Essas comunidades recebem auxílio do governo no que diz respeito a saúde, porém sofrem com casos de diarreias, causadas principalmente por *Escherichia coli*. O objetivo desta pesquisa foi verificar o perfil de resistência de *E. coli* contra os antibióticos mais utilizados pela medicina. As bactérias foram isoladas diretamente das fezes dos Yanomami e também de indivíduos de Manaus para uma comparação. Foi feita uma análise molecular para a confirmação de *E. coli* através de sequenciamento da região V1-V2 do gene 16S do rRNA e em seguida um antibiograma utilizando Ampicilina, Penicilina, Ciprofloxacina, Cefalexina, Canamicina, Gentamicina e Tetraciclina. As *E. coli* dos dois grupos mostraram um compartilhamento entre as duas populações, porém nos resultados do antibiograma foram encontrados altos níveis de resistência por parte das bactérias dos Yanomami. Apenas Gentamicina foi capaz de inibir o crescimento das bactérias de todos os indivíduos Yanomami. Diferentemente das bactérias dos indivíduos de Manaus, que apresentaram um perfil de sensibilidade para seis dos sete antibióticos testados. Esse perfil de resistência aos antibióticos já foi encontrado em microbioma de populações remotas na Amazônia, sendo importante um acompanhamento mais próximo das equipes responsáveis pela saúde dos Yanomami.

Palavras chave: *Escherichia coli*, Resistência aos antibióticos, Yanomami.

INTRODUÇÃO

Em nosso microbioma intestinal algumas bactérias fazem parte da composição sem nenhum malefício a saúde, mas algumas dessas bactérias presentes em nosso intestino tendem a causar problemas de saúde, principalmente diarreias, e podem causar um alto índice de mortalidade, como no caso de infecção causada por *Escherichia coli* (ADUGNA et al., 2015). A maior causa de infecções por essa bactéria é a ingestão de água e alimentos contaminados (GUIMARÃES et al., 2012). Em caso de tratamento contra infecções causadas por *E. coli* são utilizados uma grande variedade de antibióticos. A utilização desses antibióticos pode causar bactérias resistentes aos antibióticos, uma preocupação em todo o mundo, as chamadas superbactérias (KIM et al., 2015; MARTINS et al., 2015). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), muitas dessas bactérias são conhecidas por causar infecções intestinais e diarreias, já que as bactérias da família *Enterobacteriaceae* são aquelas que tem um grau crítico de resistência aos antibióticos (OMS, 2017).

A resistência adquirida por *E. coli* no trato intestinal é alvo de preocupação devido a vários mecanismos que a bactéria utiliza para resistir, devido principalmente à utilização destes medicamentos por seus hospedeiros (SZMOLKA e NAGY 2013). Em se tratando de comunidades tradicionais ameríndias, a contaminação por *E. coli* é muito propícia a essas comunidades visto que a forma de alimentação tradicional, sem nenhuma higienização dos folhas e frutos, carne sem cozimento, bebidas mal fermentadas e principalmente, por não terem uma fonte de água tratada, eles estão vulneráveis a uma contaminação por essa bactéria, causando na maioria das vezes diarreias nos membros de suas comunidades (FREITAS, 2008). Já que esses indígenas não tem um contato muito recente com os antibióticos, uma utilização descontrolada para o tratamento de diarreias e outras infecções podem causar um problema mais grave para esses indivíduos, justamente pela capacidade de resistência aos antibióticos por parte de *E. coli*.

Devido a esta situação, realizar um teste de susceptibilidade aos antibióticos com os agentes patógenos a saúde humana é de grande interesse para a saúde pública. O objetivo do nosso trabalho foi analisar o perfil de sensibilidade de *E. coli* de três indivíduos Yanomami e comparar com perfil de sensibilidade de *E. coli* de três indivíduos de Manaus, esperando que os resultados possam ser relevantes aos órgãos que são responsáveis pela saúde desses indígenas.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras

Para a obtenção das amostras todos os aspectos éticos e procedimentos para a coleta das fezes pelos participantes Yanomami e participantes da cidade de Manaus-AM foram descritos no Capítulo I. No entanto, foram utilizadas apenas três amostras de cada população, um bebê de até dois meses, um adulto de 20 a 25 anos, e um idoso de 50 a 55 anos, no intuito de verificar o perfil de sensibilidade de *E. coli* a alguns antibióticos.

Isolamento de Escherichia coli

O isolamento de *E. coli* foi realizado segundo a metodologia descrita por Nascimento & Van Der Sand (2007), com modificações. As amostras fecais foram diluídas em solução salina a 0,85%, e cultivadas em meio caldo de triptona de soja (TSB) sendo incubadas a 37°C durante 48 horas. Em seguida foi feita uma diluição seriada (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}) do meio contendo as bactérias cultivadas e semeadas em meio eosina azul de metileno (EMB) nas cinco diluições diferentes, e incubadas a 37°C durante 48 horas para a visualização do crescimento das colônias. Em seguida, as bactérias foram preservadas em glicerol 20 % a -20°C.

Identificação molecular

Para a confirmação das linhagens de *E. coli*, foi realizada uma identificação molecular das colônias utilizadas no teste. A extração de DNA foi realizada pelo protocolo de Doyle e Doyle (1987) com algumas modificações. Ao

final da extração as amostras foram coradas com Gel Red, submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1% e a integridade do DNA foi visualizadas em transluminador UV. Em seguida foi realizada a PCR da região variável V1-V2 do gene 16S do rRNA, utilizando os *primers* bacterianos 27F (V1 *primer forward*) (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 338R (V2 *primer reverse*) (5'-TGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'). Para a reação da PCR foi utilizado o seguinte protocolo: 0,2U de Taq DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific), tampão da Taq DNA polimerase 1X (Thermo Fisher Scientific), MgCl₂ 1,5 mM (Invitrogen), 5 pmol do *primer forward* contendo os adaptadores "A", 5 pmol do *primer reverse* contendo os adaptadores "P₁", dNTPs 0,2 mM (Invitrogen), 2 µL de DNA (~25ng/µL), e 18,4 µL de água ultra pura para completar um volume final da reação de 30 µL. As amostras foram levadas para o termociclador automático e o perfil da PCR foi o seguinte: desnaturação inicial a 95°C por 30 segundos; 36 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento dos *primers* a 64°C por 15 segundos, e extensão a 72°C por 15 segundos; e uma extensão final a 72°C por cinco minutos. Ao final da PCR, 2 µL do produto da PCR foram corados com 2 µL de Gel Red, e aplicados em gel de agarose a 1%, submetidas a eletroforese e visualizados em transluminador UV para confirmação da amplificação.

Os produtos de PCR foram purificados com as enzimas EXOSAP (Enzimas Exonuclease e Shrimp Phosphatase Alcaline) e em seguida sequenciados utilizando o kit BigDye (Applied Biosystems) com o seguinte protocolo: 2 µL de cada produto de PCR, 4,4 µL de água, 1,3 µL de tampão, 2,0 µL do *primer reverse* 338R e 0,3 µL de BigDye. A ciclagem para reação de sequenciamento foi realizada da seguinte maneira: 96°C por um minuto; 15 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por um minuto e 15 segundos; 5 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por um minuto e 30 segundos; 5 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por dois minutos. Os produtos da reação de sequenciamento foram precipitados utilizando 2,5 µL de EDTA (125mM) e 30 µL Álcool 100% por amostra. Após centrifugação foi adicionado 30 µL Álcool 70% e as amostras foram novamente centrifugadas para uma melhor precipitação. Com a placa totalmente seca foi adicionado 10 µL de Hi-Di formamida e as amostras foram

eletro-injetadas no sequenciador automático ABI 3130xl DNA Analysis System (Applied Biosystems).

A análise dos dados foi realizada inicialmente no software BioEdit 7.2.5 (HALL, 1999), com as sequências comparadas na ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Após as análises das sequências foram utilizados os programas MEGA e Treefinder para os testes de Neighbor Joining e de ancestralidade.

Teste de sensibilidade aos antibióticos

A susceptibilidade aos antibióticos foi evidenciada pelo teste de difusão de disco em placa com meio Agar Mueller-Hinton, segundo Guimarães et al, (2012). As bactérias preservadas em glicerol foram reativadas em meio líquido TSB, e o crescimento das colônias foi durante 24 horas em 37°C, em *shaker* com agitação de 150 rpm. Em seguida as culturas bacterianas foram inoculadas em solução salina a 0,85%, até atingirem uma turbidez de 0,5 na escala de McFarland, correspondendo a $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC)/mL.

Com o auxílio de um *swab* estéril, a cultura bacteriana foi semeada em placa de Petri, com o meio ágar Mueller-Hinton, espalhada na superfície de um extremo ao outro da placa de maneira uniforme. Após o esfregaço e a total secagem da cultura, os discos de sensibilidade antibiótica foram inseridos com o auxílio de uma pinça estéril, e foram aplicados três discos em cada placa, com um espaço de 3 cm de distância entre eles. As placas foram incubadas a 37°C durante 18 horas para a interpretação dos resultados.

