



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**CARACTERIZAÇÃO DO MICROBIOMA GASTROINTESTINAL DE POPULAÇÕES
URBANAS E TRADICIONAIS DA AMAZÔNIA**

ANA PAULA SCHAAN SILVA

Belém (PA)

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

S586c Silva, Ana Paula Schaan.
Caracterização do Microbioma Gastrointestinal de
Populações Urbanas e Tradicionais da Amazônia / Ana
Paula Schaan Silva. — 2023.
146 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Ândrea Kely Campos Ribeiro
dos Santos
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-
Graduação em Genética e Biologia Molecular, Belém, 2023.

1. Microbioma. 2. Metagenômica. 3. Microbiologia
humana. 4. Amazônia. I. Título.

CDD 573.215



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**CARACTERIZAÇÃO DO MICROBIOMA GASTROINTESTINAL DE POPULAÇÕES URBANAS E
TRADICIONAIS DA AMAZÔNIA**

ANA PAULA SCHAAN SILVA

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFPA como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Ândrea Kely Campos Ribeiro dos Santos

Belém (PA)

2022

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES E FONTES FINANCIADORAS

1. Instituições Participantes

- i. Universidade Federal do Pará (UFPA):
 - Laboratório de Genética Humana e Médica (LGHM) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará;
 - Núcleo de Pesquisas em Oncologia da Universidade Federal do Pará;
- ii. Massachusetts Institute of Technology (MIT, Cambridge, EUA):
 - Alm Lab, Department of Biological Engineering, Center for Microbiome Research and Therapeutics (doutorado sanduíche)

2. Fontes Financiadoras

- i. Rede de Pesquisa em Genômica Populacional Humana/RPGPH (Bio Comp/CAPES);
- ii. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- iii. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- iv. Comissão Fulbright (Doctoral Dissertation Research Award).

AGRADECIMENTOS

Olho para os últimos quatro anos e meio e me vejo na linha de chegada de um percurso quase exclusivamente feliz. Reconheço minha sorte e atribuo minha experiência tão positiva às pessoas, grupos e instituições que me cercaram e guiaram durante o doutorado.

Primeiro, meu maior agradecimento vai à minha mãe, Denise Schaan, que nos deixou ainda em 2018, antes mesmo de eu iniciar o doutorado. Apesar de não ter podido ouvir seus conselhos e ter o seu colo nos momentos difíceis desses últimos anos, pude sentir sua presença, seu orgulho e seus ensinamentos em cada passo que dei. Como minha maior inspiração, meu coração se enche de alegria quando percebo o quanto somos parecidas. Mãe, obrigada por ser sempre minha guia.

O mais importante de se ter durante o doutorado, mais ainda que um bom projeto, é um bom orientador. Nesse aspecto sou muito afortunada de ter tido ao meu lado, desde a graduação, o acompanhamento e suporte da Dra. Ândrea Ribeiro dos Santos, sem a qual eu definitivamente não estaria tão feliz de ter chegado até aqui. Professora, obrigada pelo apoio incondicional, por me ouvir e depositar tanta confiança em mim. A independência e maturidade que sinto hoje é o produto dos seus anos de exemplo e encorajamento.

John, obrigada por tudo. É difícil colocar em palavras, mas quero agradecer por sempre ouvir tão atentamente às minhas divagações e nunca ter deixado de mostrar o quanto se importa. Por tantas risadas e por me mostrar que a vida é muito mais.

Um agradecimento muito especial à minha avó Gaysita, meu irmão Lucas e meu padrasto André. Saber que tenho para onde voltar quando penso que tudo pode dar errado é a base que me impulsiona a seguir meus sonhos. Obrigada por serem minha família.

Aos meus amigos Clarice, Larissa, Erick, obrigada por sempre me lembrarem quem eu sou e serem minha casa. Às amigas com as quais compartilho o caminho acadêmico, Gleyce, Paola, Giovanna, Camille, Amanda e Mayara, obrigada pelas conversas e pela amizade tão fundamental na minha vida. Ao Lucas, Gabriel e Ramiro, obrigada pela companhia de sempre e pelas considerações tão sãs quando minhas ideias se desorganizam. Amo todos vocês.

Àqueles que tornaram o desenvolvimento desse projeto possível, Dr. João Guerreiro e a equipe das viagens de assistência em saúde, Dr. Eric Alm, Dr. Jason Zhang, Dra. An-Ni Zhang e Dr. Mathieu Groussin do MIT, obrigada por acreditarem no meu projeto e me darem o suporte necessário para executá-lo.

Por fim, à CAPES, por financiar o projeto e a bolsa de doutorado, e à Fulbright Brasil, por financiar o período de doutorado sanduíche no Massachusetts Institute of Technology e me proporcionar uma experiência tão enriquecedora.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1. Composição e localização do microbioma	9
1.2. Microbioma gastrointestinal.....	14
1.3. Formação e funções do microbioma GI	17
1.4. Diversidade populacional	23
1.5. Microbioma GI e o adoecimento	34
1.6. Iniciativas globais e a medicina translacional.....	39
2. JUSTIFICATIVA	42
3. OBJETIVOS	43
3.1. Objetivo geral	43
3.2. Objetivos específicos	43
4. CAPÍTULO 1	44
5. CAPÍTULO 2	69
6. DISCUSSÃO GERAL	103
7. CONCLUSÃO	111
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112
9. ANEXOS	142
9.1. Doutorado Sanduíche	142
9.2. Artigos publicados no período.....	143

RESUMO

Por milhares de anos, seres humanos coevoluíram com comunidades bacterianas gastrointestinais e interagiram com o conjunto de seus genes, conhecido como microbioma. Sabe-se que o microbioma possui papel fundamental na performance e na manutenção da saúde do hospedeiro e que perturbações ao seu equilíbrio podem levar ao desenvolvimento de doenças. Apesar disso, pouco se conhece sobre a composição do microbioma gastrointestinal da população brasileira, em especial daquelas que habitam a região Amazônica, que nas últimas décadas tem passado por transições epidemiológicas para as quais o papel do microbioma gastrointestinal é desconhecido. Por meio do sequenciamento metagenômico das fezes, neste estudo investigamos a composição e diversidade do microbioma gastrointestinal associado a grupos humanos da Amazônia em diferentes níveis de urbanização e industrialização, bem como analisamos a dinâmica temporal de populações microbiológicas ao realizar amostragens longitudinais. Como resultado, identificamos um gradiente de urbanização no microbioma de populações indígenas da Amazônia, o qual se define pela presença de marcadores microbiológicos típicos de microbiomas de populações urbanizadas. Ademais, mostramos que o microbioma da população urbana da Amazônia se difere daquele de outras regiões urbanas brasileiras, e se assemelha às comunidades intestinais observadas em grupos semi-urbanos e urbanos de países africanos. Por fim, identificamos que em áreas urbanas da Amazônia, comunidades microbianas intestinais são menos estáveis e mais sujeitas a pressões ecológicas e evolutivas que aquelas de indivíduos estadunidenses. De modo geral, apresentamos evidências de transição para a industrialização no microbioma humano na Amazônia e destacamos a urgência em incluir populações humanas de origens e contextos diversos nas pesquisas em microbioma. Nossos resultados constituem a base sobre a qual serão realizadas futuras investigações clínicas e evolutivas a respeito do microbioma brasileiro e os seus impactos na saúde humana.

ABSTRACT

For thousands of years, humans have co-evolved with complex gut bacterial communities, known as the microbiome. The microbiome plays a fundamental role in maintaining host health and perturbations to its balance can lead to the development of diseases. However, little is known about the composition of the gut microbiome of Brazilian Amazonian populations, which in recent decades have undergone epidemiological transitions for which the role of the gut microbiome is unknown. Through fecal metagenomic sequencing, we investigated the composition and diversity of gut microbiomes associated with Amazonian individuals living in diverse levels of urbanization and industrialization, and examined the temporal dynamics of such microbes by undertaking a longitudinal sampling approach. As a result, we identified an urbanization gradient in the microbiome of indigenous populations in the Amazon, which is defined by the presence of microbial biomarkers typical of urbanized microbiomes among rural individuals. Furthermore, we show that the microbiome of the urban population of the Amazon differs from that of other Brazilian urban populations, and resembles the intestinal communities observed in African semi-urban and urban groups. Finally, we showed that in urban areas of the Amazon, intestinal microbial communities are less stable and more subject to ecological and evolutionary pressures than those of US individuals. In summary, we present evidence of industrialization transitions in the human microbiome of the Amazon and highlight the urgency of including human populations of different origins and contexts in microbiome research. Our results form the basis on which future clinical and evolutionary investigations will be carried out regarding the Brazilian microbiome in the Amazon.

1. INTRODUÇÃO

A conclusão do Projeto Genoma Humano (Venter et al., 2001) permitiu que diversas questões, até então obscuras, acerca da constituição genética dos seres humanos fossem progressivamente esclarecidas (Collins & McKusick, 2001). As conquistas do projeto incluem importantes avanços para a ciência básica, tecnologia e medicina personalizada, e inauguraram uma nova era para a genômica humana (Naidoo et al., 2011).

Entretanto, em vista dos obstáculos a serem superados e questões ainda não respondidas, é evidente que o mapeamento do genoma humano por si só não é suficiente para elucidar a vasta complexidade por trás dos processos biológicos humanos. É imprescindível, para obtermos uma compreensão global da variabilidade genética entre as populações, que consideremos paralelamente o genoma dos micro-organismos que residem dentro e fora do organismo humano (Bokulich et al., 2012; Davies, 2001).

Sabe-se hoje, graças às tecnologias independentes de cultivo – como o sequenciamento de nova geração, que os micro-organismos estão organizados em comunidades mais abundantes e diversas do que se pensava. Por isso, ao considerar as comunidades microbianas residentes no organismo humano, é necessário empregar uma visão ecológica e holística, tendo em vista que as interações micróbio-hospedeiro são constantes e suas dimensões, consideráveis (Ursell et al., 2013).

Por décadas convencionou-se que o número de células microbianas superava as de origem humana numa razão de 10:1 no corpo humano (Luckey, 1972). Contudo, em cálculo atualizado, Sender et al. (2016) estimaram que essa proporção na realidade corresponde a 1,3 células microbianas para cada célula humana. O conjunto de micro-organismos presentes no intestino grosso (apenas um de dezenas de habitats pelo corpo humano) compõe um dos ecossistemas mais densos que se conhece, com mais de mil espécies distribuídas em aproximadamente 100 bilhões de organismos por grama de fezes (Qin et al., 2010).

Além disso – em termos de conteúdo genético, estas comunidades microbianas possuem pelo menos 100 vezes mais genes que os seres humanos, o que as torna metabolicamente mais flexíveis que o próprio genoma humano (Gilbert et al., 2018; Gill et al., 2006; Qin et al., 2012). Em estimativa realizada pelo consórcio *Metagenomics of the Human Intestinal Tract* (MetaHIT), foram reportados 3,3 milhões de genes microbianos não redundantes somente na região gastrointestinal, o que torna evidente a diversidade genética destas comunidades, sobretudo quando comparado aos 22 mil genes humanos (Qin et al., 2010).

O conjunto desses micro-organismos e seus genes, conhecido como **microbioma**, é considerado também como um “órgão esquecido” ou “o segundo genoma” (ou terceiro, se considerarmos o genoma mitocondrial), tamanha sua recém descoberta relevância para a fisiologia do hospedeiro (Backhed et al., 2005; Bocci, 1992; Bokulich et al., 2012).

Surge, portanto, a noção de que as interações entre o genoma humano e os genes da vasta e complexa microbiota sejam de suma importância para a sobrevivência. Dessa forma, o microbioma agora é tido não apenas como um dos aspectos microbiológicos associados à saúde, mas sim como uma propriedade inerente à biologia humana (Blaser, 2018).

1.1. Composição e localização do microbioma

A composição e o papel exercido pelo microbioma depende, em grande parte, do habitat que ele ocupa no organismo hospedeiro. As populações desses ambientes são formadas por representantes dos três domínios da vida – quais sejam os eucariotos, arqueias e bactérias – e seus respectivos vírus, presentes em diferentes proporções que variam conforme suas funções e interações com outros micro-organismos (Lloyd-Price et al., 2016).

O grupo das bactérias é mais amplamente estudado, uma vez que essas compõem mais de 90% do microbioma da maior parte dos habitats corporais, enquanto que os eucariotos e arqueias são representadas por espécies em menor abundância. Organismos eucariotos são representados principalmente por fungos – como *Malassezia* e *Candida*, protistas – como *Blastocystis*, e helmintos (Nash et al., 2017). Essa comunidade é designada como eucarioma ou micobioma, em referência aos fungos (Nash et al., 2017).

Muito se discute sobre o papel comensal ou benéfico do eucarioma, e evidências sugerem que seu papel como regulador do sistema imunológico pode ser importante para a prevenção de doenças autoimunes e digestivas (Luke et al., 2015). Um exemplo é que algumas espécies de fungos intestinais são capazes de substituir a função bacteriana de proteger o ambiente gastrointestinal contra patógenos invasores em modelos *in vivo* (Jiang et al., 2017). A função protetora e estimuladora do sistema imune pode ser a razão pela qual populações com maiores níveis de colonização intestinal eucariótica possuem microbiomas mais diversos e menor prevalência de doenças como asma e doença inflamatória intestinal (Audebert et al., 2016).

Em se tratando das arqueias, estas são encontradas no microbioma do trato gastrointestinal (GI), na cavidade oral, pele e pulmões, e os grupos taxonômicos que constituem o arqueoma são principalmente da ordem das *Methanobacteriales*. Apesar das caracterizações iniciais, pouco se sabe sobre a função das arqueias como integrantes do microbioma (Koskinen et al., 2017). De qualquer forma, é evidente que exercem papéis importantes para a homeostase tecidual e populacional, uma vez que demonstraram ser geneticamente adaptadas para degradação de polissacarídeos e outras fontes energéticas disponíveis no corpo humano (Samuel et al., 2007).

Por fim, o conjunto dos vírus eucarióticos e procarióticos habitantes do microbioma é chamado de viroma. O viroma é constituído principalmente por bacteriófagos e, por conta da sua natureza altamente variável, estima-se que cada pessoa possua um viroma único (Virgin,

2014). A importância do viroma é tamanha que evidências mostram que um transplante fecal estéril, contendo apenas bacteriófagos e outros metabólitos, são suficientes para restaurar a saúde intestinal de pacientes infectados por *Clostridium difficile* (Ott et al., 2017).

Entre suas atribuições, os fagos são responsáveis pelo controle populacional bacteriano e por aumentar a taxa de transferência horizontal de genes entre grupos bacterianos filogeneticamente distantes. Juntamente com mecanismos de coevolução entre fagos e bactérias, tais interações possibilitam um maior repertório metabólico para o microbioma e maiores redes de comunicação entre seus integrantes – principalmente em regiões densamente colonizadas (De Sordi et al., 2018; J. Wang, Gao, et al., 2016).

Quase todas as partes do corpo humano constituem nichos de colonização para micro-organismos, desde o trato gastrointestinal até a os pulmões (Dickson et al., 2016) (Figura 1). Em muitos órgãos, como na pele, a colonização e fixação de micro-organismos depende também dos fatores físico-químicos de cada região. Por exemplo, o microbioma de peles oleosas difere daquele de peles secas, assim como as comunidades encontradas na região dos braços não se assemelham às encontradas no rosto (Byrd et al., 2018).

Entre os diversos fatores envolvidos no equilíbrio desse ecossistema, destaca-se o papel da competição entre diferentes espécies de micro-organismos para o controle populacional. A predominância de bactérias do gênero *Lactobacillus* no microbioma vaginal, por exemplo, é tido como um biomarcador de saúde – e a competição e possível aumento de outros grupos taxonômicos em detrimento desta determina a suscetibilidade à vaginose, doença inflamatória pélvica, entre outras enfermidades (Sharma et al., 2014). Além disso, foi descrito um papel importante da composição do microbioma vaginal em gestantes para o risco de parto prematuro, podendo a baixa abundância de *Lactobacillus crispatus* estar associada ao nascimento de bebês antes da 37ª semana em mulheres de diversas ancestralidades (Fettweis et al., 2019).

Além da competição, o microbioma possui mecanismos sofisticados de controle interno de composição, como demonstrado pela identificação de agrupamentos genéticos biossintéticos que codificam para antimicrobianos (Donia et al., 2014). Isso significa que o microbioma é capaz de sintetizar moléculas antibióticas no corpo humano de modo a promover a proteção e equilíbrio do seu próprio ecossistema.

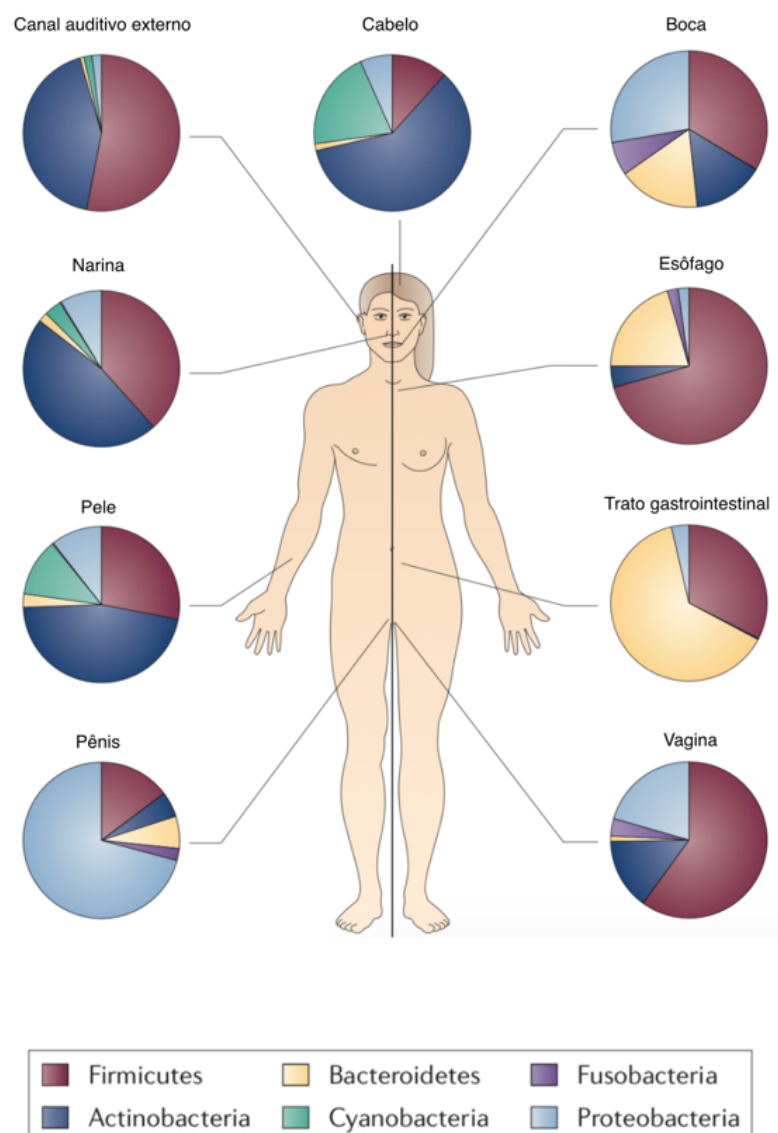


Figura 1. A composição do microbioma em diferentes regiões do corpo humano demonstrado por meio da abundância relativa de filos bacterianos. Fonte: adaptado de Blum (2017).

Além disso, o microbioma também parece estar presente em regiões antes consideradas estéreis. Evidências reportadas por Aargard et al. (2014) descrevem a composição do microbioma placentário como similar àquela encontrada na região oral, que sugere transferência de microbiota da boca para a placenta durante a gestação. Outros pesquisadores, no entanto, argumentam que a região não possui colonização microbiana e que as evidências podem, na verdade, indicar contaminação experimental ou do ambiente extrauterino (Goffau et al., 2019; Leiby et al., 2018).

Assim como a placenta, o pulmão também era tido com um órgão estritamente estéril, até recentemente. Sabe-se hoje que o ambiente pulmonar possui o microbioma composto principalmente por bactérias similares, mas não idênticas, às colonizadoras do trato respiratório superior. No caso de doenças respiratórias crônicas, como asma e fibrose cística, o microbioma pode sofrer modificações de acordo com a gravidade das inflamações e produção de muco na região, uma vez que esses efeitos exercem pressões ambientais importantes para a dinâmica populacional microbiana (Dickson et al., 2016; Segal et al., 2013).

Outros habitats no corpo humano, como é o caso da pele e da boca, estão em constante contato com micro-organismos do ar, das superfícies e dos alimentos. Logo, é evidente que a colonização bacteriana dessas regiões seja abundante e complexa. O microbioma oral, por exemplo, é o segundo maior e mais diverso *habitat* microbiano do corpo humano e possui mais de 700 espécies de micro-organismos (Bäckhed et al., 2012). Sabe-se que o microbioma da boca tem um importante papel na manutenção da saúde bucal, e que desequilíbrios nessas comunidades estão relacionados ao surgimento de cáries, periodontites, câncer e outras doenças (Abusleme et al., 2013; L. Zhang et al., 2020). Ainda, sabe-se que o microbioma da região oral tem influência direta na composição de outro ecossistema importante: o microbioma gastrointestinal (Segata et al., 2012).

1.2. Microbioma gastrointestinal

Conforme discutido anteriormente, o microbioma gastrointestinal é tido como o ecossistema mais denso que se conhece (Qin et al., 2010). Consequentemente, sua composição, repertório metabólico e influência na saúde humana possuem elevado nível de complexidade. Além de interagir constantemente com o metabolismo humano e ter importância fundamental para a homeostase fisiológica, é altamente variável entre populações e até mesmo indivíduos (Lloyd-Price et al., 2016). Entretanto, apesar da ubiquidade de micro-organismos nesse ambiente, sua composição não se dá de forma homogênea. Por possuir variadas características físico-químicas em suas diferentes porções anatômicas, o microbioma do trato gastrointestinal possui adaptações e composições específicas para colonizar cada micro-habitat (Donaldson et al., 2016).

Dessa forma, as diferentes regiões do trato GI formam um gradiente longitudinal de densidade microbiana, no qual as porções distais possuem as maiores abundâncias. Ao longo do intestino delgado, ceco e cólon, propriedades como pH, produção de antimicrobianos e disponibilidade de oxigênio são gradualmente modificadas e agem como fatores de seleção de micro-organismos (Figura 2). Portanto, o microbioma do intestino delgado, região de pH ácido, com maior disponibilidade de oxigênio e alta concentração de antimicrobianos secretados pelos ácidos biliares e enzimas digestivas, possui colonização por anaeróbios facultativos tolerantes, como é o caso da família dos *Lactobacillaceae* e *Enterobacteriaceae* (Kastl et al., 2020).

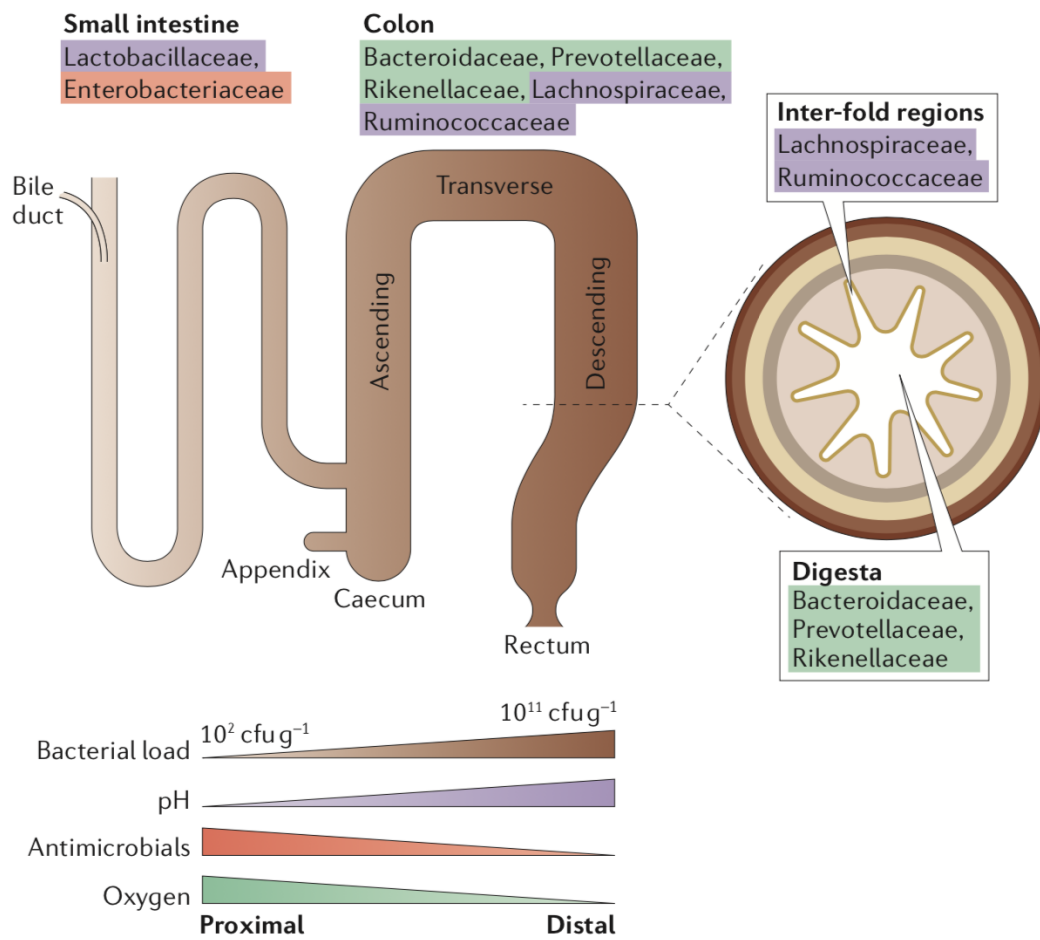


Figura 2. Biogeografia do trato gastrointestinal. Fonte: Donaldson et al. (2016).

Além disso, as pregas e vilosidades ao longo da extensão intestinal também propiciam diferentes ambientes para colonização. Bactérias aderentes a essa região se alimentam do muco secretado pelo epitélio intestinal e precisam resistir às espécies reativas de oxigênio oriundas do metabolismo mitocondrial do hospedeiro (Albenberg et al., 2014)

Em contrapartida, a região distal do trato GI possui pH menos ácido, com menor concentração de antimicrobianos e oxigênio. Assim, as bactérias colonizadoras da região são majoritariamente anaeróbias fermentadoras, como as da família das *Bacteroidaceae* e *Prevotellaceae* (Donaldson et al., 2016). Ademais, costumam metabolizar polissacarídeos

não digeríveis advindos da dieta, sendo essa uma de suas principais funções (Lloyd-Price et al., 2016).

É importante destacar que os hábitos alimentares, entre outros fatores, possuem a capacidade de alterar significativamente a composição do microbioma GI, conforme será discutido posteriormente. Todavia, independente de exposição a fatores ambientais, em níveis filogenéticos elevados o microbioma gastrointestinal é amplamente conservado e possui pouca diversidade, sendo majoritariamente dominado por dois filos, quais sejam *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (Eckburg et al., 2005). Em maiores níveis de resolução taxonômica, como gêneros, espécies e cepas, a diversidade do microbioma toma proporções consideráveis, chegando a ser composto por 1.000 espécies diferentes (Qin et al., 2010).

A ampla diversidade taxonômica do microbioma GI humano é reforçada pelo fato de até 70% dos micro-organismos colonizadores deste *habitat* nunca terem sido cultivados em laboratório ou terem tido suas funções descritas (Almeida et al., 2020). Dessa forma, pouco se sabe sobre as reais capacidades metabólicas, as interações e as funções do microbioma intestinal. Em referência ao termo astronômico, essa porção não caracterizada do microbioma ambiental e humano ficou conhecida como “matéria escura” microbiana (Rinke et al., 2013).

Com o intuito de preencher essa lacuna no conhecimento da composição do microbioma, utiliza-se comumente a estratégia de estabelecer o chamado “*core microbiome*”, que pode ser definido como o conjunto central ou nuclear de micro-organismos ou funções comuns a uma determinada população (Lloyd-Price et al., 2016). Resumidamente, essa abordagem baseia-se no sequenciamento metagenômico de amostras representativas de cada *habitat* microbiano e sua posterior caracterização taxonômica e/ou funcional. Com os resultados, objetiva-se compreender de que forma os papéis desempenhados pelo microbioma auxiliam na adaptação e sobrevivência do indivíduo em diversos contextos ambientais e etapas de desenvolvimento (The Human Microbiome Project Consortium, 2012).

1.3. Formação e funções do microbioma GI

O estabelecimento de uma comunidade microbiana tem seu início desde os primeiros instantes de vida extrauterina e evidências sugerem que sua manutenção e maturação ao longo da vida adulta dependem significativamente dos eventos ocorridos logo após o nascimento e durante os primeiros anos de desenvolvimento (Dominguez-Bello et al., 2019).

Por exemplo, uma das primeiras interações do recém-nascido com o universo microbiano ocorre em função da via de nascimento. O conteúdo microbiológico do intestino de uma criança nascida de parto vaginal se assemelha ao da vagina, pele e intestino de sua mãe (Bäckhed et al., 2015). Essa observação foi constatada principalmente para bactérias do gênero *Bacteroides* durante os primeiros meses de vida, cujo papel nessa fase é estimular a maturação do sistema imunológico e tornar o trato GI mais resistente a infecções por micro-organismos patogênicos (Bäckhed et al., 2015).

Por outro lado, crianças nascidas via cesárea apresentam menor abundância de gêneros herdados pela mãe. Ainda, essa via de nascimento promove a colonização abundante de micro-organismos patogênicos oportunistas, como observado por Shao et al. (2019) num estudo composto por quase 600 pares de bebês e suas mães. A presença de gêneros enteropatogênicos como *Enterobacter*, *Enterococcus* e *Klebsiella* encontrados no trato GI desses recém-nascidos é um indício da vulnerabilidade de seus microbiomas à infecção por micro-organismos típicos de ambientes hospitalares. Esse mesmo padrão foi observado, em menor grau, em bebês nascidos por parto vaginal cuja mãe havia sido tratada com antibióticos de forma profilática e naqueles que não receberam aleitamento materno no período neonatal, enfatizando a importância da amamentação para a formação inicial do microbioma (Shao et al., 2019).