Escherichia coli (ATCC® 25922™) foi utilizada como controle de qualidade no teste. Para a sensibilidade das bactérias foram testados sete antibióticos: Ampicilina (10 µg), Penicilina (10 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Cefalexina (30 µg), Canamicina (10 µg), Gentamicina (10 µg) e Tetraciclina (30 µg). O diâmetro dos halos de inibição do crescimento foi medido em milímetros com o auxílio de paquímetro digital e os antibiogramas interpretados de acordo às recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI*,

sugerido pela ANVISA, OPAS/OMS. As bactérias foram então classificadas em resistentes, intermediárias ou sensíveis de acordo com o tamanho do halo de inibição para cada antibiótico. O teste foi feito em sistema de duplicata, em diferentes momentos no Laboratório de Microbiologia da Escola Superior de Ciências da Saúde, da Universidade do Estado do Amazonas e no Laboratório de Microbiologia Aplicada na Escola Superior de Tecnologia, da Universidade do Estado do Amazonas.

RESULTADOS

Identificação molecular

Nós obtivemos um total de 18 sequências de igual número de colônias analisadas, sendo cada uma de 305 pares de base correspondentes as regiões V1-V2 do gene 16S do rRNA (removendo as sequências dos *primers* e barcode) e as sequências foram individualmente comparadas na ferramenta BLAST. As sequências de 16S rRNA do nosso banco de dados (Yanomami e Manaus) mostraram uma identidade nucleotídica de 99% até 100% (E-value $7e-156$), superando em todos os casos o limite inferior (97%) a partir do qual uma sequência de 16S rRNA é considerada como pertencente à espécie bacteriana *E. coli*. Desta maneira, foi concluído que todas as bactérias isoladas correspondiam a *E. coli*. Em relação à análise de Neighbor Joining (Fig. 1), foi possível observar três clusters genéticos (baseados no critério de distância genética de zero), sendo que um deles (cluster 3) evidenciou o compartilhamento de uma mesma linhagem entre indivíduos Yanomami e indivíduos de Manaus. As linhagens restantes não são compartilhadas entre as duas sociedades. As relações de ancestralidade por análise de Máxima Verossimilhança (Fig. 2) demonstraram três direções de transmissão de *E. coli* entre os dois tipos de sociedades em momentos diferentes da história.

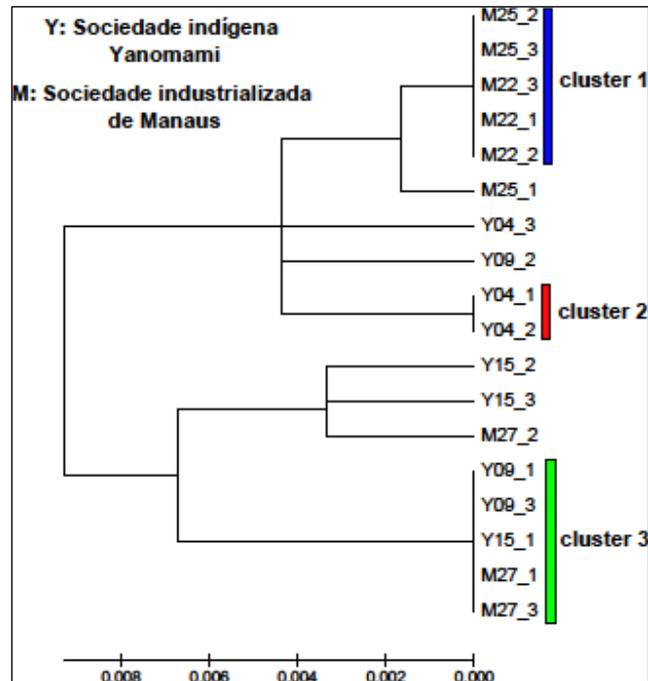


Fig. 1. Análises de Neighbor Joining. Colônias de *E. coli* de origem fecal em indivíduos da etnia Yanomami (Y) e de ambientes industrializados da área de Manaus (M).

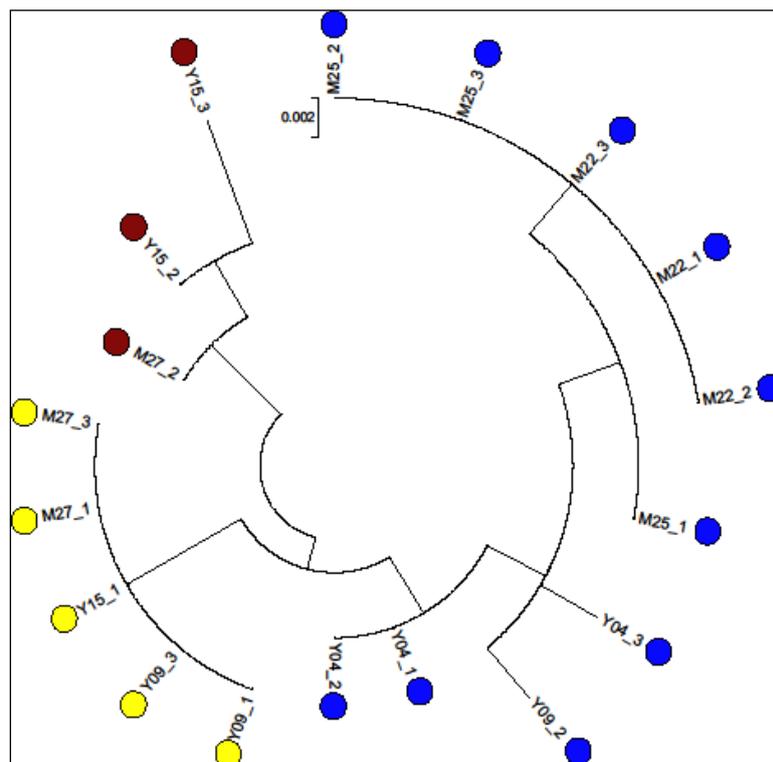


Fig. 2. Relações de ancestralidade para a determinação de padrões de dispersão de *E. coli* por análise de Máxima Verossimilhança de colônias de origem fecal em indivíduos da etnia Yanomami (Y) e de indivíduos de ambientes industrializados da área de Manaus (M). Cada cor indica um padrão de dispersão de *E. coli* diferente entre as duas populações humanas.

A primeira (Marrom) sugere um padrão de dispersão de *E. coli* da sociedade industrializada (Manaus) para os Yanomami no passado recente, mas não na atualidade. A segunda (Azul) sugere que a direção da dispersão foi dos Yanomami para a sociedade industrializada, também em um passado recente. Assim, aparentemente, uma linhagem bacteriana dos Yanomami se torna no ancestral de origem comum para a maior parte das linhagens atuais de *E. coli* na amostra de indivíduos de Manaus. O terceiro padrão (amarelo) mostra o compartilhamento de uma única linhagem de *E. coli* por indivíduos de ambas as sociedades, sugerindo que uma dispersão atual de *E. coli* aconteceu entre Yanomami e a população industrializada de Manaus.

Sensibilidade aos antibióticos

Foi verificado que o perfil de susceptibilidade de *E. coli* dos Yanomami foi surpreendentemente baixo, em relação não somente ao controle de qualidade (ATCC® 25922™), como também quando comparado com o perfil das bactérias dos indivíduos de Manaus (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem de resistência de *Escherichia coli* aos antibióticos

Antibiótico	ATCC 25922	YANOMAMI	MANAUS
Ampicilina	100%	100%	33%
Penicilina	100%	100%	0%
Ciprofloxacina	0%	33%	0%
Cefalexina	0%	100%	0%
Canamicina	0%	0%	0%
Gentamicina	0%	0%	0%
Tetraciclina	0%	67%	0%

Os indivíduos de Manaus apresentaram bactérias sensíveis a todos os antibióticos testados, diferentemente das bactérias dos Yanomami que têm um perfil de resistência a seis dos antibióticos utilizados no teste, sendo sensível para todas as bactérias dos três indivíduos apenas para Gentamicina (Fig. 3). Esses resultados mostram que apesar do pouco contato com esses medicamentos, as bactérias conseguiram por alguma razão adquirir os genes

responsáveis pela resistência a esses antibióticos mais comumente utilizados na medicina. Os resultados para Cefalexina mostraram que esse é o antibiótico mais resistente por parte das bactérias presentes no microbioma intestinal dos indígenas, já que todas as três faixas etárias apresentaram resistência a este antibiótico (Fig. 4).