O leite materno possui na sua composição açúcares específicos cuja metabolização é realizada quase exclusivamente por bactérias do microbioma, os quais são utilizados como

fonte de energia por bactérias do gênero *Bifidobacterium longum*, que promovem efeitos benéficos, como proteção contra patógenos, maturação de células do epitélio intestinal e desenvolvimento do sistema imunológico pela estimulação da produção de células T regulatórias e imunoglobulina A (IgA) (Arpaia et al., 2013). Crianças alimentadas com fórmulas infantis são colonizadas por outras espécies de *Bifidobacterium* e outros grupos taxonômicos, incluindo *Clostridium difficile* (Dominguez-Bello et al., 2019; Timmerman et al., 2017).

Vários fatores são decisivos para a formação do microbioma no período do desenvolvimento infantil, que é marcado por sucessivas colonizações e transições microbianas (Wampach et al., 2017). Alterações nesse processo finamente orquestrado podem ter efeitos duradouros para a saúde do hospedeiro, uma vez que o microbioma ainda não atingiu a maturidade e estabilidade de um adulto (Tamburini et al., 2016). Como mostrado em grandes coortes, a exposição a antibióticos na infância leva a um aumento no risco de sobrepeso, do índice de massa corpórea (IMC) e de adiposidade central ao longo da vida (Ajslev et al., 2011; Azad et al., 2014). Ademais, práticas como a constante higienização com sabonetes antibacterianos e a ingestão de alimentos contendo conservantes bactericidas também podem contribuir para a alteração do microbioma infantil e ter efeitos de longo prazo (Cox & Blaser, 2015).

A partir dos três anos de vida, o microbioma infantil passa a ter uma composição semelhante ao de um adulto (Yatsunenko et al., 2012). Isso provavelmente se deve ao padrão alimentar mais diverso e à maturação do sistema imunológico adaptativo. Na vida adulta, o microbioma é caracterizado por certa estabilidade, e é quando características como resistência (a capacidade de evitar desequilíbrios) e resiliência (a capacidade de voltar ao equilíbrio após perturbações) se tornam importantes para a manutenção da saúde do hospedeiro (Bäckhed et al., 2012).

Naturalmente, ao longo da vida ocorrem variações nessa comunidade, seja por adoecimento, mudança de estilo de vida, ingestão de medicamentos, dietas, entre outros fatores. David et al. (2014) analisaram a dinâmica microbiana do intestino de dois indivíduos diariamente ao longo de um ano e constataram que apesar de estável, o microbioma GI pode ser profundamente impactado por experiências e alterações cotidianas, como viagens internacionais e infecções alimentares por *Salmonella* (David et al., 2014).

Em situações de equilíbrio, o conjunto de bactérias comensais compete com bactérias patogênicas de forma física (por espaços ou nutrientes) e química, produzindo fatores antimicrobianos – como bacteriocinas, ou pela produção de metabólitos secundários (Corr et al., 2007; Jacobson et al., 2018; Smith et al., 2013).

Quando as comunidades bacterianas do intestino não são capazes de se restaurarem após alterações no equilíbrio, o microbioma entra num estado denominado disbiose, causado por fatores como a perda substancial de bactérias comensais, colonização persistente de organismos patogênicos e consequente perda de diversidade (Levy et al., 2017). Logo, a depleção de bactérias benéficas, seja por antibióticos ou outros efeitos ambientais, é uma forma de burlar a resistência à colonização inerente ao microbioma e comprometer suas principais funções.

Os efeitos sistêmicos produzidos pelo microbioma saudável se devem principalmente aos metabólitos por ele produzidos, como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (G. T. Macfarlane & Macfarlane, 2012). Os AGCC são o produto da fermentação de carboidratos não degradados pelas enzimas digestivas humanas, como as fibras e o amido resistente, e constituem o principal integrador do metabolismo microbioma-hospedeiro. Majoritariamente por meio da ativação dos receptores de membrana acoplados à proteína G, são utilizados para diversos processos celulares humanos (Koh et al., 2016; Ríos-covián et al., 2016). Os principais AGCC metabolizados pelas bactérias intestinais são o acetato, butirato e

propionato, que compõem mais de 95% desse tipo de molécula no trato GI (S. Macfarlane & Macfarlane, 2003).

Em maior ou menor grau, todos os AGCC constituem fonte de energia para as células da mucosa intestinal e interagem diretamente com o sistema imune, pois promovem a expansão e diferenciação de células T regulatórias e a regulação da produção de citocinas, entre outros mecanismos (Levy et al., 2017; Smith et al., 2013). Além disso, possuem conexão direta com outros sistemas – como fígado, pâncreas, cérebro e tecido adiposo – e estão associados à prevenção do acúmulo de gordura corporal, aumento da sensação de saciedade e diminuição da resistência à insulina (Canfora et al., 2015; Y. P. Silva et al., 2020). No ambiente intestinal também promovem a proteção contra patógenos por estimularem a renovação de células intestinais e produção de muco, além de aumentarem o pH do cólon (Koh et al., 2016; G. T. Macfarlane & Macfarlane, 2012; Morrison & Preston, 2016). Por fim, são importantes fatores de proteção em doenças como diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e câncer pois induzem a apoptose de células tumorais (Harstra et al., 2015; OKeefe et al., 2015).

A abundância e forma de utilização de cada um dos AGCC dependerá de quais nutrientes estão disponíveis para degradação bacteriana e quais grupos taxonômicos estão presentes no intestino. Baixa ingestão de fibras, portanto, modificam o metabolismo bacteriano, que passam a buscar outras fontes de nutrientes, como muco e proteínas endógenas, podendo causar danos à saúde do hospedeiro, como resistência insulínica e inflamação intestinal (Makki et al., 2018; Martens et al., 2008; Yatsunenko et al., 2012).

Diante disso, a dieta é considerada o principal fator modulador do microbioma GI, uma vez que tem o poder de selecionar e modificar a expressão gênica dos micro-organismos presentes. Diversos estudos têm observado que pessoas e populações com dietas ricas em fibras e vegetais tendem a possuir um microbioma diverso e considerado saudável, ao passo

que o alto consumo de gorduras, proteína animal e alimentos processados está associado a padrões de adoecimento (Glick-bauer & Yeh, 2014; OKeefe et al., 2015; Schnorr et al., 2014).

Por exemplo, numa comparação entre microbiomas GI de indivíduos seguidores de dietas vegetarianas, veganas e onívoras, Glick-Bauer e Yeh (2014) observaram menor abundância de espécies patogênicas e maior de espécies protetoras nos indivíduos que se alimentam exclusivamente de vegetais. De forma similar, De Filippis et al. (2015) analisaram o microbioma de pessoas que baseiam sua alimentação num padrão mediterrâneo e outras que possuem hábitos alimentares tipicamente ocidentais. A dieta mediterrânea caracteriza-se pelo alto consumo de fibras, vegetais, frutas, moderado consumo de peixes e raro consumo de alimentos processados e carne vermelha, enquanto a alimentação ocidental é rica em gorduras, proteínas e alimentos processados, com baixa ingestão de fibras. Os resultados revelaram maior produção de AGCC entre os adeptos da alimentação mediterrânea, o que reflete a seleção de bactérias especializadas na degradação de fibras vegetais não digeríveis (De Filippis et al., 2015; Tindall et al., 2018).

A especialização do microbioma GI também pode se dar pela obtenção de novas formas de adquirir energia a partir dos nutrientes disponíveis na dieta, conforme constatou-se na população japonesa. Hehemann et al (2010) observaram que uma das bactérias do grupo *Bacteroides* presentes no intestino de indivíduos do Japão possui uma enzima especializada na degradação de fibras presentes nas algas marinhas. Os pesquisadores concluíram que a enzima foi adquirida por transferência horizontal a partir da bactéria *Zobellia galactanivorans*, que vive principalmente em algas marinhas tradicionalmente utilizadas no preparo do sushi, e que o fato desse gene não ter sido encontrado em indivíduos não-japoneses comprova a adaptação do microbioma ao estilo de vida asiático (Hehemann et al., 2010).

Dada a seleção bacteriana promovida pela dieta e estilo de vida, frequentemente grupos de indivíduos costumam se enquadrar no que chamamos de “enterotipos”, que

consistem em subgrupos de microbiomas representados pela prevalência de um ou mais grupos taxonômicos específicos (Arumugam et al., 2011). Tais grupos taxonômicos são como biomarcadores de determinados perfis microbianos e têm sido úteis para categorizar perfis microbiológicos individuais. Por exemplo, um dos principais gêneros bacterianos sinalizadores de uma alimentação rica em fibras é *Prevotella*, grupo especializado na degradação de polissacarídeos vegetais, enquanto que *Bacteroides* tem sido comumente descrito entre indivíduos com padrões alimentares ocidentalizados ou pobres em fibras, uma vez que constitui um grupo resistente à bile, tornando-se prevalente em dietas ricas em gorduras (David et al., 2014; Fehlner-Peach et al., 2019).

Considerando as complexas relações entre o microbioma e fatores ambientais do hospedeiro, é evidente que a diversidade populacional tenha um importante papel na determinação da composição do microbioma. Existem poucas evidências validadas, entretanto, do papel da genética humana no desenvolvimento e composição do microbioma.

Goodrich et al. (2014), em estudo com gêmeos monozigóticos e dizigóticos, identificaram que a família bacteriana *Christensenellaceae* é o grupo taxonômico mais herdável do microbioma GI, e que está significativamente associada a menores IMC. Posteriormente, os autores observaram que genes relacionados à composição do microbioma são aqueles envolvidos em dieta e metabolismo (Goodrich et al., 2016). Por exemplo, a presença da bactéria ácido-lática *Bifidobacterium* parece estar relacionada ao gene *LCT*, que produz lactase para degradação do leite. Indivíduos não produtores de lactose (e que se alimentam de laticínios) possuem maior abundância de *Bifidobacterium*, uma vez que a lactose persiste no intestino grosso como nutriente disponível para sua metabolização (Goodrich et al., 2016).

Adicionalmente, um estudo de associação metagenômica (mGWAS, do inglês Metagenomic Association Studies) identificou 42 *loci* no genoma humano que possuíam associação com medidas de composição, que em conjunto eram responsáveis por 10% da

interindividualidade microbiana. Entre os genes observados como importantes, estavam *VDR*, *LCT*, *FUT2* e *NOD2*, mas não apresentaram resultados significativos a nível genômico (J. Wang, Thingholm, et al., 2016).

Evidências mostram que diversos fatores ambientais além da dieta e medicamentos também podem ter um efeito importante para o microbioma, como o convívio com animais domésticos e de pecuária, relações interpessoais com cônjuges e tabagismo (Dill-McFarland et al., 2019; Mosites et al., 2017; Nolan-Kenney et al., 2020; Tun et al., 2017). Logo, caracterizações microbianas a nível global – incluindo populações em diversos contextos sociais e ambientais – são importantes para a elucidação dos efeitos sistêmicos na relação microbioma-hospedeiro.

1.4. Diversidade populacional

Ao longo de toda a história, o microbioma humano precisou se adaptar às novas condições ambientais impostas pelo estilo de vida do hospedeiro (Tito et al., 2012). Anteriormente vivendo como caçadores-coletores, a partir da revolução neolítica há 10 mil anos, o modo de subsistência humano mudou drasticamente com a domesticação e cultivo de plantas e animais (Cordain et al., 2005).

Para compreender de que forma o microbioma acompanha e reage às novas demandas ambientais ao longo da história, seria útil caracterizar o microbioma dos povos do passado. Entretanto, pouco se sabe sobre a constituição do microbioma GI dos humanos que habitaram a terra nos últimos milhares de anos; o que sabemos atualmente é fruto de pesquisas realizadas em remanescentes arqueológicos humanos, por meio da análise microbiológica de coprólitos (fezes fossilizadas) ou do trato GI de espécimes bem conservados, mas a integridade do material biológico é frequentemente uma limitação (Warinner et al., 2015).

O célebre homem de gelo ou Ötzi, como foi denominado, foi um homem que viveu na Europa há aproximadamente três mil anos e teve seu corpo mumificado pelas condições climáticas. O microbioma da região distal do seu intestino foi analisado por Lugli et al. (2017) e os dados possibilitaram a descrição de parte do genoma de algumas espécies presentes, como do gênero *Clostridium* e *Pseudomonas*, que aparentam ser enteropatogênicas.

Adicionalmente, Tito et al. (2012) investigaram o microbioma de coprólitos encontrados em esqueletos humanos de sítios arqueológicos dos Estados Unidos (8.000 anos Antes do Presente – A.P.), Chile (1.600 anos A.P.) e México (1.400 anos A.P.). Os resultados foram comparados aos dados disponíveis para populações atuais e, curiosamente, revelaram que o microbioma dos indivíduos que viveram no passado se assemelha àquele descrito para populações tradicionais do presente, como os Hazda da Tanzânia (Schnorr et al., 2014). O fato de populações tradicionais contemporâneas terem o microbioma similar ao de populações pré-históricas sugere que as populações tradicionais como os Hazda podem ser investigadas como um parâmetro de caracterização do que seria o microbioma ancestral (Blaser & Falkow, 2009; Schnorr et al., 2016)

Os Hazda são um dos últimos povos caçadores-coletores que se conhece, e habitam região oriental do continente africano. Essa população possui hábitos alimentares baseados em tubérculos ricos em fibra, frutas, castanhas e caça de animais silvestres, e seus microbiomas GI são abundantes em táxons como *Prevotella* e *Treponema* (Schnorr et al., 2014). Assim como outros grupos de caçadores-coletores, como os Sandawe da Tanzânia, os Hazda apresentam o microbioma GI mais diverso quando comparado às populações industrializadas, como a dos Estados Unidos ou da Itália (Hansen et al., 2019; Schnorr et al., 2014; Yatsunenko et al., 2012).

As diferenças entre o microbioma GI de indivíduos que praticam modos de subsistência tradicionais e de indivíduos vivendo em áreas urbanas, sobretudo em relação à diversidade, têm chamado atenção (Blaser & Falkow, 2009). Durante o século XX, seres

humanos modificaram drasticamente seus hábitos alimentares e de higiene. A introdução e expansão do uso de antibióticos, aumento do saneamento e saúde pública, associados à incorporação de alimentos processados na dieta propiciaram mudanças drásticas no microbioma (Blaser, 2018).

Tais mudanças podem ser observadas pelo emprego de alguns biomarcadores, como a diminuição da prevalência de *Helicobacter pylori* no microbioma gástrico e a troca entre *Prevotella* e *Bacteroides* no trato GI de populações industrializadas (Dominguez-Bello & Blaser, 2011; Yatsunenko et al., 2012). O mais alarmante, entretanto, é a perda de espécies observada entre algumas populações.

Por exemplo, os indígenas Guahibo da Venezuela e a população rural do Malawi apresentam microbiomas semelhantes entre si quando comparados ao microbioma de moradores da Philadelphia, nos Estados Unidos. Tais semelhanças se devem principalmente ao maior número de espécies e à presença de bactérias especializadas na degradação de polissacarídeos vegetais (De Filippo et al., 2017; Yatsunenko et al., 2012). O mesmo padrão de diferenças foi observado na comparação entre os indígenas Matsigenka, do Peru e os Tunapuco, da região dos Andes com indivíduos dos Estados Unidos (Obregon-tito et al., 2015).

A perda de diversidade no microbioma dos Estadunidenses gera preocupação, pois quanto maior a diversidade de espécies, maior o repertório enzimático microbiano, favorecendo a obtenção de energia e a metabolização de AGCC, gerando benefícios para a saúde. Além disso, microbiomas mais diversos são mais resilientes, pois possuem diferentes formas de competição e a probabilidade de haver redundâncias metabólicas são maiores (Larsen & Claassen, 2018).

Outros povos urbanos e semi-rurais, entretanto, também apresentaram tais características, como foi observado entre nigerianos e camaroneses vivendo em um gradiente de urbanização (Ayeni et al., 2018; Lokmer et al., 2020). Dessa forma, mesmo

vivendo no mesmo país, indivíduos podem apresentar diferentes microbiomas GI dependendo de onde estão no “espectro” de urbanização. Jha et al. (2018), por exemplo, caracterizaram o microbioma de quatro grupos, entre agricultores e coletores, vivendo aos pés do Himalaia. Os resultados mostraram que os Tharu, cuja vida agrícola e sedentária havia se iniciado há 250 anos, se assemelham mais a uma população urbana do que os Raute e Raji, que deixaram de ser caçadores-coletores há apenas 30-40 anos. Tais constatações são indícios de que é possível observar uma linha do tempo na transição de um microbioma tradicional para urbano e que esse processo ocorre de forma gradual.

Para testar a hipótese de que a dieta é capaz de induzir tais extinções microbianas, Sonnenburg et al. (2016) modificaram a dieta de camundongos de modo a diminuir a ingestão de fibras ao longo de múltiplas gerações. Na segunda geração, os pesquisadores observaram a redução na abundância de micro-organismos degradadores de polissacarídeos vegetais, mas que logo aumentou com a reintrodução da dieta rica em fibras e carboidratos não digeríveis. Entretanto, nas gerações seguintes, a reintrodução de fibra na dieta dos roedores não foi suficiente para aumentar a abundância dos micro-organismos especializados, mostrando que a extinção microbiana é cumulativa e ocorre ao longo das gerações (E. D. Sonnenburg et al., 2016).

Essas evidências mostraram que a transmissão vertical do microbioma é importante para o estabelecimento das comunidades, e que a manutenção delas depende da dieta. Portanto, dados os hábitos em contextos industrializados e urbanos, tanto a aquisição vertical de micro-organismos (como pelo parto vaginal e amamentação) quanto a dieta, limitam drasticamente o contato com um microbioma diverso e rompem padrões ancestrais da relação microbioma-hospedeiro (Blaser & Falkow, 2009; J. L. Sonnenburg & Sonnenburg, 2019; Yatsunencko et al., 2012) (Figura 3).

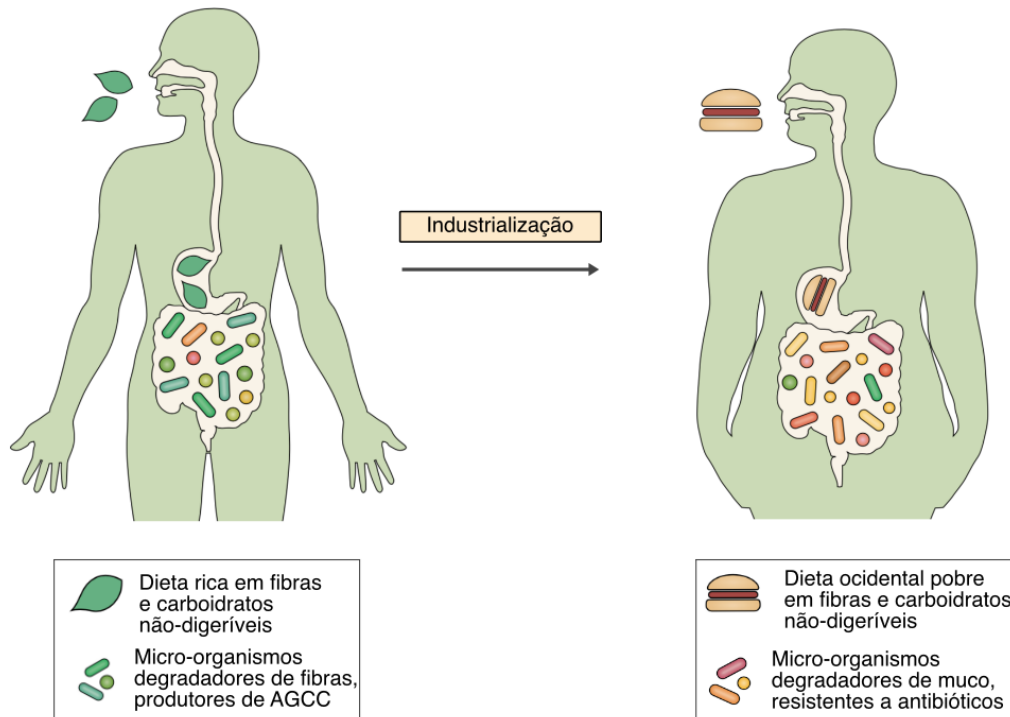


Figura 3. A influência da transição de estilo de vida tradicional para industrializado na formação e funções do microbioma gastrointestinal. Fonte: adaptado de Sonnenburg e Sonnenburg (2019).

Vangay et al. (2018) analisaram o impacto da imigração aos Estados Unidos no microbioma de uma população tailandesa antes da chegada, logo após a instalação e residentes de primeira e segunda geração. Seus resultados revelaram que a emigração de uma região não-industrializada para os Estados Unidos causou efeitos imediatos na diminuição da diversidade microbiana, com queda na abundância de *Prevotella* e aumento de *Bacteroides*. Constatou-se, ainda, o aumento na prevalência de obesidade como consequência dessas mudanças para indivíduos residentes e de primeira e segunda geração de imigrantes (Vangay et al., 2018)

Posteriormente, ao comparar o microbioma de crianças urbanas e rurais da Burkina Faso com crianças Italianas, De Filippo et al. (2017) corroboraram a importância da dieta na determinação do microbioma GI. Seus resultados revelaram que crianças urbanas possuem maiores semelhanças entre si independente de localização geográfica e pertencimento

étnico, uma vez que o microbioma de crianças urbanas da Burkina Faso se assemelha mais ao microbioma urbano da Itália e não do microbioma das regiões rurais do mesmo país (De Filippo et al., 2017; Filippo et al., 2010).

Em relação às populações sul-americanas, foram descritos o microbioma de indivíduos urbanos da Argentina, Chile, Colômbia e Rio de Janeiro, no Brasil (Belforte et al., 2019; Escobar et al., 2015; Fujio-Vejar et al., 2017; Pires et al., 2019). Os resultados mostram que a composição do microbioma urbano do Chile, Argentina e Rio de Janeiro são semelhantes ao que foi descrito para populações industrializadas de outros continentes, como América do Norte e Europa. A população colombiana não mostrou grandes semelhanças com outras populações, mas todos os grupos urbanos mencionados aparentam ser distintos das populações tradicionais e rurais, como os indígenas Yanomami, Matses e Tsimané, a população andina Tunapuco, e os ribeirinhos de Buiúçu e Puruzinho, do estado brasileiro do Amazonas (Clemente et al., 2015; Obregon-tito et al., 2015; Pires et al., 2019; D. D. Sprockett et al., 2019).

Conforme diferentes grupos populacionais são caracterizados em variados contextos de subsistência (Tabela 1), algumas características frequentes em microbiomas tradicionais têm sido estabelecidas. Conforme mencionado anteriormente, a diversidade, medida em riqueza/número de espécies, costuma ser maior nessas populações, como foi observado nos indígenas Yanomami da Venezuela, que possuem o microbioma GI mais diverso já registrado entre populações humanas (Clemente et al., 2015). A presença de parasitas intestinais como *Entamoeba* spp. e helmintos também estão associados à maior diversidade em populações rurais (Morton et al., 2015; Rubel et al., 2020).

Além disso, microbiomas tradicionais também são mais compartilhados entre indivíduos quando comparados a populações industrializadas. Isso significa que pessoas de uma mesma comunidade tradicional comumente apresentam grupos taxonômicos e abundâncias semelhantes nos seus microbiomas GI, como é o caso dos Asari, da Papua

Nova Guiné, e dos BaAka, da República Centro-africana (Gomez et al., 2016; Greenhill & Walter, 2015). No caso de indivíduos urbanos, as práticas de higiene, diminuição do contato social e pouco compartilhamento de alimentos não favorecem a dispersão de micro-organismos, aumentando as disparidades interindividuais (Ayeni et al., 2018; De Filippo et al., 2017).

A depender do modo de subsistência, também é possível observar variações no microbioma GI em função de gênero. Nos Hazda, por exemplo, as mulheres possuem maior abundância de gêneros como *Treponema* e *Prevotella*, ao passo que os homens possuem maior prevalência de *Blautia* (Schnorr et al., 2014). Conforme discutido pelos autores, essas diferenças provavelmente se devem às divisões de trabalho, uma vez que as mulheres são responsáveis por coletar frutas e vegetais, enquanto os homens são responsáveis pela caça.

Tabela 1. Principais pesquisas visando caracterizar o microbioma GI de populações mundiais tradicionais ou em urbanização.

Populações	Continente	N	Subsistência	Metodologia	Referência
Indígenas Guahibo (Venezuela), Malawi e Estados Unidos	América do Sul, África e América do Norte	326	Venezuela: rural Malawi: rural (milho) Estados Unidos: industrializado	16S (V4) + Metagenomic shotgun pyrosequencing	(Yatsunenko et al., 2012)
Metrópoles e vilarejos da Rússia	Ásia	96	São Petersburgo, Saratov, Rostov-on-Don, Novosibirsk: industrializado Tatarstan, Omsk, Tyva: rural	Metagenomic shotgun pyrosequencing	(Tyakht et al., 2013)
Bangladesh e Estados Unidos	Ásia e América do Norte	14	Bangladesh: industrializado (urban slums, ou favelas) Estados Unidos: industrializado	16S (V1-V3)	(Lin et al., 2013)
Indígenas Hazda (Tanzânia) e Bologna, Itália	África e Europa	46	Hazda: caçadores-coletores Itália: industrializado	16S (V4)	(Schnorr et al., 2014)
Metrópoles e vilarejos da Mongólia	Ásia	320	Ullan Bator: industrializado TUW: industrializado Khentii: nômades	Metagenomic pyrosequencing + qPCR	(J. Zhang et al., 2014)
Indígenas Yanomami (Venezuela)	América do Sul	34	Caçadores-coletores semi-nômades	16S (V4)	(Clemente et al., 2015)
Comunidades rurais da Papua Nova Guiné	Oceania	40	Asaro e Sausi: rural agrícola	16S (V5-V6)	(Greenhill & Walter, 2015)
Indígenas Matses (Peru), Tunapuco (Andes), Estados Unidos	América do Sul e América do Norte	79	Matses: caçadores-coletores Tunapuco: rural agrícola Estados Unidos: industrializado	16S (V4) + Shotgun	(Obregon-tito et al., 2015)
Pigmeus e Bantus de Camarões	África	64	Bantu: rural agrícola Pigmeus: caçadores-coletores	16S (V5-V6)	(Morton et al., 2015)
Indígenas Chayenne e Arapaho	América do Norte	38	Rural + alimentos processados	16S (V4)	(Sankaranarayanan et al., 2016)

Populações	Continente	N	Subsistência	Metodologia	Referência
Pigmeus BaAka e Bantu da República Centro-africana	África	57	BaAka: caçadores-coletores Bantu: rural agrícola	16S (V1-V3)	(Gomez et al., 2016)
Tibetanos e Han Chineses em diferentes altitudes	Ásia	68	Tibetanos (4800m): pastoralistas Tibetanos (3600m): camponeses Han (3600m): rural Han (500m): rural	16S (V1-V3)	(K. Li et al., 2016)
Indígenas Inuit do Ártico e Montreal, Canadá	América do Norte	45	Inuit: pescadores/caçadores Montreal: industrializado	16S (V4)	(Girard et al., 2017)
Indígenas Hazda (Tanzânia) – estudo longitudinal	África	350	Caçadores-coletores	16S + Shotgun	(Smits et al., 2017)
Província de Hunan, China	Ásia	40	Rural e industrializado	16S (V4)	(Winglee et al., 2017)
Burkina Faso e Itália	África e Europa	37	Nanoro: rural Ouagadougou: industrializado Florença: industrializado	16S (V5-V6)	(De Filippo et al., 2017)
Nigéria	África	48	Bassa: rural agrícola Ilorin, Abeokuta, Ado Ekiti, Ibadan, Abuja: industrializado	16S (V3-V4) + Metaboloma	(Ayeni et al., 2018)
Tibetanos rurais pastoralistas	Ásia	24	Gradiente de urbanização	16S (V4-V5)	(H. Li et al., 2018)
Comunidades rurais no Himalaya	Ásia	54	Gradiente de urbanização	16S (V4)	(Jha et al., 2018)
Indianos em diferentes altitudes	Ásia	84	Ballabgarh: rural e industrializado Leh: rural	16S (V1-V5)	(Das et al., 2018)

Populações	Continente	N	Subsistência	Metodologia	Referência
Hazda, Maasai, Sandawe, Burunge (Tanzânia) e San, Bantu, Herero (Bostwana)	África	126	Hazda, San: caçadores-coletores Maasai, Herero: pastoralistas Burunge, Bantu: agropastoril Sandawe: caçadores-coletores/agropastoril	16S (V1-V2)	(Hansen et al., 2019)
Rio de Janeiro, Buiçu e Puruzinho (Amazonas, Brasil)	América do Sul	43	Rio de Janeiro: industrializado Buiçu, Puruzinho: ribeirão	16S (V4) + Metaboloma	(Pires et al., 2019)
Indígenas Tsimané, Bolívia	América do Sul	104	Rural agrícola	16S (V4)	(D. Sprockett et al., 2018)
Mbalmayo, Yaoundé, Ngoantet de Camarões	África	147	Yaoundé: industrializado Mbalmayo: semi-urbano Ngoantet: rural	16S (V4)	(Lokmer et al., 2020)
Populações rurais e tradicionais de Camarões	África	575	Fulani: pastoralista, Baka, Bagyeli: caçadores-coletores Bantu: agropastoril	16S (V4)	(Rubel et al., 2020)

Em estudo longitudinal, Smits et al. (2017) observaram que o microbioma desses caçadores-coletores também sofre variações conforme as estações seca e chuvosa. Essa dinâmica sazonal é cíclica e provoca o aumento na abundância de alguns grupos taxonômicos e diminuição de outros ao longo do ano, dependendo dos nutrientes disponíveis por meio dos alimentos coletados na natureza.

O conjunto de grupos taxonômicos associados a populações não-ocidentalizadas foi denominado VANISH (do inglês, *Volatile and/or Associated Negatively with Industrialized Societies of Humans*), e consiste na presença de membros das famílias *Prevotellaceae*, *Spirochaetaceae* e *Succinivibrionaceae* (J. L. Sonnenburg & Sonnenburg, 2019). Outras características que distinguem microbiomas industrializados e tradicionais estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Características que comumente diferenciam o microbioma gastrointestinal de populações tradicionais e urbanas. Fonte: Sonnenburg e Sonnenburg (2019).