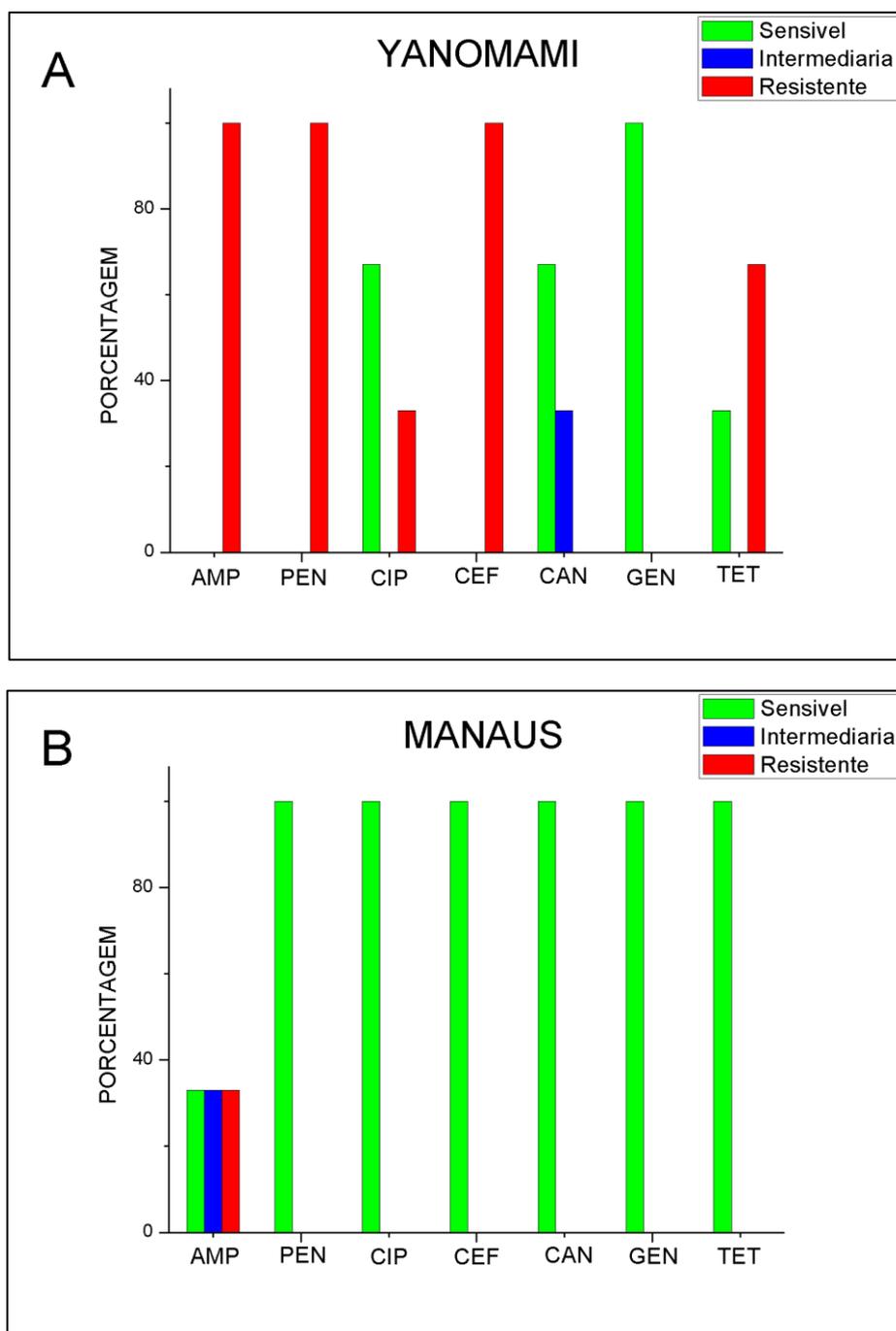


Fig. 3. Classificação das cepas de *E. coli* testadas contra os antibióticos segundo a *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI*. (A) Bactérias dos indivíduos Yanomami altamente resistentes aos antibióticos utilizados, com exceção da Gentamicina. (B) Bactérias dos indivíduos de Manaus com um alto nível de sensibilidade.

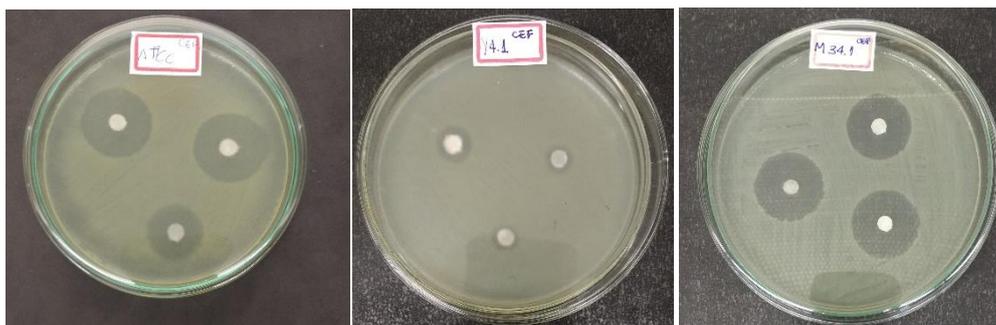


Fig. 4. Antibiograma para o antibiótico Cefalexina. (A) Teste de qualidade com a ATCC® 25922™. (B) Amostra do bebê Yanomami. (C) Amostra do bebê de Manaus.

Os resultados do teste foram comprovados estatisticamente pelo teste de X^2 . Todos as classificações para sensíveis, intermediárias e resistentes mostraram uma diferença significativa pelo teste de ANOVA com Tukey's HSD ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO

Os achados do presente estudo mostraram pela primeira vez como estão as *E. coli* do microbioma intestinal dos Yanomami em fase de transição para a urbanização em relação à alguns dos antibióticos mais utilizados pela medicina moderna. As *E. coli* de Manaus e dos Yanomami se mostraram compartilhadas entre as duas localidades não somente nos *clusters* como também no teste de ancestralidade. Isso nos informa o quanto de troca de bactérias essas duas populações estão tendo desde os nossos ancestrais. Foi verificado que *E. coli* de Manaus possivelmente se originou de linhagens dos Yanomami e com o passar dos anos tivemos essa troca entre as duas localidades nas duas direções, sendo assim, as análises confirmam a proximidade dessas duas populações.

Os resultados encontrados no teste de sensibilidade aos antibióticos de *E. coli* do microbioma intestinal dos Yanomami foram bem distantes dos dados encontrados nos indivíduos Yanomami isolados na Venezuela, quando a *E. coli* dos indígenas foi sensível para todos os antibióticos testados (CLEMENTE et al., 2015). Porém, ainda que o resultado do antibiograma classificou essas bactérias sensíveis no estudo de Clemente (2015), foram encontrados genes de resistência aos antibióticos quando foram investigados o resistoma dessas

mesmas bactérias, sendo assim com uma possível pressão seletiva aos antibióticos poderiam tornar essas mesmas bactérias resistentes. Esse perfil de resistência identificado nas bactérias presentes no microbioma intestinal dos Yanomami em território brasileiro já foi encontrado em comunidades indígenas remotas na Bolívia e no Peru, onde mesmo com baixa exposição aos antibióticos, foi encontrado um alto nível de resistência aos mesmos em *E. coli* isoladas das fezes dos moradores dessas comunidades (BARTOLONI et al., 2004, 2009).

A população Yanomami no território brasileiro recebe apoio da equipe médica da CASAI, e dentre os tratamentos e medicamentos utilizados contra algumas infecções bacterianas nesses indígenas, muitos antibióticos são utilizados. A informação é de que todos os indígenas, enfermos ou não, já tiveram contato alguma vez com um antibiótico pelo menos. Os resultados de resistência a Ampicilina e Penicilina estão dentro do padrão que foi encontrado de alta resistência de *E. coli* por parte desses antibióticos inclusive resistência encontrada no controle de qualidade (BARTOLONI et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2014). Já os resultados para Ciprofloxacina e Cefalexina são mais preocupantes pois são os dois antibióticos mais utilizados pela CASAI nos tratamentos desses indígenas, principalmente para Cefalexina que foi resistente para as três faixas etárias. Um alto nível de resistência pode ocasionar uma ineficiência por parte do medicamento em um eventual tratamento, já que o gene de resistência pode ser transferido de maneira horizontal para outras bactérias da mesma e até de diferentes espécies (CLEMENTE et al., 2015). A presença dos genes de resistência aos antibióticos já é conhecida em estudos prévios de comunidades ameríndias de Bolívia, Peru e Venezuela, e isso pode ser explicado pelo contato com os antibióticos naturais presentes no solo (D’COSTA et al., 2011), troca de materiais contendo antibiótico com as pessoas urbanizadas (CLEMENTE et al., 2015) e ainda a utilização desses antibióticos por parte da CASAI, pode fazer com que esse perfil de resistência para alguns antibióticos seja mais agravante.

A população Yanomami no Brasil sofre com a diarreia em praticamente todo o território. Nos pólos-base examinados no presente estudo, todos apresentavam algum indivíduo que estava sofrendo com a diarreia ou teria

apresentado os sintomas há pelo menos seis meses. É importante frisar que o tratamento com a utilização dos antibióticos por parte da CASAI é fundamental para a saúde desses indígenas, mas salientamos a necessidade de um estudo e a busca por outros antibióticos que não apresentem esse perfil altamente resistente aos Yanomami, e um acompanhamento pela equipe médica da CASAI aos indivíduos que já utilizam os antibióticos aqui testados.