Características	Populações tradicionais	Populações urbanas
Táxons VANISH	Abundantes	Raros
<i>Akkermansia muciniphila</i>	Raro	Abundante
Abundância de Bacteroides	Baixa	Alta
Diversidade filogenética	Alta	Baixa
Diversidade enzimática	Alta	Baixa
Dinâmica sazonal	Presente	Ausente

A urbanização tem levado o microbioma GI de populações em diversos continentes a sofrer uma evolução convergente, saindo de um estado com alta diversidade taxonômica e metabólica para um padrão pouco diverso e com abundância de micro-organismos patogênicos (Winglee et al., 2017). Blaser (2018) argumenta que o microbioma humano é mais um elemento da biodiversidade que acompanha a era de extinções, como o oceano e as mudanças climáticas.

Por milhares de anos, o microbioma GI esteve adaptado a degradar carboidratos de fontes vegetais, enquanto o genoma e metabolismo humano esteve adaptado à presença desses micro-organismos e seus produtos, como os AGCC, favorecendo uma relação mutualística. Numa sociedade que limita a quantidade de carboidratos acessíveis às bactérias, a consequência é o desaparecimento e modificação do microbioma (E. D. Sonnenburg & Sonnenburg, 2019).

A evolução do microbioma reflete grandes eventos na história humana e, nos últimos 250 anos, o ser humano tem modificado seu ambiente, e consequentemente seu microbioma, a uma velocidade que torna difícil o genoma acompanhar. Uma vez que o genoma humano não possui a dinamicidade e a plasticidade dos genomas bacterianos, a relação microbioma-hospedeiro parece estar divergindo (Greenhill & Walter, 2015).

Sonnenburg & Sonnenburg (2019) propõem o termo “Síndrome da Insuficiência de Microbiota” para descrever a perda de diversidade microbiana e de suas funções importantes para seres humanos ancestrais nas populações contemporâneas ocidentais. Essa perda de micro-organismos parece estar por trás do aumento na prevalência de doenças crônicas não-transmissíveis nos últimos séculos. Por exemplo, a incompatibilidade do microbioma com o genoma humano pode fazer com que os metabólitos produzidos pelo microbioma industrializado causem inflamação no hospedeiro, levando a perturbações metabólicas – como alta incidência de síndromes metabólicas, obesidade, DM2, além de resistência a antibióticos, entre outras (Blaser, 2018).

1.5. Microbioma GI e o adoecimento

Os mecanismos pelos quais o desequilíbrio do microbioma pode levar ao desenvolvimento de doenças é complexo e geralmente está relacionados aos processos imunológicos do trato gastrointestinal ou aos metabólitos produzidos pela degradação de

nutrientes ingeridos pelo hospedeiro (Levy et al., 2017; Tindall et al., 2018). Estudos de associação têm demonstrado que o microbioma GI está alterado em diversas doenças e, embora não seja sempre uma comprovação de causalidade, podem auxiliar na compreensão de seus mecanismos e no desenvolvimento de tratamentos.

Algumas pesquisas realizadas em modelos animais, entretanto, observaram um papel crucial do microbioma para doenças metabólicas, cardiovasculares e outras doenças crônicas não-transmissíveis como a obesidade. Por exemplo, Turnbaugh et al. (2006) publicaram a primeira associação entre o microbioma GI e a obesidade ao demonstrar a possibilidade de transplantar o fenótipo de obesidade para camundongos estéreis. Os animais receberam comunidades microbianas de gêmeos obesos e não-obesos e aqueles com o microbioma de indivíduos obesos desenvolveram maior adiposidade e ganho de peso, enquanto que os camundongos colonizados pelo microbioma do gêmeo não-obeso não apresentaram esse fenótipo. Posteriormente, ao reproduzir essa pesquisa, Ridaura et al. (2013) propuseram que a composição do microbioma de indivíduos obesos pode proporcionar maior capacidade de obtenção de energia (ou seja, fermentação de carboidratos e produção de AGCC) a partir da alimentação.

Além disso, o microbioma também pode estar envolvido na obesidade por meio da modulação da expressão gênica bacteriana e na regulação da sinalização de apetite e saciedade no cérebro (Cuevas-Sierra et al., 2019). Em geral, estudos apontam a prevalência de alguns grupos taxonômicos em indivíduos obesos, como maior razão *Firmicutes/Bacteroidetes* além de maior abundância de *Proteobacteria*, *Mollicutes*, e menos *Verrucomicrobia*, *Faecalibacterium*, *Bacteroidetes*, entre outros (Crovesy et al., 2020). A presença de *Lachnospiraceae* e *Streptococcus* também está associada ao risco cardiometabólico em populações africanas e dos Estados Unidos, enquanto que *Faecalibacterium* e *Oscillospira* foram mais abundantes em pessoas saudáveis (Fei et al., 2019).

É possível perceber que estudos encontraram associações divergentes entre os táxons específicos que podem ou não causar um fenótipo de adoecimento. Entretanto, é importante lembrar que o metabolismo bacteriano, muitas vezes redundante entre espécies, possui um papel crucial nos estados de saúde (I. Cho & Blaser, 2012). Por exemplo, um dos metabólitos produzidos pelo microbioma, o óxido de trimetilamina (TMAO) é conhecidamente uma molécula pró-aterogênica (Koeth et al., 2013). O TMAO é o produto da metabolização microbiana da colina e L-carnitina, cujas principais fontes dietéticas são carne vermelha, fígado, ovos e leite. Um estudo *in vivo* demonstrou que a introdução de colina na dieta de camundongos aumentou o risco de aterosclerose, que por sua vez foi diminuído após administração de antibióticos, sugerindo importante papel do microbioma GI na mediação da doença cardiovascular causada pela dieta (Z. Wang et al., 2011).

Adicionalmente, o microbioma GI também é responsável pela metabolização de ácidos biliares secundários a partir dos nutrientes disponíveis na dieta (Ridlon et al., 2014). Indivíduos com alimentação rica em gordura favorecem a metabolização de ácidos graxos secundários hidrofóbicos, que também estão associados ao desenvolvimento de aterosclerose e outras doenças como DM2 (Ridlon et al., 2016; Wei et al., 2020). Nessas doenças crônicas não-transmissíveis, observa-se um microbioma GI com padrão de menor diversidade, menor capacidade fermentativa, maior abundância de espécies enteropatogênicas e maior propensão a padrões inflamatórios (Jie et al., 2017).

Uma das formas de manter a diversidade – e consequentemente a saúde – do microbioma GI é por meio da regulação imunológica mediada por células T e anticorpos IgA (Kubinak et al., 2015, p. 88). Essa relação microbioma-sistema imune foi demonstrada em estudo realizado em camundongos, no qual mostrou-se que uma redução da resposta imune mediada por células T levam a menores níveis de secreção de IgA pela mucosa. Essa diminuição causou a perda de bactérias do grupo *Clostridia* e levou a fenótipo de obesidade e resistência à insulina (Petersen et al., 2019).

Além disso, o padrão inflamatório crônico é uma das características de doenças metabólicas, e pode ser causada pela translocação de bactérias e seus metabólitos até outros tecidos, onde desencadearão respostas pró-inflamatórias do hospedeiro (X. Li et al., 2017). Provavelmente essa translocação bacteriana é causada pela destruição da mucosa intestinal e aumento da permeabilidade tecidual, uma consequência da abundância de micro-organismos degradadores de mucosa, frequentes em estados de disbiose (Levy et al., 2017; X. Li et al., 2017). Dietas ricas em gordura também favorecem o padrão disbiótico pois selecionam bactérias gram-negativas ricas em lipopolissacarídeos (LPS) que induzem à inflamação pela ativação de receptores toll-like e citocinas pró-inflamatórias (Ahola et al., 2017; Wisniewski et al., 2019). Adicionalmente, a abundância de LPS intestinal também leva ao aumento da concentração plasmática de LPS, causando endotoxemia, comum na DM2 (Ahola et al., 2017).

Em um estudo de associação metagenômica (mGWAS), Qin et al. (2012) observaram que a disbiose em pacientes diabéticos estava relacionada à diminuição de bactérias produtoras de ácidos graxos como butirato e à abundância de vias metabólicas resistentes a estresse oxidativo. Numa população chinesa também foi constatada a menor abundância de produtores de AGCC, como *Faecalibacterium prausnitzii*, e outros grupos taxonômicos como candidatos a biomarcadores para a pré-diabetes e DM2 (X. Zhang et al., 2013). A existência de biomarcadores também foi sugerida por um estudo realizado com mulheres europeias e indivíduos africanos, embora os grupos taxonômicos candidatos para essas populações não coincidam com aqueles sugeridos para os chineses (Doumatey et al., 2020; Karlsson et al., 2013). Esses resultados enfatizam a importância da investigação a nível global, uma vez que particularidades populacionais são importantes para quaisquer eventuais aplicações clínicas dos referidos achados.

Além da gordura e proteína animal, outros elementos comuns na alimentação urbanizada podem ter efeitos negativos na composição do microbioma (Zmora et al., 2019).

Adoçantes artificiais, frequentes em alimentos processados, parecem selecionar bactérias especializadas na degradação de glicanos, característica que já foi associada ao metabolismo de esfingolipídios e biossíntese de LPS, marcadores importantes na DM2 (Suez et al., 2014). Além disso, os emulsificantes, que são substâncias detergentes comumente encontrados na alimentação ocidental, induzem respostas inflamatórias crônicas mediadas pelo microbioma GI, que, conforme discutido anteriormente, é um dos precursores da obesidade e doenças metabólicas (Chassaing et al., 2015).

Dessa forma, o desenvolvimento dessas doenças, também conhecidas como “doenças da civilização”, parecem estar ligadas diretamente ao crescente estilo de vida ocidental, pois, até recentemente, eram pouco frequentes em populações tradicionais e não-industrializadas (J. L. Sonnenburg & Sonnenburg, 2019; Warinner et al., 2015). No Brasil, dados relativos ao aumento de doenças desse tipo em populações tradicionais, especialmente as amazônicas, são recebidos com preocupação, uma vez que essas populações possuem menor acesso aos sistemas de saúde e ainda tem alta prevalência de doenças infecciosas e parasitárias, típicas de regiões não-ocidentalizadas (Arrifano et al., 2018; Conde & Monteiro, 2014; Popkin, 2006).

A população da etnia Suruí, por exemplo, apresentou alta prevalência de obesidade, apesar de ser uma população tradicional indígena da Amazônia, e identificou-se que o padrão de ganho de peso está diretamente relacionado ao aumento do status socioeconômico (Lourenço et al., 2008). A transição nutricional acelerada também foi observada entre os indígenas Xavante no período de 1962-2006, com a população tendo sofrido aumento de peso e IMC ao longo desse período (Welch et al., 2009). Da mesma forma, os indígenas Xikrin também possuem alta prevalência de obesidade, além de DM2, dislipidemias e hipertensão (Barbosa et al., 2019). Souza-Filho et al. (2015) identificaram que o aumento na pressão arterial conforme o aumento de idade entre populações indígenas é uma

consequência da transição de estilo de vida, uma vez que indígenas idosos que vivem isolados não apresentaram aumento de pressão arterial.

Conforme a incidência dessas doenças se torna mais prevalente em regiões onde habitam populações isoladas, populações que passam pela transição rural-urbana e populações tradicionais, como a Amazônia, surge a urgência de se compreender qual papel o microbioma GI está desempenhando nesse contexto e de que forma ele está distribuído entre populações vulneráveis. Além disso, o microbioma tem sido associado à patogenia de outras doenças importantes, como ao tratamento e à fisiologia do câncer, à parasitemia na malária, e aos sintomas motores da doença de Parkinson (Garrett, 2017; Sampson et al., 2016; Villarino et al., 2016).

1.6. Iniciativas globais e a medicina translacional

O estudo do microbioma humano tem se expandido nas últimas décadas e hoje já passa da fase de descrição para a investigação dos reais mecanismos moleculares por trás das interações microbioma-hospedeiro e como podemos manipulá-los no contexto da pesquisa translacional (Kastl et al., 2020; Proctor et al., 2019). Algumas iniciativas globais de coleta e caracterização do *core microbiome* humano foram responsáveis pelo estabelecimento de protocolos e da definição do que consiste um microbioma saudável ou disbiótico, como é o caso do *Human Microbiome Project*, financiado pelo *National Institute of Health* e lançado em 2007 (NIH, Estados Unidos) e o MetaHIT (Europeia e China) (Qin et al., 2010; The Human Microbiome Project, 2012).

Desde então outros grandes projetos têm surgido como o *Belgian Flemish Gut Flora Project*, *Global Microbiome Conservancy* e os mGWAS, importantes para o estabelecimento de associações entre o microbioma e o adoecimento humano (Falcony et al., 2016; Gilbert et al., 2016; Groussin et al., 2021; J. Wang & Jia, 2016). Algumas alternativas terapêuticas já

foram testadas e são promissoras, como é o caso do transplante de microbioma fecal (FMT), que mostrou resultados efetivos de até 90% de cura para infecções persistentes por *C. difficile* e tem auxiliado nos sintomas da doença inflamatória intestinal (J. M. Cho et al., 2019; Gianotti & Moss, 2017).

Além disso, o microbioma GI está sendo investigado como um auxiliar na imunoterapia contra o câncer, uma vez que é capaz de promover a maturação de determinadas células do sistema imunológico, melhorando a eficiência da apresentação de antígenos (Dai et al., 2020). O FMT de indivíduos respondedores e não respondedores à imunoterapia para camundongos estéreis, mostrou que indivíduos respondedores possuíam no seu microbioma maior quantidade de imunidade antitumoral, e que a administração de antibióticos causa menor probabilidade de resposta ao tratamento (Routy et al., 2018). Dessa forma, a modulação do microbioma GI em tratamentos oncológicos pode representar uma opção viável para pacientes que não respondem bem às terapias.

Além disso, grupos taxonômicos do microbioma podem servir como biomarcadores de determinadas doenças como diabetes e doença de Parkinson, e novas estratégias de nutrição também podem ser baseadas na seleção positiva ou negativa de certas espécies (Gilbert et al., 2016; Kolodziejczyk et al., 2019). À luz dos novos conhecimentos adquiridos por meio da metagenômica, é possível aplicar novos usos para antibióticos ou probióticos. Por exemplo, probióticos podem ter efeitos positivos no controle da hipertensão arterial e doenças crônicas não-transmissíveis (Noce et al., 2019). Tendo em vista a ação do microbioma GI, também já foram utilizados e testados alguns probióticos com resultados promissores no autismo, de modo a retardar sua progressão e diminuir seus efeitos comportamentais e cognitivos (Chidambaram et al., 2020).

Apesar de inúmeros avanços nos últimos anos, um problema persistente é a falta de catalogação e caracterização dos micro-organismos identificados, fazendo com que a “matéria escura” do microbioma seja crescente. Recentemente, esforços voltados para o

aumento dos catálogos e sequências-referências possibilitaram a descoberta e reconstrução de milhares de genomas antes não identificados (Almeida et al., 2019, 2020; Nayfach et al., 2019; Pasolli et al., 2019). De todos os genomas reportados, 70% são de espécies não cultivadas e 40% não possuem anotação funcional, demonstrando que o que sabemos sobre o genoma microbiano e os ecossistemas humanos são, ainda, a “ponta do iceberg”. Os resultados apontam para novas espécies presentes em populações isoladas e populações na transição rural-urbana, além de destacar grupos taxonômicos desconhecidos envolvidos no mecanismo de doenças (Almeida et al., 2020).

Existem evidências que sugerem que o papel da microbiota é tamanho que seríamos capazes de transferir fenótipos por meio de uma transferência de espécies, conjunto de espécies ou do microbioma completo (Beaumont et al., 2016; Vrieze et al., 2012). Tais perspectivas são animadoras para o campo da medicina personalizada e podem revolucionar a forma que tratamos diversas doenças. Entretanto, assim como o sucesso da pesquisa translacional genética dependerá imensamente da caracterização genômica da diversidade populacional global, só poderemos manipular o microbioma a partir de dados que conhecemos. Dessa forma, é imprescindível caracterizar o microbioma de populações diversas, em múltiplos contextos ambientais e étnicos, especialmente comparando diferentes populações inseridas em um mesmo contexto geográfico e cultural (Hansen et al., 2019).

2. JUSTIFICATIVA

À medida que uma fração crescente das populações humanas da Amazônia adota estilos de vida urbanizados, parte da biodiversidade do microbioma intestinal corre o risco iminente de ser extinta. Destaca-se, portanto, a necessidade urgente de incluir a população brasileira nesse contexto de pesquisa em rápida evolução e que é considerado o futuro da medicina personalizada; caso contrário, a literatura continuará concentrada em maiorias étnicas e persistirão as disparidades envolvendo comunidades desfavorecidas em saúde pública. Enfatiza-se, principalmente, a vulnerabilidade das populações tradicionais amazônicas e das populações urbanas com pouco acesso a condições adequadas de serviços de saúde e saneamento. Em vista do ritmo crescente que se observa em termos de prevalência de doenças metabólicas e sua associação ao microbioma gastrointestinal, este torna-se um tópico urgente e de importância à nível de saúde pública. Para que as populações brasileiras – e, mais especificamente, as sistematicamente sub-representadas – possam acompanhar este avanço, a caracterização proposta pelo presente projeto é o primeiro de muitos passos fundamentais para sua concretização.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar o microbioma gastrointestinal de indivíduos saudáveis pertencentes às populações urbanas e tradicionais da região da Amazônia brasileira, investigar fatores que exercem influência sobre a sua composição e discutir o papel do microbioma gastrointestinal na saúde do hospedeiro de acordo com suas particularidades geográficas e culturais.

3.2. Objetivos específicos

- a. Coletar e analisar informações relativas ao estilo de vida (dieta, saúde, saneamento básico) dos indivíduos participantes da pesquisa.
- b. Investigar a colonização parasitária (para a presença de protozoários e helmintos) no intestino dos indivíduos participantes por meio de exame de parasitoscopia das fezes.
- c. Realizar sequenciamento metagenômico de 16S e *shotgun* a partir de amostras de fezes de indivíduos habitantes de regiões isoladas, rurais e urbanas da Amazônia.
- d. Caracterizar as comunidades microbianas GI das populações urbanas e tradicionais quanto à composição e diversidade.
- e. Investigar a estabilidade do microbioma de indivíduos habitantes de uma área urbana da Amazônia.
- f. Fazer anotação funcional dos genomas microbianos obtidos a partir do sequenciamento metagenômico.
- g. Contextualizar os dados obtidos com outros estudos e bases de dados de microbiomas de populações mundiais.

4. CAPÍTULO 1

The Structure of Brazilian Amazonian Gut Microbiomes in the process of urbanisation

Artigo publicado na revista *npj Biofilms and Microbiomes*

ISSN: 2055-5008

Fator de impacto: 8.462 / Qualis A1

ARTICLE OPEN



The structure of Brazilian Amazonian gut microbiomes in the process of urbanisation

Ana Paula Schaan¹, Dionison Sarquis², Giovanna C. Cavalcante¹, Leandro Magalhães¹, Eliene R. P. Sacuena¹, John Costa¹, Dennyson Fonseca¹, Vanessa J. Mello³, João F. Guerreiro¹ and Ândrea Ribeiro-dos-Santos^{1,2✉}

Shifts in subsistence strategy among Native American people of the Amazon may be the cause of typically western diseases previously linked to modifications of gut microbial communities. Here, we used 16S ribosomal RNA sequencing to characterise the gut microbiome of 114 rural individuals, namely Xikrin, Suruí and Tupaiú, and urban individuals from Belém city, in the Brazilian Amazon. Our findings show the degree of potential urbanisation occurring in the gut microbiome of rural Amazonian communities characterised by the gradual loss and substitution of taxa associated with rural lifestyles, such as *Treponema*. Comparisons to worldwide populations indicated that Native American groups are similar to South American agricultural societies and urban groups are comparable to African urban and semi-urban populations. The transitioning profile observed among traditional populations is concerning in light of increasingly urban lifestyles. Lastly, we propose the term “tropical urban” to classify the microbiome of urban populations living in tropical zones.

npj Biofilms and Microbiomes (2021)7:65; <https://doi.org/10.1038/s41522-021-00237-0>

INTRODUCTION

Gut microbiome metagenomic characterisations across multiple human populations have shed light on the roles of this complex ecosystem in maintaining human health^{1,2}. Evidence shows substantial differences in gut/stool microbiome diversity and composition between populations living in diverse subsistence strategies. Generally, individuals living in rural and/or traditional societies harbour highly diverse microbiomes when compared to those from industrialised areas^{3,4}. Among other environmental factors, dietary habits, access to medication, sanitation practices and interpersonal contact are mainly responsible for shaping such gut microbial structure^{5–7}.

Consumption of highly plant-based diets such as those followed by traditional hunter-gatherers and rural agriculturalists promote gut colonisation by fibre-degrading microbes, such as those from the *Spirochaetes* phylum and *Prevotella* genus^{5,8}. For this reason, the gut microbial communities of populations such as the Hazda and Yanomami are regarded as a “window into the past”, given their hosts follow a lifestyle comparable to that of ancient pre-industrialised humans^{3,4}. Such a lifestyle is marked by relying on foraging and hunting for food, as well as gender division of labour and seasonal food cycling, markedly opposed to the contemporary industrialised world^{9,10}. Thus, it is thought that the gut microbiome of non-urbanised people is ideally adapted to human physiology, as it promotes overall gut health and beneficial interactions with the immune system^{11,12}.

Conversely, gut microbial communities of industrialised societies seem to have been altered and are increasingly enriched for mucus-degrading and antibiotic-resistant taxa, which may trigger pro-inflammatory responses and gut dysbiosis¹². Microbial biomarkers for this lifestyle are typically a high abundance of *Bacteroides* genus and *Akkermansia muciphila*, while diets are rich in animal fat and protein, simple sugars and processed foods^{12,13}. Urbanisation and shifts in dietary habits are likely the

cause of gut microbial extinctions across generations, disrupting the host–microbiome equilibrium that may eventually lead to the appearance of autoimmune disorders, obesity, type 2 diabetes and other non-communicable diseases^{14,15}.

The compositional shifts in gut microbiomes of traditional populations have been a topic of debate and great concern in the field of microbiology and medicine¹². In the Brazilian Amazon territory, there are 500 Native American populations living across a large urbanisation gradient, with some ethnic groups belonging to a hunter-gatherer and agricultural subsistence lifestyle, while others inhabit areas near small or large urban centres. This subsistence shift will likely result in disrupted gut microbiomes, drawing attention to the dangers of compromising the Amazonian biodiversity present in indigenous settings, which have contributed to health maintenance and ecological balance over thousands of generations¹⁶.

In this regard, the work of Pires et al.¹⁷ was the first to characterise the gut microbiome of Brazilian Amazonian populations living in a rural setting. They found that the trade-off between the abundance of *Prevotella* and *Bacteroides* taxa was the main feature distinguishing two Amazonian riverine populations from urban individuals of Rio de Janeiro, located in southeast Brazil. However, these data do not include populations experiencing lifestyle transitions and it remains unclear if these results are transferable to rural Native American Amazonian communities and individuals living in urban Amazonian cities.

Here, we aimed to determine whether the microbiomes of rural Native American populations in the Brazilian Amazon show markers of transition to urbanisation and to what extent recent subsistence changes are impacting gut microbiome compositions. Currently, there are no data comparing the gut microbiome composition of Native American and urban populations from the Brazilian Amazon, a region with vast biodiversity. We employed 16S ribosomal RNA (rRNA) sequencing to profile the gut

¹Programa de Laboratório de Genética Humana e Médica, Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Pará, Belém, Brazil. ²Núcleo de Pesquisas em Oncologia, Universidade Federal do Pará, Belém, Brazil. ³Laboratório de Análises Clínicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Brazil.

✉email: akelyufpa@gmail.com

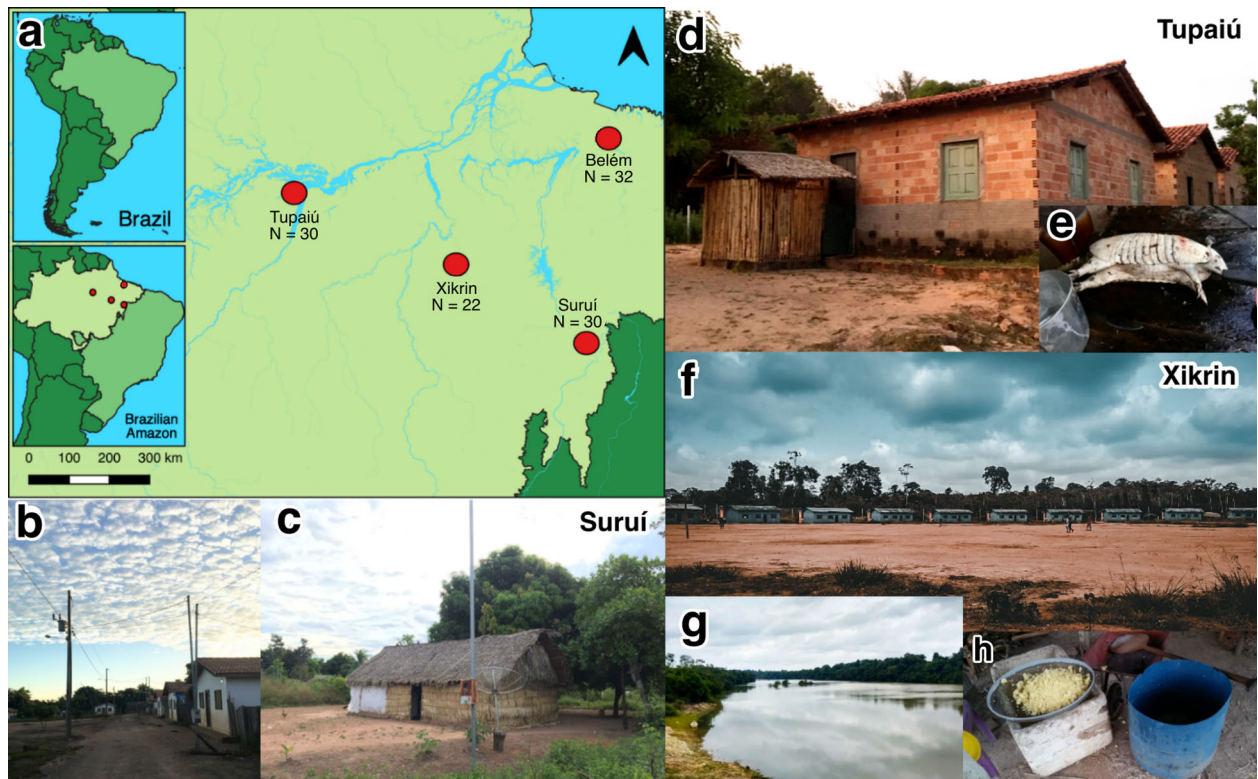


Fig. 1 Map and lifestyle patterns of the sampled populations. **a** Location of each sampling site in relation to the South American continent and the Brazilian Amazon. **b, c** The village and typical Suruí (R) residence. **d, e** Tupaiú (R) home and armadillo being prepared for consumption. **f–h** A circular arrangement of Xikrin (R) households, the nearby Bacajá River and the preparation of the cassava flour.

microbiome of 114 individuals from four distinct populations of urban and Native American Brazilian Amazonians and compared microbial community structures to other urban and rural groups surveyed in Brazil and across the globe.

RESULTS

Studied populations and metadata

We recruited three rural (R) Native American populations, namely the Xikrin (R) ($N = 22$), Suruí-Aikewara (R) ($N = 30$) and Tupaiú (R) ($N = 30$), and one urban (U) population (Belém, $N = 32$) from the Brazilian Amazon (Fig. 1). A total of 268 and 332 individuals inhabit the indigenous territory of the Xikrin (R) and the Suruí (R) populations, respectively^{18,19}. The community located in the extractive reserve home to the Tupaiú (R) houses ~50 families, while over 1.3 million individuals live in Belém (U), the capital of Pará state^{20,21}.

Among the Native American communities, access to the Xikrin group is the most logistically challenging, due to the vast and dense Amazon rainforest that composes and surrounds the territory and poor road accessibility. The Suruí are accessible by land, while the Tupaiú are reachable by boat or helicopter, and both are located ~100 km from the nearest rural town. Dietary interviews and metadata collection were used to characterise the subsistence and lifestyle profile of each population (see “Methods” section).

Microscopic examination of faecal samples revealed that 68% of all tested individuals harbour at least one species of gut protozoa, with commensal *Endolimax nana* as the most frequent (Supplementary information 1: Figure S1D). At the population level, the Xikrin (R) had the highest gut protozoa prevalence—except for Belém (U), which only had 35% of samples tested—followed by Suruí (R) and Tupaiú (R) (Pearson’s χ^2 test, p value = 0.029) (Supplementary information 1: Figure S1F). Gut helminths were

observed in 6% of samples, belonging to either Xikrin (R), Tupaiú (R) or Belém (U) populations. Regarding *Entamoeba* sp. colonisation, 20% of samples tested positive for *E. coli*, *Entamoeba histolytica/dispar* or both. Of these, 39% were Xikrin (R), 30% were Tupaiú (R), 18% were Suruí (R) and 13% from Belém (U).

Amazonian rural and urban microbiomes show similar diversities

Alpha diversity was computed to determine differences in richness estimates among the Amazonian populations (Supplementary Data 1: Table 1). This analysis revealed that the Xikrin (R) harbour the most diverse and Tupaiú (R) the least diverse microbiomes among the investigated groups (Shannon index analysis of variance (ANOVA), p value = 0.006) (Supplementary information 1: Figure S2). The urban population from Belém had the second highest Shannon diversity index mean and similar diversity to Suruí (R) and Tupaiú (R) traditional populations (Fig. 2a).

Spearman’s correlation analyses (Supplementary information 1: Figure S3A–D) did not show significant associations among alpha-diversity values and age or sex data for any of the populations ($R = -0.023$, p values = 0.71, Shannon index for “age” and T test, p value = 0.13 for “sex”). However, higher alpha-diversity values were associated with the presence of gut protozoa colonisation as showed by Shannon and Chao1 diversity indexes (T test, p value = 0.036 and 0.008, respectively) and number of observed species (T test, p value = 0.0099) (Supplementary information 1: Figure S3A–D). Further, concurrent colonisation by *Escherichia coli* and *Entamoeba histolytica/dispar* was associated with higher Chao1 alpha diversity (ANOVA, p value = 0.041) and number of observed species (ANOVA, p value = 0.042) (Supplementary information 1: Figure S4R–T).