REFERÊNCIAS

ADUGNA, A.; KIBRET, M.; ABERA, B.; NIBRET, E.; ADAL, M. Antibigram of *E. coli* serotypes isolated from children aged under five with acute diarrhea in Bahir Dar town. **African Health Sciences**, v. 15, n. 2, p. 656-664, 2015.

BARTOLONI, A.; BARTALESI, F.; MANTELLA, A.; DELL'AMICO, E.; ROSELLI, M.; STROHMEYER, M.; BARAHONA, H.G.; BARRÓN, V.P.; PARADISI, F.; ROSSOLINI, G.M. High prevalence of acquired antimicrobial resistance unrelated to heavy antimicrobial consumption. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 1, n. 189, p.1291-1294, 2004.

BARTOLONI, A.; KRISTIANSSON, C.; GOTUZZO, E.; PARADISI, F.; ROSSOLINI, G.M. Antibiotic resistance in a very remote Amazonas community. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 2, p. 125–129, 2009.

CLEMENTE, J.C.; PEHRSSON, E.C.; BLASER, M.J.; SANDHU, K.; GAO, Z.; WANG, B.; MAGRIS, M.; HIDALGO, G.; CONTRERAS, M.; NOYA-ALARCÓN, O.; LANDER, O.; MCDONALD, J.; COX, M.; WALTER, J.; LYN, P.; RUIZ, J.F.; RODRIGUEZ, S.; SHEN, N.; SONG, S.E.J.; METCALF, J.; KNIGHT, R.; DANTAS, G.; DOMINGUEZ-BELLO, M.G. The microbiome of uncontacted Amerindians. **Science Advances**, v. 1, n. 3, p. 1-12, 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1987.

D' COSTA, V.M.; KING, C.E.; KALAN, L.; MORAR, M.; SUNG, W.; SCHWARZ, C.; FROESE, D.; ZAZULA, G.; CALMELS, F.; DEBRUYNE, R.; GOLDING, G.B.; POINAR, H.N.; WRIGHT, G.D. Antibiotic resistance is ancient. **Nature**, v. 477, p. 457–461, 2011.

FREITAS, L.P. **Saúde bucal dos Yanomami da região de Xitei e Ketaa Roraima - Brasil**. Dissertação de Mestrado - Mestrado Multinstitucional em Saúde, Sociedade e Endemias da Amazônia – UFAM, Manaus, 89p. 2008.

GUIMARÃES, A.G.; CARDOSO, R.C.V.; AZEVÊDO, P.F.; MENESES, R.B. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de queijos coalho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.71, n 2, p. 259-265, 2012.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, n. 41, p. 95-98, 1999.

KIM, T.; BAK, G.; LEE, J.; KIM, K.S. Systematic analysis of the role of bacterial Hfq-interacting sRNAs in the response to antibiotics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 6, p. 1659-1668, 2015.

MARTINS, G.S.; MANGIAVACCHI, B.M.; BORGES, F.V.; LIMA, N.B. Uso indiscriminado de antibióticos pela população de São José do Calçado (ES) e o perigo das superbactérias. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v. 6, n. 2, p. 84-96, 2015.

NASCIMENTO, A. M.; VAN DER SAND, S.T. O uso de PCR na detecção de *Escherichia coli* enterotoxigênica em amostras de água de esgoto. **Acta scientiae veterinariae**, v. 35, n. 2, p. 181–188, 2007.

OLIVEIRA, J.; RAMOS, C.J.R.; SILVA, V.G. Antibiograma com cepas ATCC (American Type Culture Collection). **ANAIS do SEPE – Seminário de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFFS**, v. 4. 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics**. Geneva: World Health Organization, 2017.

SZMOLKA, A.; NAGY, B. Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n.258, p. 1-13, 2013.

4 DISCUSSÃO GERAL

Os Yanomami que vivem em território brasileiro representam uma etnia importante para a cultura e diversidade na Amazônia. Esses povos com estilo de vida tradicional, representam uma oportunidade única de um maior entendimento de como está a composição do microbioma intestinal de uma civilização ancestral em fase de transição para a urbanização. Os resultados encontrados no presente estudo mostraram que os Yanomami ainda mantêm um microbioma característico de uma comunidade tradicional, e manteve algumas bactérias presentes nos Yanomami isolados na Venezuela (CLEMENTE et al., 2015). Apesar disso, a proximidade da composição do microbioma intestinal dos indígenas com os indivíduos de Manaus já é evidente.

Sobre a saúde dos indígenas estudados, apenas as diarreias eram uma enfermidade enfrentado pelos indígenas. Inicialmente, as diarreias estão presentes em todos os pólos investigados, possivelmente como resultado da ingestão de água não tratada nas aldeias, já que todos os pólos já tem algum tipo de contato com a urbanização. O melhor pólo encontrado em relação à saúde foi o Marari, já que a maioria dos indivíduos desse pólo não apresentou casos de diarreia recente. O pólo além de manter uma dieta natural, recebe ajuda dos missionários, podendo influenciar diretamente a saúde dos indígenas. Em alguns pólos a alimentação tradicional era mantida pelos indivíduos, sem nenhuma introdução de qualquer alimento característico das sociedades urbanizadas. Porém esses pólos também apresentaram indivíduos com diarreias, sendo assim, não correlacionamos a fonte de alimentação tradicional com a ausência de diarreia nos indígenas, e sim com a água, já que não utilizam água tratada para o seu consumo, e todos compartilham de uma mesma fonte.

Em relação ao perfil de sensibilidade de *E. coli* do microbioma intestinal dos Yanomami foram encontrados resultados semelhantes aos estudos prévios com comunidades ameríndias (BARTOLONI et al., 2009; 2004). Então, sugerimos outros estudos que possam acompanhar essa relação de microbioma intestinal humano e a resistência aos antibióticos modernos, e até onde elas possam influenciar na saúde dessas comunidades tradicionais.

5 CONCLUSÃO

- A composição do microbioma intestinal Yanomami ainda mantém aquelas bactérias que são características de uma comunidade com estilo de vida tradicional. Assim, o microbioma intestinal dos Yanomami se distingue do microbioma dos indivíduos de Manaus pela taxonomia devido a diferença de abundância absoluta de algumas bactérias.
- Os níveis de diversidade bacteriana das duas populações foram similares, sendo difícil distingui-los estatisticamente. Apesar da diferença geográfica, de alimentação e estilo de vida, a população de Manaus se mostrou com uma certa proximidade da população Yanomami em relação aos níveis de diversidade bacteriana.
- As amostras fecais da população Yanomami tem presença de *E. coli* como componente do seu microbioma intestinal, e existem vários eventos dispersão (transmissão) de *E. coli* tanto atual como no passado recente, entre os Yanomami e a populações urbanizada de Manaus, em ambas as direções.
- As *E. coli* presentes no microbioma intestinal dos Yanomami apresentaram um perfil de resistência alto, apenas Gentamicina foi capaz de inibir o crescimento dessas bactérias em todos os indivíduos indígenas. Já a população de Manaus se mostrou sensível para a maioria, apenas Ampicilina teve indivíduos resistentes e intermediário.

6 REFERÊNCIAS

ALIVISATOS, A.P.; BLASER, M.J.; BRODIE, E.L.; CHUN, M.; DANGL, J.L.; DONOHUE, T.J.; DORRESTEIN, P.C.; GILBERT, J.A.; GREEN, J.L.; JANSSON, J.K.; KNIGHT, R.; MAXON, M.E.; MCFALL-NGAI, M.J.; MILLER, J.F.; POLLARD, K.S.; RUBY, E.G.; TAHA, S.A. A unified initiative to harness Earth's microbiomes. **Science**, v. 350, n. 6260, p. 507-508, 2015.

BÄCKHED, F.; FRASER, C.M.; RINGEL, Y.; SANDERS, M.E.; SARTOR, R.B.; SHERMAN, P.M.; VERSALOVIC, J.; YOUNG, V.; FINLAY, B.B. et al. Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications. **Cell Host Microbe**, v. 12, n. 5, p. 611–622, 2012.

BARTOLONI, A.; KRISTIANSSON, C.; GOTUZZO, E.; PARADISI, F.; ROSSOLINI, G.M. Antibiotic resistance in a very remote Amazonas community. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 2, p. 125–129, 2009.

BENNETT, P. M. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. **British journal of pharmacology**, v. 153 Suppl, n. January, p. S347–S357, 2008.

BLASER, M. J.; FALKOW, S. What are the consequences of the disappearing human microbiota? **Nature reviews. Microbiology**, v. 7, n. 12, p. 887–894, 2009.

CAPORASO, J.G.; LAUBER, C.L.; WALTERS, W.A.; BERG-LYONS, D.; HUNTLEY, J.; FIERER, N.; OWENS, S.M.; BETLEY, J.; FRASER, L.; BAUER, M.; GORMLEY, N.; GILBERT, J.A.; SMITH, G.; KNIGHT, R. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**, v. 6, n. 8, p. 1621–1624, 2012.

CHAKRAVORTY, S.; HELB, D.; BURDAY, M.; CONNELL, N.; ALLAND D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. **J Microbiol Methods**, v. 69, n. 2, p. 330–339, 2007.