Further, although no statistical significance was detected (T test, p value = 0.051), we also observed that individuals with helminth

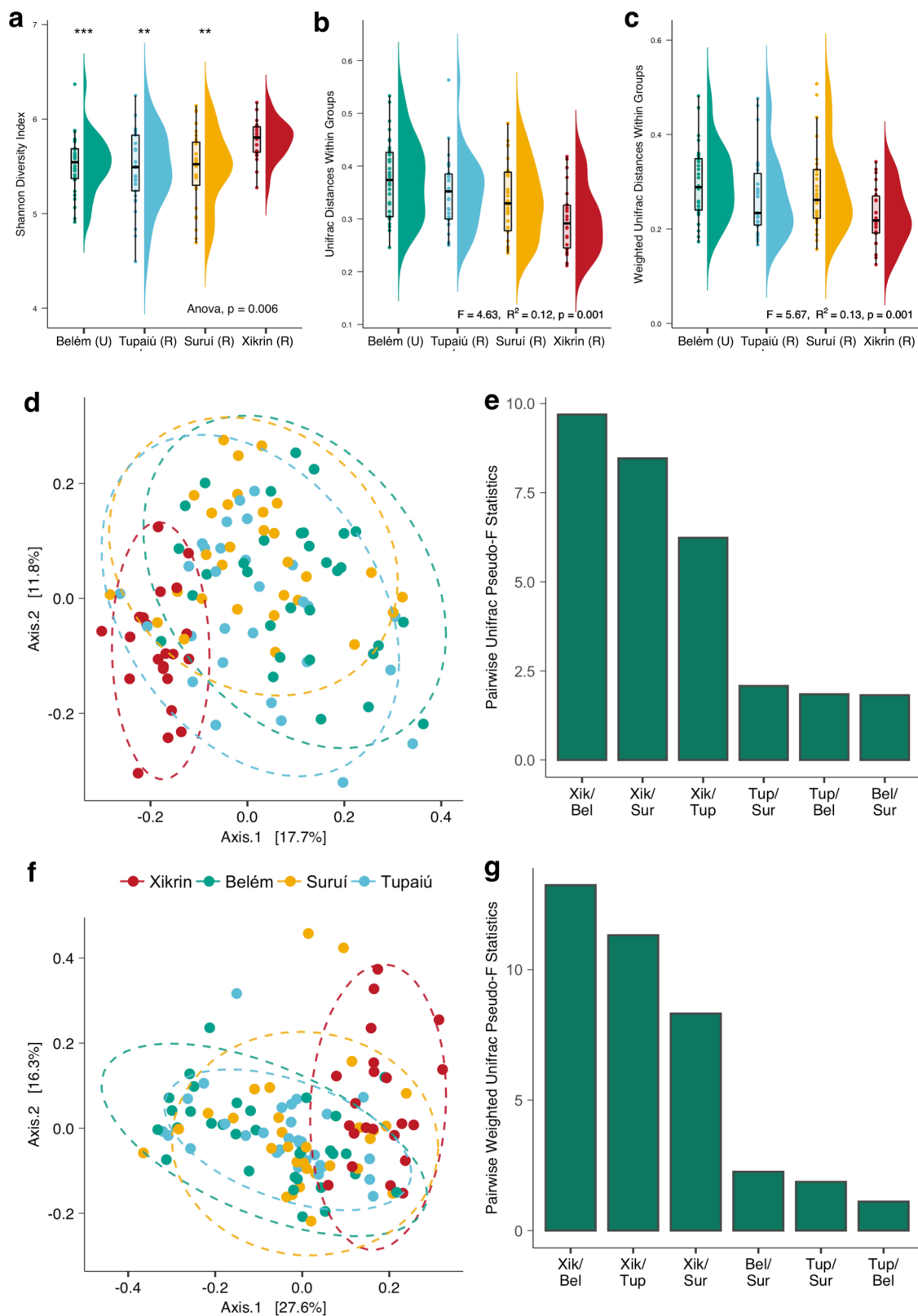


Fig. 2 Within- and between-group diversity measures. **a** Shannon index. **b** Unweighted Unifrac distances within groups. **c** Weighted Unifrac distances within groups. **d** PCoA of unweighted Unifrac distances. **e** Weighted Unifrac pairwise PERMANOVA differences among population pairs. **f** PCoA of weighted Unifrac distances. **g** Unweighted Unifrac pairwise PERMANOVA differences among population pairs. NS not significant, $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$, $***p \leq 0.001$, $****p \leq 0.0001$.

intestinal colonisation had increased alpha-diversity values when compared to negative microscopic examinations (Supplementary information 1: Figure S4M–P).

To assess similarities among microbial community structures, we computed beta diversity with Unifrac and Weighted Unifrac distances. Results show that the Xikrin (R) population shares the most compositional features, followed by Suruí (R), Tupaiú (R) and Belém (U). We also used permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) to test whether the dispersion from centroid values was the same among all groups. In this analysis, rural microbiomes showed less inter-individual variation when compared to the urban group (PERMANOVA p value = 0.001) (Fig. 2b, c). No significant correlation between alpha- and beta-diversity measures were observed ($R = -0.74$, p value = 0.26) (Supplementary information 1: Figure S5A–H).

Principal coordinate analysis (PCoA) based on Unifrac and Weighted Unifrac distances revealed that the Xikrin (R) population, although with a small degree of overlap, forms a distinct cluster and shows far less dispersal than other population groups, which indicates a more homogeneous microbiome structure among individuals (Fig. 2d, f). Further, this analysis highlights the structural similarities between rural and urban groups, demonstrated by the considerable overlap between the Suruí (R), Tupaiú (R) and Belém (U) samples. In the computed pairwise PERMANOVA analysis on Unifrac and Weighted Unifrac distances (Fig. 2e, g), the greatest amount of variation was among Xikrin (R) and Belém (U), followed by Xikrin (R) and all other population groups. Surprisingly, the least amount of variation was observed between pairs Belém (U) and Suruí (R), and Belém (U) and Tupaiú (R) populations, suggesting there are little compositional differences between such microbial communities.

Microbial compositions are shared among rural and urban groups

Considering we did not find discrete population clustering between all rural and non-rural dwellers, we sought to identify which taxonomic features could be driving compositional similarities observed in Unifrac distance-based PCoA analyses. First, we determined the most frequent genus in each individual microbiome, characterised by the taxa with the highest relative abundance in each sample (Supplementary information 1: Figure S6A). Nine taxa summarise the most frequent genera across all samples: *Prevotella* (53%), *Faecalibacterium* (14%), *Bacteroides* (9%), *Roseburia* (9%), *Succinivibrio* (7%), *Treponema* (5%), *Oscillospira* (2%), *Escherichia* (1%) and *Ruminobacter* (1%).

Notably, aside from microbiomes with *Escherichia*, *Bacteroides* and *Faecalibacterium* as the most frequent genera, nearly all other samples had *Prevotella* genus in the top three most prevalent taxa. For individuals with *Faecalibacterium*-prevalent microbiomes, more than half harboured *Prevotella* as one of the top three most frequent taxa.

Prevotella is the most frequent dominant taxa in all populations (Supplementary information 1: Figure S6A). Nonetheless, we observed typically urban-like signatures in both urban and rural samples, aside from Xikrin (R). For instance, *Bacteroides*- and *Faecalibacterium*-prevalent microbiomes were observed only in Belém (U), Suruí (R) and Tupaiú (R), while the presence of individuals with *Treponema* as the most prevalent taxa were only observed among the Xikrin (R) and Suruí (R).

Further, considering higher abundance of *Bacteroidales* in relation to *Clostridiales* order is a biomarker for traditional microbiomes from Africa and South America^{4,22}, we tested such proportions across sampled Amazonian populations. The Xikrin (R) presented a higher relative proportion of *Bacteroidales* when compared to other populations (ANOVA test, p value = $4.7e - 08$), while other Native American groups are not significantly different from urban Belém (U) (Supplementary information 1: Figure S6B).

Moreover, an analysis of the population-based core microbiome was performed to explore taxonomic compositions shared between individuals from the same community. At higher taxonomic resolutions, such as phyla, core taxonomic compositions and proportions are similar among Belém (U), Suruí (R) and Tupaiú (R), with abundance variability displayed mainly within Proteobacteria taxa and the presence of Lentisphaerae in Belém (U) (Fig. 3a). The Xikrin (R) population was distinct for the presence of Spirochaetes and the absence of Actinobacteria in the core microbiome.

Lower taxonomic levels such as family and genus barplots (Fig. 3b, c) showed substantial similarities between Belém (U) and Tupaiú (R), in which the proportions of *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* and *Prevotellaceae* are highly comparable. Nonetheless, almost all Tupaiú (R) participants show the presence of *Veillonellaceae* and approximately half harbour variable abundances of *Succinivibrionaceae*, a feature shared only by other sampled Native Americans. For instance, the highest abundances of *Succinivibrionaceae* belong to Suruí (R), while the presence of *Spirochaetaceae* is unique to the Xikrin (R), represented by *Treponema* at the genus level.

Further, network analyses showed that 46% of core genera are shared among all populations and 80% are shared by at least two groups (Fig. 3d). Interestingly, only Belém (U) and Xikrin (R) showed group-specific genera: *Parabacteroides* (Bacteroidetes) and *Victivallis* (Lentisphaerae) in Belém (U), and *CF231* (Bacteroidetes), *Treponema* (Spirochaetes) and *Anaerovibrio* (Firmicutes) in Xikrin (R). Hypergeometric enrichment p values were analysed and indicated significant overlaps between the core microbiomes of the Suruí (R) and Tupaiú (R) populations (BH p -adj value = $2.2e - 3$) (Supplementary Data 1: Table 2).

Next, we investigated microbial co-occurrence patterns to determine relationships between different genera in the microbiome ecosystem. Using sparse correlation coefficients (SparCC)²³, we found two main co-abundance groups that seem to be centred around the trade-off between *Prevotella* and *Bacteroides* (Supplementary information 1: Figure S7A–C). In the *Prevotella* co-abundance group, other taxa such as *CF231*, *Treponema*, *Succinivibrio* and *Catenibacterium* are seen in high frequencies. In contrast, mainly *Odoribacter* and *Escherichia* genera were observed to have comparable frequencies to *Bacteroides* in the opposite co-abundance group. The optimal number of clusters in this analysis was assessed by k -means and Partitioning Around Medoids (PAM) clustering methods and validated with Hopkins statistic (Supplementary information 1: Figure S7B).

Signs of transition to urbanisation among Amazonian microbiomes

Given that Native American populations (Suruí and, especially, Tupaiú) share more similarities with Belém (U) than the rural, more remote Xikrin, three scenarios were suggested: (1) Suruí (R) and Tupaiú (R) populations are increasingly displaying urban-like microbiomes, hence their shared features with Belém (U); (2) Belém individuals do not follow a typically urbanised microbiome composition and are more similar to other non-urban human groups, or (3) both scenarios are occurring simultaneously.

To test these hypotheses, we computed significant differentially abundant taxa at genus, family and order taxonomic resolutions with analysis of composition of microbiomes (ANCOM)²⁴ between populations from the present cohort and compared results to others from Brazil: the rural Amazonian riverine Buiúçu (R) and Puruzinho (R) populations and urban individuals of Rio de Janeiro (U)¹⁷ (Fig. 4). Results are shown as the logarithm of re-scaled relative abundances, as described by Hansen et al.²².

ANCOM results showed that six taxa are differentially abundant between groups at the genus level (Fig. 4a). Of these, *Treponema* (Kruskal–Wallis, $p = 2.8e - 09$), *Succinivibrio* (p value = $4.8e - 06$),

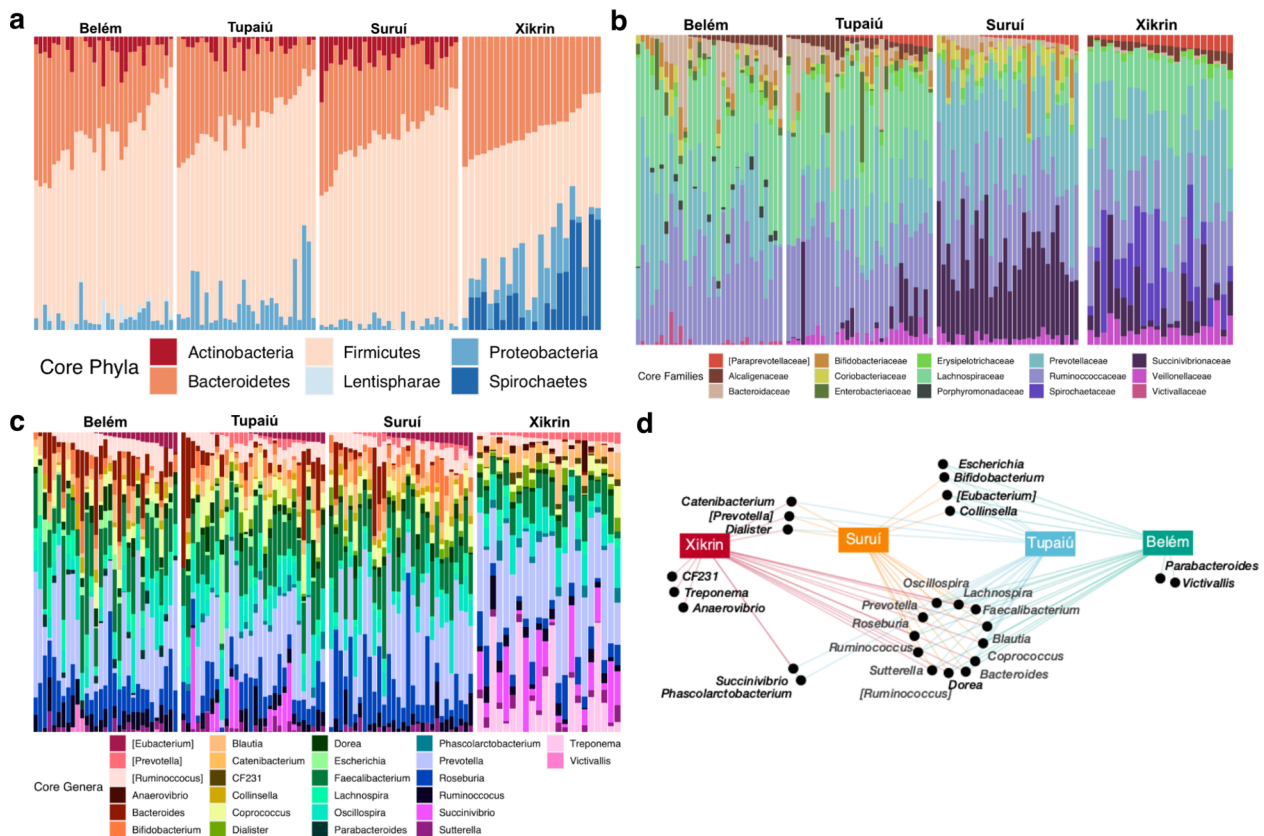


Fig. 3 Core microbiome distribution. **a** Abundance of core microbiome phyla per population. **b** Abundance of core microbiome families per population. **c** Abundance of core microbiome genera per population. **d** Network of the shared core microbiome genera in each population.

and *CF231* (p value = $3.7e - 09$) were more abundant in the Xikrin (R) and display decreasing abundances according to urbanisation. In contrast, *Butyrivibrio* showed the highest abundance in Belém (U) (p value = $1.1e - 06$), while *Bacteroides* was most abundant in Rio de Janeiro (U), Belém (U) and Tupaiú (R) (p value = $1e - 13$). *Bifidobacterium* (p value = $9.8e - 06$) showed the lowest abundances among three rural communities (Xikrin, Buiúçu and Puruzinho) and the urban Rio de Janeiro.