CLEMENTE, J. C.; PEHRSSON, E.C.; BLASER, M.J.; SANDHU, K.; GAO, Z.; WANG, B.; MAGRIS, M.; HIDALGO, G.; CONTRERAS, M.; NOYA-ALARCÓN, O.; LANDER, O.; MCDONALD, J.; COX, M.; WALTER, J.; LYN, P.; RUIZ, J.F.; RODRIGUEZ, S.; SHEN, N.; SONG, S.E.J.; METCALF, J.; KNIGHT, R.; DANTAS, G.; DOMINGUEZ-BELLO, M.G. The microbiome of uncontacted Amerindians. **Science Advances**, v. 1, n. 3, p. 1-12, 2015.

CONSORTIUM. A framework for human microbiome research. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 215–221, 2012.

CONSORTIUM. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 207–214, 2012.

DE FILIPPO, C.; CAVALIERI, D.; DI PAOLA, M.; RAMAZZOTTI, M.; POULLET, J.B.; MASSART, S.; COLLINI, S.; PIERACCINI, G.; LIONETTI, P. Impact of diet

in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 33, p. 14691–6, 2010.

DUBILIER, N.; MCFALL-NGAI, M.; ZHOU, L. Create a global microbiome effort. **Nature**, v. 526, p. 631–634, 2015.

DZIDIC, S.; SUSKOVIC, J.; KOS, B. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 11–21, 2008.

ECKBURG, P. B.; BIK, E.M.; BERNSTEIN, C.N.; PURDOM, E.; DETHLEFSEN, L.; SARGENT, M.; GILL, S.R.; NELSON, K.E.; RELMAN, D.A. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. **American Association for the Advancement of Science**, v. 308, n. 5728, p. 1635–1638, 2005.

FILIPPIS, F.; COCOLIN, L.; BRIGIDI, P.; NEVIANI, E.; GOBBETTI, M.; O'TOOLE, P.W.; ERCOLINI, D. High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. **Gut microbiota**, p. 1–10, 2015.

FLINT, H. J.; SCOTT, K. P.; DUNCAN, S. H.; LOUIS, P.; FORANO, E. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. **Gut Microbes**, v. 3, n. 4, p. 289–306, 2012.

FREITAS, L.P. **Saúde bucal dos Yanomami da região de Xitei e Ketaa Roraima - Brasil**. Dissertação de Mestrado - Mestrado Multinstitucional em Saúde, Sociedade e Endemias da Amazônia – UFAM, Manaus, 89p. 2008.

GANC, A. J.; GANC, R.L.; REIMÃO, S.M.; FRISOLI JUNIOR, A.; PASTERNAK, J. Fecal microbiota transplant by push enteroscopy to treat diarrhea caused by *Clostridium difficile*. **Einstein (Sao Paulo)**, v. 13, n. 2, p. 338–339, 2015.

GIONGO, A.; GANO, K.A.; CRABB, D.B.; MUKHERJEE, N.; NOVELO, L.L.; CASELLA, G.; DREW, J.C.; ILONEN, J.; KNIP, M.; HYÖTY, H.; VEIJOLA, R.; SIMELL, T.; SIMELL, O.; NEU, J.; WASSERFALL, C.H.; SCHATZ, D.; ATKINSON, M.A.; TRIPLETT, E.W. Toward defining the autoimmune microbiome for type 1 diabetes. **The ISME journal**, v. 5, n. 1, p. 82–91, 2011.

GUINANE, C. M.; COTTER, P. D. Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. **Therapeutic advances in gastroenterology**, v. 6, n. 4, p. 295–308, 2013.

HEMARAJATA, P.; VERSALOVIC, J. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. **Therapeutic advances in gastroenterology**, v. 6, n. 1, p. 39–51, 2013.

HENAO-MEJIA, J.; ELINAV, E.; JIN, C.; HAO, L.; MEHAL, W.Z.; STROWIG, T.; THAISS, C.A.; KAU, A.L.; EISENBARTH, S.C.; JURCZAK, M.J.; CAMPOREZ, J.P.; SHULMAN, G.I.; GORDON, J.I.; HOFFMAN, H.M.; FLAVELL, R.A.

Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. **Nature**, v. 482, n. 7384, p. 179–85, 2012.

HOOPER, L. V.; LITTMAN, D. R.; MACPHERSON, A. J. Interactions Between the Microbiota and the Immune System. **Science**, v. 336, n. 6086, p. 1268–1273, 2012.

HUSE, S. M.; WELCH, D.B.M.; VOORHIS, A.; SHIPUNOVA, A.; MORRISON, H.G.; EREN, A.M.; SOGIN, M.L. VAMPS: a website for visualization and analysis of microbial population structures. **BMC bioinformatics**, v. 15, n. 1, p. 41, 2014.

KASER, A.; ZEISSIG, S.; BLUMBERG, R. Update in inflammatory bowel disease. **Annual Review of Immunology**, n. 28, p. 573–621, 2010.

LEY, R. E. Obesity and the human microbiome. **Current opinion in gastroenterology**, v. 26, n. 1, p. 5–11, 2010.

LI, H. T.; ZHOU, Y. B.; LIU, J. M. The impact of cesarean section on offspring overweight and obesity: a systematic review and meta-analysis. **Int J Obes (Lond)**, v. 37, n. 7, p. 893–899, 2013.

LI, Q.; WANG, C.; TANG, C.; LI, N.; LI, J. Molecular-phylogenetic characterization of the microbiota in ulcerated and non-ulcerated regions in the patients with crohn's disease. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. 1–13, 2012.

MARTÍNEZ, I.; STEGEN, J.; MALDONADO-GÓMEZ, M.X.; EREN A.M.; SIBA, P.M.; GREENHILL, A.R.; WALTER, J. The Gut Microbiota of Rural Papua New Guineans: Composition, Diversity Patterns, and Ecological Processes. **Cell Reports**, v. 11, n. 4, p. 527–538, 2015.

MUELLER, N. T.; BAKACS, E.; COMBELLICK, J.; GRIGORYAN, Z.; DOMINGUEZ-BELLO, M.G. The infant microbiome development: Mom matters. **Trends in Molecular Medicine**, v. 21, n. 2, p. 109–117, 2015.

OBREGON-TITO, A. J.; TITO, R.Y.; METCALF, J.; SANKARANARAYANAN, K.; CLEMENTE, J.C.; URSELL, L.K.; XU, Z.Z.; TREUREN, W.V.; KNIGHT, R.; GAFFNEY, P.M.; SPICER, P.; LAWSON, P.; MARIN-REYES, L.; TRUJILLO-VILLARROEL, O.; FOSTER, M.; GUIJA-POMA, E.; TRONCOSO-CORZO, L.; WARINNER, C.; OZGA, A.T.; LEWIS, C.M. Subsistence strategies in traditional societies distinguish gut microbiomes. **Nature communications**, v. 6, p. 6505, 2015.

PALMER, C.; BIK, E.M.; DIGIULIO, D.B.; RELMAN, D.A.; BROWN, P.O. Development of the human infant intestinal microbiota. **PLoS Biology**, v. 5, n. 7, p. 1556–1573, 2007.

PERKINS, S. DNA study links indigenous Brazilians to Polynesians. **Nature** doi:10.1038/nature.2013.12710. 2013.

PINA DE BARROS, E. Saúde Indígena: a invisibilidade como forma de exclusão.

O Clássico e o Novo: tendências, objetos e abordagens em ciências sociais e saúde, p. 444, 2003.

PURCHIARONI, F.; TORTORA, A.; GABRIELLI, M.; BERTUCCI, F.; GIGANTE, G.; IANIRO, G.; OJETTI, V.; SCARPELLINI, E.; GASBARRINI, A. The role of intestinal microbiota and the immune system. **Europe Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 17, n. 3, p. 323–333, 2013.

QIN, J.; LI, Y.; CAI, Z.; LI, S.; ZHU, J.; ZHANG, F. et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 55–60, 2012.

QIN, J.; LI, R.; RAES, J.; ARUMUGAM, M.; BURGDORF, K.S.; MANICHANH, C.; et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, v. 464, p. 59-65, 2010.

RASMUSSEN, M.; ANZICK, S.L.; WATERS, M.R.; DE GIORGIO, M.; RASMUSSEN, S.; MOLTKE, I. et al. The genome of a Late Pleistocene human from a Clovis burial site in western Montana. **Nature**, v. 506, n. 7487, p. 225–229, 2014.

REMELY, M.; HIPPE, B.; ZANNER, J.; AUMUELLER, E.; BRATH, H.; HASLBERGER, A.G. Gut microbiota of obese, type 2 diabetic individuals is enriched in *Faecalibacterium prausnitzii*, *Akkermansia muciniphila* and *Peptostreptococcus anaerobius* after weight loss. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets**, 2016.

RIGON, G.; VALLONE, C.; LUCANTONI, V.; SIGNORE, F. Maternal factors pre- and during delivery contribute to gut microbiota shaping in newborns. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, n. July, p. 93, 2012.

SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S.L.; RYABIN, T.; HALL, J.R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E.B.; LESNIEWSKI, R.A. et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537–7541, 2009.

SCHNORR, S. L.; CANDELA, M.; RAMPELLI, S.; CENTANNI, M.; CONSOLANDI, C.; BASAGLIA, G.; TURRONI, BIAGI, E.; PEANO, C.; SEVERGNINI, M.; FIORI, J.; GOTTI, R.; BELLIS, G.; LUISELLI, D.; BRIGIDI, P.B.; MABULLA, A.; MARLOWE, F.; HENRY, A.G.; CRITTENDEN, A.N. Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. **Nature communications**, v. 5, p. 3654, 2014.

SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. **PLoS Biol**, v. 14, n. 8, p. e1002533, 2016.

SOMMER, M. O. A.; DANTAS, G.; CHURCH, G. M. Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. **Science**, v. 325, n. 5944, p. 1128–1131, 2009.

THOMPSON, A. L.; MONTEAGUDO-MERA, A.; CADENAS, M.B.; LAMPL, M.L.; AZCARATE-PERIL, M.A. Milk- and solid-feeding practices and daycare attendance are associated with differences in bacterial diversity, predominant communities, and metabolic and immune function of the infant gut microbiome. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 5, n. February, p. 3, 2015.

TOURNEAU, F.-M. LE. (2010). **Les Yanomami du Brésil: géographie d'un territoire amérindien** (1st ed., p. 480). Paris: Éditions Belin.

TREMAROLI, V.; BÄCKHED, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. **Nature**, v. 489, n. 7415, p. 242–249, 2012.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **P & T: A peer-reviewed journal for formulary management**, v. 40, n. 4, p. 277–83, 2015.

WEIL, A.; HOHMANN, E. Fecal Microbiota Transplant: Benefits and Risks. **Ofid**, p. 1–8, 2015.

WU, G. D.; LEWIS, J. D. Analysis of the human gut microbiome and association with disease. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 7, p. 774–777, 2013.

YANG, B.; WANG, Y.; QIAN, P.Y. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. **BMC Bioinformatics**, v. 17, n. 1, p. 135, 2016.

YATSUNENKO, T.; REY, F.E.; MANARY, M.J.; TREHAN, I.; DOMINGUEZ-BELLO, M.G.; CONTRERAS, M.; MAGRIS, M.; HIDALGO, G.; BALDASSANO, R.N.; ANOKHIN, A.P.; HEATH, S.C.; WARNER, B.; REEDER, J.; KUCZYNSKI, J.; CAPORASO, J.G.; LOZUPONE, C.A.; LAUBER, C.; CLEMENTE, J.C.; KNIGHTS, D.; KNIGHT, R.; GORDON, J.I. Human gut microbiome viewed across age and geography. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 222–227, 2012.

7 APÊNCIDE

Tabela 1. Concentração das amostras de DNA

Amostra	Quant. DNA (ng/ μL)	Quant. PRC purificado (ng/ μL)
Y 1	28.9	20.7
Y 3	26.4	25.3
Y 4	25.6	13.9
Y 5	24.7	27.7
Y 6	20.9	26.2
Y 7	29.5	32.9
Y 8	32.3	25.9
Y 10	29.3	30.3
Y 12	22.4	27.3
Y 13	22.9	20.7
Y 14	24.6	30.1
Y 15	21.5	28.7
Y 16	23.5	24.9
Y 17	30.4	21.5
Y 18	27.3	30.8
Y 19	31.5	26.8
Y 20	32.2	30.3
Y 21	28.7	20.2
M 22	20.8	17.5
M 24	34.9	21.1
M 25	33.5	20.7
M 26	21.6	22.7
M 28	20.6	16.0
M 29	21.5	17.5
M 30	20.8	20.6
M 31	24.7	25.3
M 32	23.1	18.9
M 33	20.9	17.5
M 38	21.9	16.6
M 41	22.7	20.3

Tabela 2. Combinações primers/barcode

AMOSTRA	PRIMER COMBINAÇÕES
Y 1	A1_P11
Y 3	A3_P11
Y 4	A4_P11
Y 5	A3_P12
Y 6	A4_P12
Y 7	A2_P12
Y 8	A2_P13
Y 10	A 2_P14
Y 12	A1_P12
Y 13	A2_P15
Y 14	A2_P16
Y 15	A3_P13
Y 16	A3_P14
Y 17	A4_P14
Y 18	A4_P15
Y 19	A2_P17
Y 20	A4_P16
Y 21	A3_P15
M 22	A6_P17
M 24	A7_P12
M 25	A7_P13
M 26	A8_P17
M 28	A7_P14
M 29	A6_P12
M 30	A6_P13
M 31	A8_P13
M 32	A6_P14
M 33	A5_P17
M 38	A6_P16
M 41	A8_P14

Tabela 3. Sequências barcodes

Nomenclatura do primer fusionado	SEQUÊNCIA 5' - 3'
	Primer forward v1 27f AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
	Primer reverse v2 338R TGCTGCCTCCCGTAGGAGT
A1MF	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCACCTTCGCGATAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
A2MF	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGGACAATGGCGATAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
A3MF	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGGCAATTGCGATAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
A4MF	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCGAGACGCGATAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
A5MF	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCGGAGAATCGCGATAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
A6MF	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTGGCAACGGCGATAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
A7MF	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCAATTGGCGATAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
A8MF	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCGAAGGCAGGCGATAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
P11MR	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTTCCACTTCGCGATTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
P12MR	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTTCTGCTTCACGATTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
P13MR	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCCTGCCATTCGCGATTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
P14MR	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCAGCCAATTCTCGATTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
P15MR	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCTGGCAATCCTCGATTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
P16MR	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCTAGGAACCGCGATTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
P17MR	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTCTGAATCTCGATTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
	MARRON - Adaptador A / VERMELHO- barcodes/ VERDE- primer forward
	ROSA Primer_do_ION (P1) / VERMELHO- barcodes/ AZUL -primer reverse

Run Summary

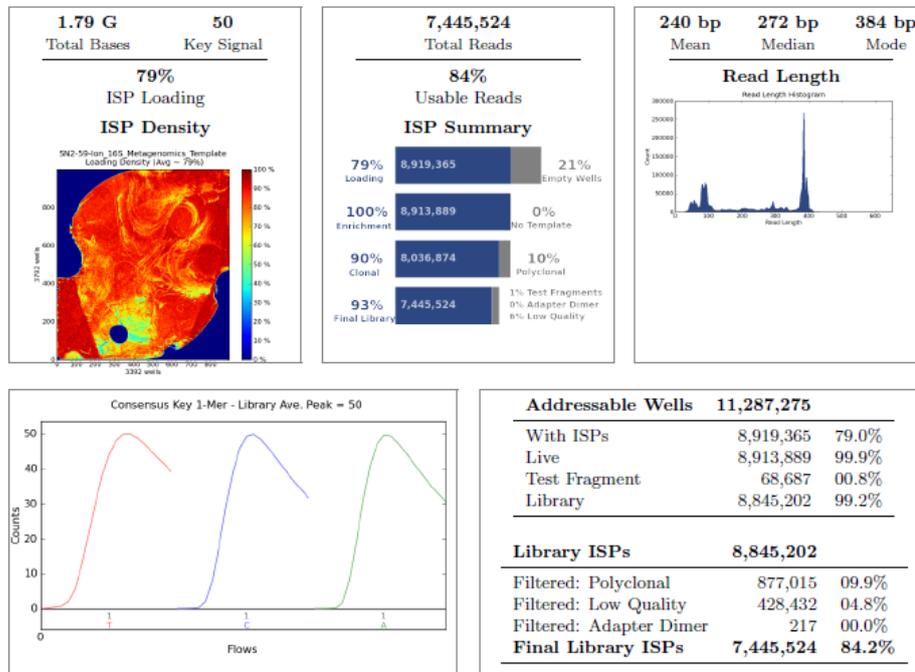


Fig. 1 Resultados Mothur. Informações do tamanho do fragmento, carregamento do chip, amplificação clonal.

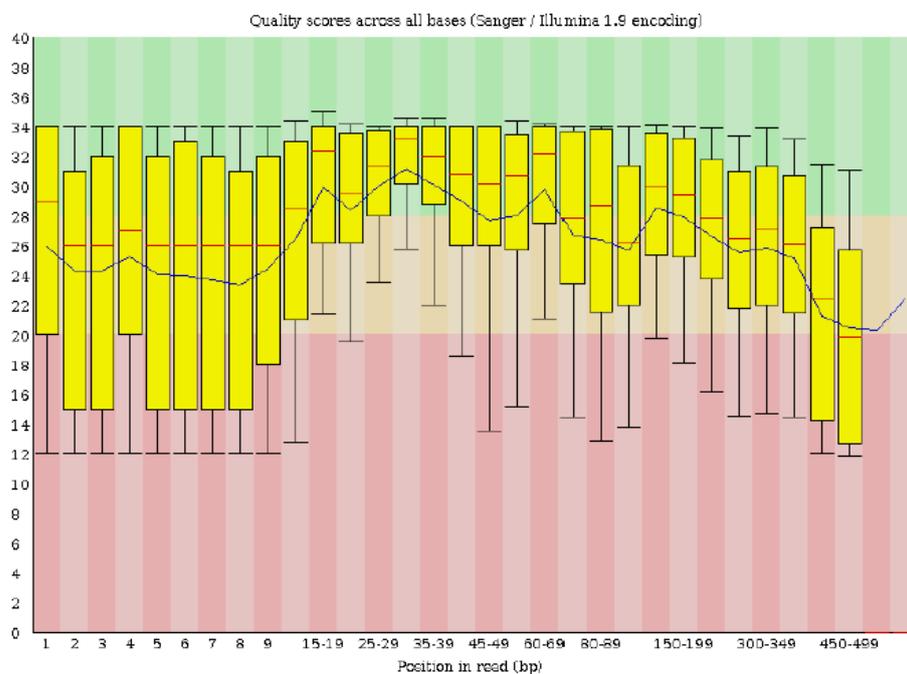


Fig. 2 Qualidade das sequências em *Phred Score*.

Tabela 4. ANOVA/Tuckey - Ampicilina

	ATCC	AdultoM	IdosoM	BebêM	AdultoY	IdosoY	Bebê Y
ATCC	\	P>0,05	P<0,05*	P>0,05	P<0,05*	P<0,05*	P<0,05*
Adul M	P>0,05	\	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05
IdosoM	P<0,05*		\	P>0,05	P<0,05*	P<0,05*	P<0,05*
BebêM	P>0,05	P>0,05	P>0,05	\	P>0,05	P>0,05	P>0,05
Adul Y	P<0,05*	P>0,05	P<0,05*	P>0,05	\	P<0,05*	P<0,05*
IdosoY	P<0,05*	P>0,05	P<0,05*	P>0,05	P<0,05*	\	P<0,05*
Beb	P<0,05*	P>0,05	P<0,05*	P>0,05	P<0,05*	P<0,05*	\

* Diferentes estatisticamente

Tabela 5. ANOVA/Tuckey – Penicilina

	ATCC	AdultoM	IdosoM	BebêM	AdultoY	IdosoY	Bebê Y
ATCC	\	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P<0,05*	P<0,05*	P<0,05*
Adul M	P>0,05	\	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05
IdosoM	P>0,05	P>0,05	\		P>0,05	P>0,05	P>0,05
BebêM	P>0,05	P>0,05	P>0,05	\	P>0,05	P>0,05	P>0,05
Adul Y	P<0,05*	P>0,05	P>0,05	P>0,05	\	P<0,05*	P<0,05*
IdosoY	P<0,05*	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P<0,05*	\	P<0,05*
Beb	P<0,05*	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P<0,05*	P<0,05*	\

* Diferentes estatisticamente

Tabela 6. ANOVA/Tuckey – Ciprofloxacina

	ATCC	AdultoM	IdosoM	BebêM	AdultoY	IdosoY	Bebê Y
ATCC	\	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05
Adul M	P>0,05	\	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05
IdosoM	P>0,05	P>0,05	\	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05
BebêM	P>0,05	P>0,05	P>0,05	\	P>0,05	P>0,05	P>0,05
Adul Y	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	\	P>0,05	P>0,05
IdosoY	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	\	P>0,05
Beb	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	\

* Diferentes estatisticamente

Tabela 7. ANOVA/Tuckey – Cefalexina

	ATCC	AdultoM	IdosoM	BebêM	AdultoY	IdosoY	Bebê Y
ATCC	\	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05
Adul M	P>0,05	\	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05
IdosoM	P>0,05	P>0,05	\		P>0,05	P>0,05	P>0,05
BebêM	P>0,05	P>0,05	P>0,05	\	P>0,05	P>0,05	P>0,05
Adul Y	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	\	P<0,05*	P<0,05*
IdosoY	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P<0,05*	\	P<0,05*
Beb	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P<0,05*	P<0,05*	\

* Diferentes estatisticamente

Tabela 8. ANOVA/Tuckey – Canamicina

	ATCC	AdultoM	IdosoM	BebêM	AdultoY	IdosoY	Bebê Y
ATCC	\	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05
Adul M	P>0,05	\	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05
IdosoM	P>0,05	P>0,05	\		P>0,05	P>0,05	P>0,05
BebêM	P>0,05	P>0,05	P>0,05	\	P>0,05	P>0,05	P>0,05
Adul Y	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	\	P>0,05	P>0,05
IdosoY	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	\	P>0,05
Beb	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	\

* Diferentes estatisticamente

Tabela 9. ANOVA/Tuckey – Gentamicina

	ATCC	AdultoM	IdosoM	BebêM	AdultoY	IdosoY	Bebê Y
ATCC	\	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05
Adul M	P>0,05	\	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05
IdosoM	P>0,05	P>0,05	\		P>0,05	P>0,05	P>0,05
BebêM	P>0,05	P>0,05	P>0,05	\	P>0,05	P>0,05	P>0,05
Adul Y	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	\	P>0,05	P>0,05
IdosoY	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	\	P>0,05
Beb	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	\

* Diferentes estatisticamente

Tabela 10. ANOVA/Tuckey – Tetraciclina

	ATCC	AdultoM	IdosoM	BebêM	AdultoY	IdosoY	Bebê Y
ATCC	\	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05
Adul M	P>0,05	\	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05
IdosoM	P>0,05	P>0,05	\		P>0,05	P>0,05	P>0,05
BebêM	P>0,05	P>0,05	P>0,05	\	P>0,05	P>0,05	P>0,05
Adul Y	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	\	P<0,05*	P>0,05
IdosoY	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P<0,05*	\	P>0,05
Beb	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	\

* Diferentes estatisticamente

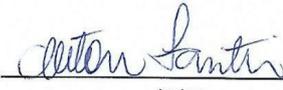
8 ANEXOS

8.1 Folha de Rosto



MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. Projeto de Pesquisa: Caracterização taxonômica e funcional do microbioma bacteriano intestinal de sociedades ameríndias rurais no Alto Rio Negro, Amazonas brasileiro: estudo metagenômico da estrutura composicional e sua relação com fontes de alimentação e prevalência de doenças intestinais			
2. Número de Participantes da Pesquisa: 60			
3. Área Temática: Genética Humana: (Trata-se de pesquisa na qual esteja prevista a dissociação irreversível dos dados dos participantes da pesquisa;) Estudos com populações indígenas;			
4. Área do Conhecimento: Grande Área 4. Ciências da Saúde, Grande Área 2. Ciências Biológicas			
PESQUISADOR RESPONSÁVEL			
5. Nome: Cleiton Fantin			
6. CPF: 011.830.849-19		7. Endereço (Rua, n.º): JOSE DE ARIMATEIA ALEIXO ap201 MANAUS AMAZONAS 69060081	
8. Nacionalidade: BRASILEIRO		9. Telefone: (92) 8182-8204	10. Outro Telefone: 11. Email: cleitonfantin@hotmail.com
Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Tenho ciência que essa folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo.			
Data: <u>10</u> / <u>11</u> / <u>16</u>		 Assinatura	
INSTITUIÇÃO PROPONENTE			
12. Nome: Escola Superior de Ciências da Saúde da Universidade do Estado do Amazonas/UEA		13. CNPJ: <u>04.280.196/0001-76</u>	14. Unidade/Orgão:
15. Telefone: (92) 3611-4698		16. Outro Telefone:	
Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.			
Responsável: <u>Daulison Sousa Ferreira</u> CPF: <u>623.233.342.04</u>			
Cargo/Função: <u>Diretor</u>			
Data: <u>10</u> / <u>11</u> / <u>2016</u>		 Prof. M.Sc. <u>Daulison Sousa Ferreira</u> Diretor Escola Superior de Ciências da Saúde ESA/UEA	
PATROCINADOR PRINCIPAL			
Não se aplica.			

8.2 Carta de Anuência DSEI-Y



GOVERNO DO ESTADO DO
AMAZONAS

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA – MBT

CARTA DE ANUÊNCIA PARA AUTORIZAÇÃO DE PESQUISA

Ilmo Sr. João Batista Catalano e Ilmo Sr. Davi Kopenawa

Solicitamos autorização institucional para a realização da pesquisa intitulada “CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA E FUNCIONAL DO MICROBIOMA BACTERIANO INTESTINAL DE SOCIEDADES AMERÍNDIAS RURAIS NO ALTO RIO NEGRO, AMAZONAS BRASILEIRO: ESTUDO METAGENÔMICO COMPARATIVO DA ESTRUTURA COMPOSICIONAL E SUA RELAÇÃO COM FONTES DE ALIMENTAÇÃO E PREVALÊNCIA DE DOENÇAS”, para que seja realizada a coleta dos dados e amostras biológicas dos participantes indígenas na sede do Distrito Especial de Saúde Indígena Yanomami, pelo aluno deste programa de pós-graduação **Rodrigo Maciel Alencar** sob orientação do Prof. **Dr. Cleiton Fantin Rezende**, pesquisador da Universidade do Estado do Amazonas.

A pesquisa tem como objetivo investigar quais são as espécies de bactérias que existem na flora intestinal (a partir de fezes) da comunidade indígena Yanomami e estabelecer relações com as fontes de alimentação e a prevalência de doenças, não só intestinais, mas também de tipo diabético e cardíaco. Ao mesmo tempo, tenta se detectar se as bactérias possuem genes de resistência aos antibióticos da medicina moderna, pois recentes estudos indicam que dita resistência, em casos de bactérias patogênicas, constitui uma das maiores ameaças para a saúde e a vida das comunidades indígenas. Esse estudo representa uma nova alternativa na busca de soluções para algumas doenças das sociedades tradicionais Yanomami, assim como um ponto de partida para a criação de planos de prevenção e proteção dos povos indígenas frente às futuras doenças já presentes nas sociedades urbanas. A coleta de dados e amostras fecais está prevista para o período de janeiro de 2017 a fevereiro de 2018, após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Estado do Amazonas – UEA/ESA.

Necessitamos de acesso aos dados de saúde dos indivíduos indígenas, assim como o questionário e amostras coletadas. Ao mesmo tempo, pedimos autorização para que o nome desta instituição possa constar no relatório final bem como em futuras publicações na forma de artigo científico.

Na certeza de contarmos com a colaboração e empenho desta Direção, agradecemos antecipadamente a atenção, ficando a disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária.



Boa Vista, 3 de novembro de 2016

Prof. Dr. Cleiton Fantin Rezende
Pesquisador Responsável pelo Projeto

Concordamos com a solicitação () Não concordamos com a solicitação

Sr. João Batista Catalano
Coordenador do Distrito Especial de Saúde Indígena Yanomami

Sr. Davi Kopenawa
Líder Yanomami



Impressão do dedo polegar

8.3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



GOVERNO DO ESTADO DO

AMAZONAS

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/UEA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado(a) Colaborador(a),

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA E FUNCIONAL DO MICROBIOMA BACTERIANO INTESTINAL DE SOCIEDADES AMERÍNDIAS RURAIS NO ALTO RIO NEGRO, AMAZONAS BRASILEIRO: ESTUDO METAGENÔMICO COMPARATIVO DA ESTRUTURA COMPOSICIONAL E SUA RELAÇÃO COM FONTES DE ALIMENTAÇÃO E PREVALÊNCIA DE DOENÇAS, sob a responsabilidade do Pesquisador Dr. Cleiton Fantin, da Universidade do Estado do Amazonas, localizada em Manaus, na Avenida Carvalho Leal, 1777, Cachoeirinha, CEP: 69065-001, com o telefone (92) 3878-4368 e email: cleitonfantin@hotmail.com. A pesquisa tem como objetivo caracterizar taxonômica e funcionalmente o microbioma intestinal de sociedades ameríndias tradicionais com estilos de vida semi-urbanizados dentro da Amazônia Brasileira, e comparar com indivíduos de uma sociedade industrializada (Manaus). Tem como objetivos secundários: a. Identificar molecularmente as espécies que compõem a microbiota bacteriana intestinal. b. Avaliar a existência de relação entre a composição dos microbiomas, a prevalência de doenças intestinais observadas e estilos de vida. c. Examinar a capacidade antimicrobiana (exclusão de bactérias patógenas intestinais modernas) da microbiota intestinal. d. Detectar a presença de genes funcionais de resistência antibiótica na microbiota intestinal. Esse estudo tem a importância de investigar quais são as espécies de bactérias que existem na flora intestinal (a partir de fezes) da comunidade Yanomami e estabelecer relações com as fontes de alimentação e a prevalência de doenças, não só intestinais, mas também de tipo diabética e cardíaca. Esse estudo representa uma nova alternativa na busca de soluções para algumas doenças das sociedades tradicionais Yanomami, assim como um ponto de partida para a criação de planos de prevenção e proteção dos povos indígenas frente às ameaças para a vida e a saúde que representam as futuras doenças presentes já nas sociedades urbanas.

Toda a pesquisa com seres humanos envolve riscos, porém o procedimento que será utilizado nesta pesquisa minimiza qualquer tipo de risco ou desconforto para o participante, para praticamente nenhum. O procedimento utilizado para a obtenção das amostras fecais, o qual é voluntário e individual, não apresenta nenhum desconforto significativo para as pessoas, mas apesar disso, possíveis desconfortos podem estar associados à preferência dos participantes no modo em que deseja coletar a amostra, pois a maneira sugerida pelos pesquisadores pode não cumprir com padrões do dia a dia do participante, porém, apesar disso, o participante é livre na sugestão de alternativas com as quais possa se sentir mais confortável, e será assim respeitada a sua decisão. O tipo de procedimento utilizado nessa pesquisa apresenta um risco mínimo, pois se trata da coleta de amostras fecais de forma NÃO INVASIVA. A sua obtenção se dá de forma natural e fisiológica desde o participante, não afetando a sua integridade física, moral ou mental. O questionário e a coleta do material biológico serão realizados pelo próprio participante (com o auxílio de máscara e luvas), ou por um membro da equipe de confiança do mesmo, e entregue aos pesquisadores posteriormente com o material já armazenado e o questionário já devidamente preenchido, sem a necessidade de contato direto dos pesquisadores com o participante.

Caso o(a) Sr.(a) aceite participar da pesquisa, não receberá nenhuma compensação financeira. O Sr.(a) e o seu acompanhante, se necessário, terá a garantia de ressarcimento das possíveis despesas geradas pela pesquisa (Item IV.3.g, da Resolução CNS nº. 446 de 2012). Todo material que será utilizado (penico,



Universidade do Estado do Amazonas
Av: Djalma Batista, 3578 - Flores
CEP: 69050-010 / Manaus - AM
www.uea.edu.br



GOVERNO DO ESTADO DO
AMAZONAS

coletor universal, papel, plástico esterilizado, máscaras e luvas) será disponibilizado pela equipe da pesquisa. A equipe de pesquisa irá até o local onde se encontra o participante sendo assim não é necessário o transporte ou deslocamento do mesmo. O Sr.(a) estará assegurado(a) ainda do direito a indenizações e cobertura material para reparação a qualquer dano, causado pela pesquisa, se houver (Resolução CNS nº 466 de 2012, IV.3.h, IV.4.c e V.7).

Os benefícios esperados com o estudo são: Um diagnóstico detalhado da composição da flora bacteriana intestinal nas comunidades Yanomami. Isso inclui uma descrição daquelas bactérias benéficas e aquelas que podem chegar a representar um risco para a saúde. Uma descrição das prováveis doenças que possam afetar futuramente às comunidades também serão incluídas, baseadas no perfil bacteriano observado. Recomendações sobre o uso de fontes de alimentação mais adequadas para manter a saúde intestinal também serão obtidas a partir do estudo. No final, esta informação derivada da pesquisa será repassada e explicada não só para as comunidades Yanomami, mas também para as instituições de saúde encarregadas da atenção primária em ditas comunidades, permitindo a criação de planos de prevenção e cura de forma antecipada por parte das autoridades para a proteção dos povos indígenas frente às ameaças iminentes que representam as futuras doenças de origem bacteriano existentes já nas sociedades urbanas.

Lembramos que a sua participação é voluntária, e você pode desistir, em qualquer momento, mesmo após ter iniciado o questionário ou a coleta de amostras fecais, sem nenhum prejuízo para você.

Se o(a) Sr.(a) estiver de acordo em participar deverá preencher e assinar o Termo de Consentimento Pós-esclarecido que se segue, e receberá uma via original do mesmo.

Nome do pesquisador responsável: Cleiton Fantin
Endereço: Universidade do Estado do Amazonas, Av. Carvalho Leal, 1777, Cachoeirinha, 4º andar do Prédio Anexo, CEP: 69065-001, Manaus – AM.
Telefone para contato: (92) 3878-4368.
Email para contato: cleitonfantin@hotmail.com

Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Estado do Amazonas - UEA
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
Localizada na Av. Carvalho Leal, 1777, 3º andar do Prédio Administrativo, CEP: 69065-001, Cachoeirinha Manaus – AM
Telefone para contato: (92) 3878-4368
Email para contato: cep.uea@gmail.com

O sujeito de pesquisa ou seu representante legal, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – assinando na última página do referido Termo.

O pesquisador responsável deverá, da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – assinando na última página do referido Termo.



CONSENTIMENTO PÓS INFORMADO

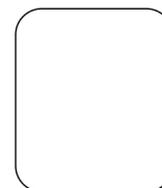
Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr.(a) _____, portador(a) da cédula de identidade _____, declara que, após leitura minuciosa do TCLE, teve oportunidade de fazer perguntas, esclarecer dúvidas que foram devidamente explicadas pelos pesquisadores, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido e, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO em participar voluntariamente desta pesquisa.

E, por estar de acordo, assina o presente termo.

Assinatura do participante

Ou Representante legal

Assinatura do Pesquisador



Impressão do dedo polegar
caso o participante não saiba
assinar

_____, _____ de _____ de _____