At the family level, differential abundance analyses detected *S24-7* (*Muribaculaceae*) as significantly more abundant in the microbiomes of the Xikrin (R), Buiúçu (R) and Puruzinho (R) (Kruskal–Wallis, p value = $2.6e - 05$). Moreover, *Succinivibrionaceae* and *Spirochaetaceae* families were significantly more abundant among the Xikrin (R) when compared to other tested populations (Fig. 4b). Lastly, the *Bifidobacteriales* (Kruskal–Wallis, p value = $9.8e - 06$) and *Spirochaetales* (Kruskal–Wallis, p value = $4.4e - 09$) orders were found to be differentially abundant. Interestingly, the abundance of *Bifidobacteriales* among the Xikrin, Buiúçu and Puruzinho rural groups was not significantly different from urban Rio de Janeiro, but was significantly lower than remaining rural populations (Fig. 4c).

We also computed differential abundance analyses with South American native and rural populations (Supplementary information 1: Figure S8)^{4,5}. ANCOM boxplots show that *Prevotella* abundances in Brazilian Amazonian individuals, particularly the Xikrin (R), are similar to those found for Venezuelan Yanomami (R) and the Tunapuco from the Peruvian Andes (R) populations.

Differential abundances for the Amazonian populations in this cohort compared to African populations living in a gradient of urbanisation in Cameroon⁷ (Supplementary information 1: Figure S9) revealed that *Prevotella* abundances in Amazonian populations are similar to what is observed in an urbanisation transitioning context. For instance, Xikrin (R) abundances of this genus are similar to that of rural Ngoantet, while Suruí (R) and Tupaiú (R) show abundance

means comparable to semi-urban Mbalmayo. The lowest *Prevotella* abundance in this comparison belongs to the urban Yaounde, the capital of Cameroon, while Belém (U) has the lowest among Amazonian groups, yet higher than the Yaounde population.

This pattern is the same for the *Bacteroides* genus, but with inversed proportions. When observing the *Succinivibrio* genus, this tendency continues with the exception of the Suruí (R) and Tupaiú (R) populations, which display mean abundances more comparable to urban than the semi-urban and rural groups. However, some genera (e.g. *Oscillospira*, *Coprococcus* and *Mitsuokella*) have higher abundances in Brazil than in Cameroon, independently of urbanisation levels.

Using PCoA based on Bray–Curtis distances to compare the Xikrin (R) (most rural group) and Belém (U) (most urbanised) populations with other South American and USA populations, we found that the Brazilian Amazonians were located at the intermediate stage of an urbanisation gradient (Fig. 5a, c). The Peruvian Tunapuco (R) largely overlap the Xikrin (R) and some Belém (U) individuals, while others from Belém (U) clearly share features with urban populations.

The same analysis was used to compare the Xikrin (R) and Belém (U) populations to three Cameroonian populations living in a gradient of urbanisation. We found that Belém (U) largely overlaps with Yaounde (U) and Mbalmayo (SU) populations, while the Xikrin (R) are similar to both the Ngoantet (R) and the Mbalmayo (SU) (Fig. 5b, d). Additional comparisons to African rural populations, such as the Tanzanian Sandawe and the Botswana San, can be found in Supplementary information 1: Figure S10.

In light of the various technical differences across gut microbiome datasets, meta-population comparisons must be interpreted with caution as they do not rule out the influence of technical factors in producing such findings.

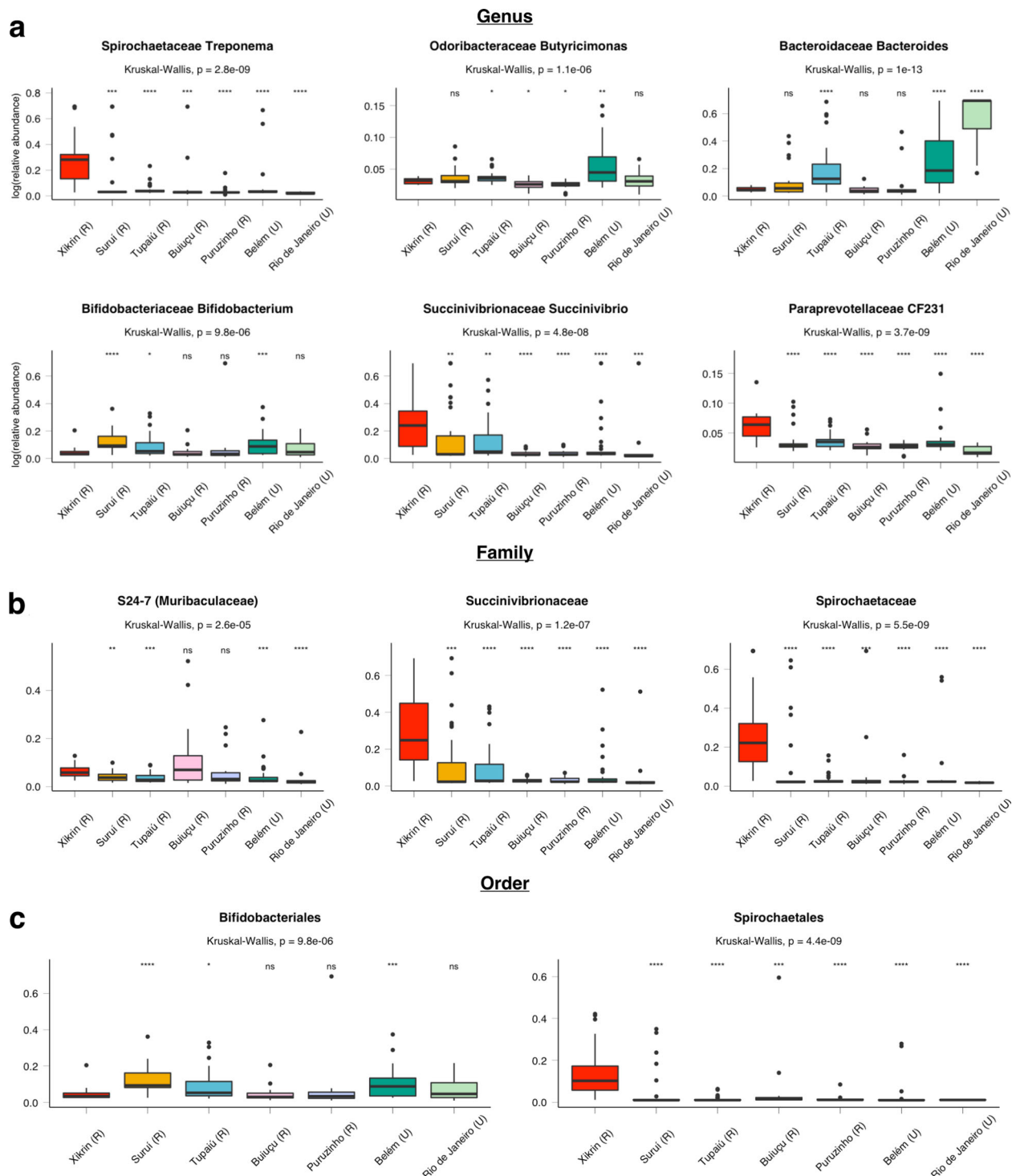


Fig. 4 Differentially abundant taxa among Brazilian populations as determined by ANCOM analyses considering a $W > 0.9$ cut-off significance value. a Differentially abundant genera. **b** Differentially abundant families. **c** Differentially abundant orders. NS not significant, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

Different predicted metabolic functions among urban and traditional groups

We used Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States (PICRUSt) to predict the metabolic potential of microbial communities based on 16S data and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways²⁵.

After removing eukaryote-related pathways, PICRUSt results identified 30 different metabolic functions summarised to level 2 KEGG pathway resolutions (Supplementary Data 1: Table 6). Pathways related to membrane transport, carbohydrate metabolism, amino acid metabolism, replication and repair, translation and energy metabolism were responsible for 54% of the observed metabolic predictions (Fig. 6a).

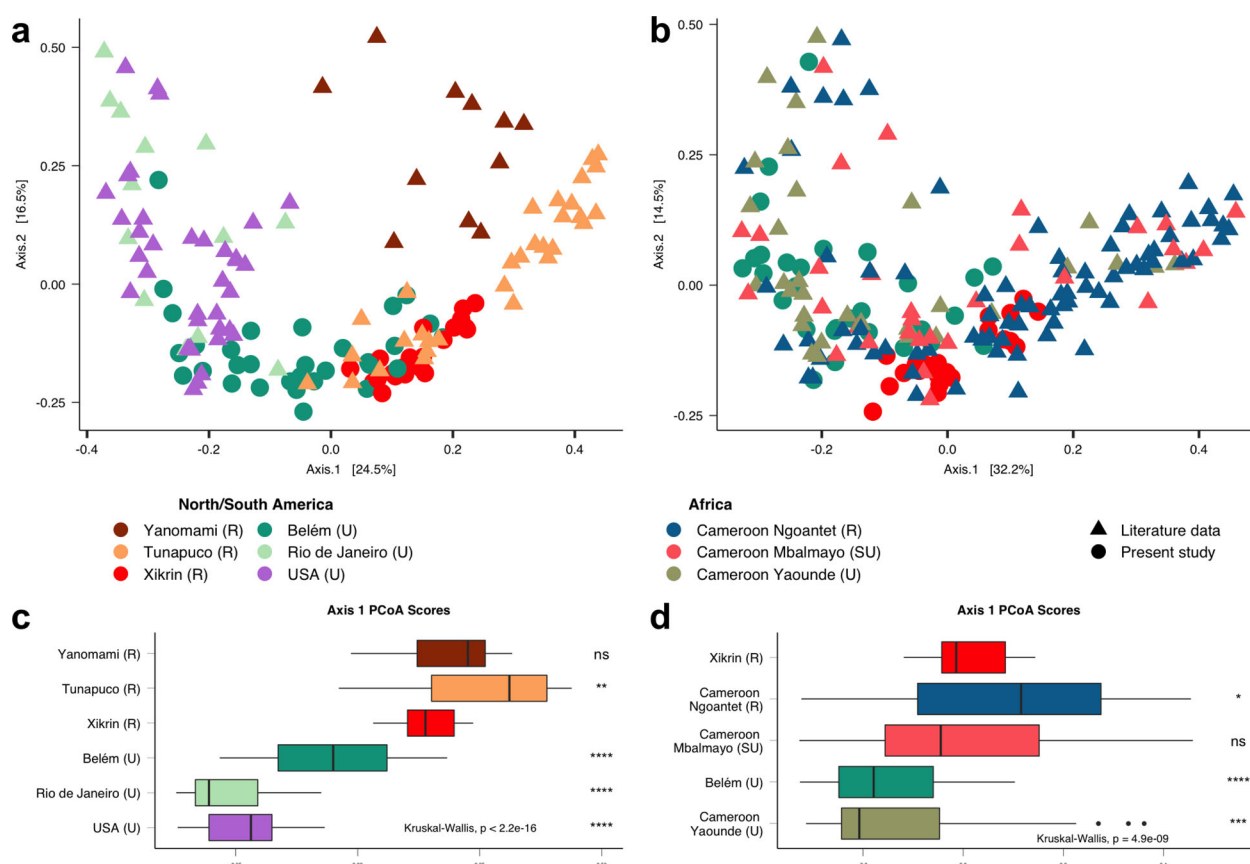


Fig. 5 PCoA of Bray-Curtis distances. **a** Distances between Amazonian Xikrin (R) and Belém (U) populations to other groups from the American continent. **b** Distances between Amazonian Xikrin (R) and Belém (U) populations to African groups from an urbanisation gradient in Cameroon. **c** Boxplots of PCoA scores along axis 1 for the American continent beta-diversity analysis. **d** Boxplots of PCoA scores along axis 1 for the African urbanisation gradient beta-diversity analysis. NS not significant, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

Then, we performed ANCOM to identify which pathways were differentially abundant among the Amazonian populations (Fig. 6b). Considering a $W > 0.9$ significance threshold, ANCOM results revealed four pathways, namely transcription, glycan biosynthesis and metabolism, folding, sorting and degradation, and transport and catabolism. Of these, glycan metabolism and folding, sorting and degradation were enriched among the Xikrin (R) population, while transcription was found to be significantly decreased. Finally, the transport and catabolism pathways were significantly less abundant among the Suruí (R).

When considering significance levels at $W > 0.6$, ANCOM revealed 27 differentially abundant pathways (Supplementary Data 1: Table 7). Here, we highlight that pathways related to carbohydrate metabolism (Kruskal-Wallis, p value = 1.4×10^{-7}) and xenobiotics biodegradation (Kruskal-Wallis, p value = 0.0012) were found significantly more abundant among in Belém (U) microbiomes, and decreased according to the urbanisation gradient (Supplementary information 1: Figure S 11G, O).

DISCUSSION

We have characterised the gut microbiome of several populations living in diverse lifestyles in the Brazilian Amazon. Our findings support a pattern of transition to urbanisation among Native American populations living outside urban centres, showing that gut microbiomes of rural Native American people are experiencing structural modifications and these data represent a glimpse into the stages of biodiversity loss and/or microbial compositional transitions during such changes.

Higher alpha-diversity values for the Xikrin (R) were expected, as traditional populations far from industrialisation have been shown to display higher microbial diversity than industrialised individuals^{1,3,4,22}. Further, the Native American Suruí (R) and Tupaiú (R) displayed similar diversity to that of urban Belém, which is comparable to those previously observed among Rio de Janeiro and Amazonian riverine individuals¹⁷.

A compositional transition among the rural populations of Suruí and Tupaiú is further supported by the high rate of dispersal in beta-diversity distance measures, similar to that of an urban group such as Belém. Urbanisation evidence is also demonstrated by the distribution of the most prevalent genera in individuals of each group (Supplementary information 1: Figure S6A). For instance, *Treponema*-prevalent microbiomes only in the Xikrin and the Suruí may reflect that the Suruí are more recently changing lifestyle patterns, as these taxa are considered a biomarker of traditional societies^{3–5,12}.

The Xikrin (R) follow a diet mostly composed of highly fibrous tubers such as sweet potatoes and cassava, which explains the abundance of polysaccharide degrading taxa in the gut microbiome, as reported for other traditional groups such as the Yanomami, Matsigenka, Hazda and BaAka^{3–5,8}. Meanwhile, the absence of *Treponema* prevalence among the Tupaiú (R) could indicate that a transition to an urbanised microbiome is more advanced, reinforced by the higher frequency of *Bacteroides*-prevalent microbiomes. Further, the abundance of *Bacteroides* and *Bifidobacterium* taxa have shown to be antagonistic to the colonisation of *Treponema* species in urbanised individuals, representing an adaptive response to increased consumption of refined carbohydrates and dairy²⁶.

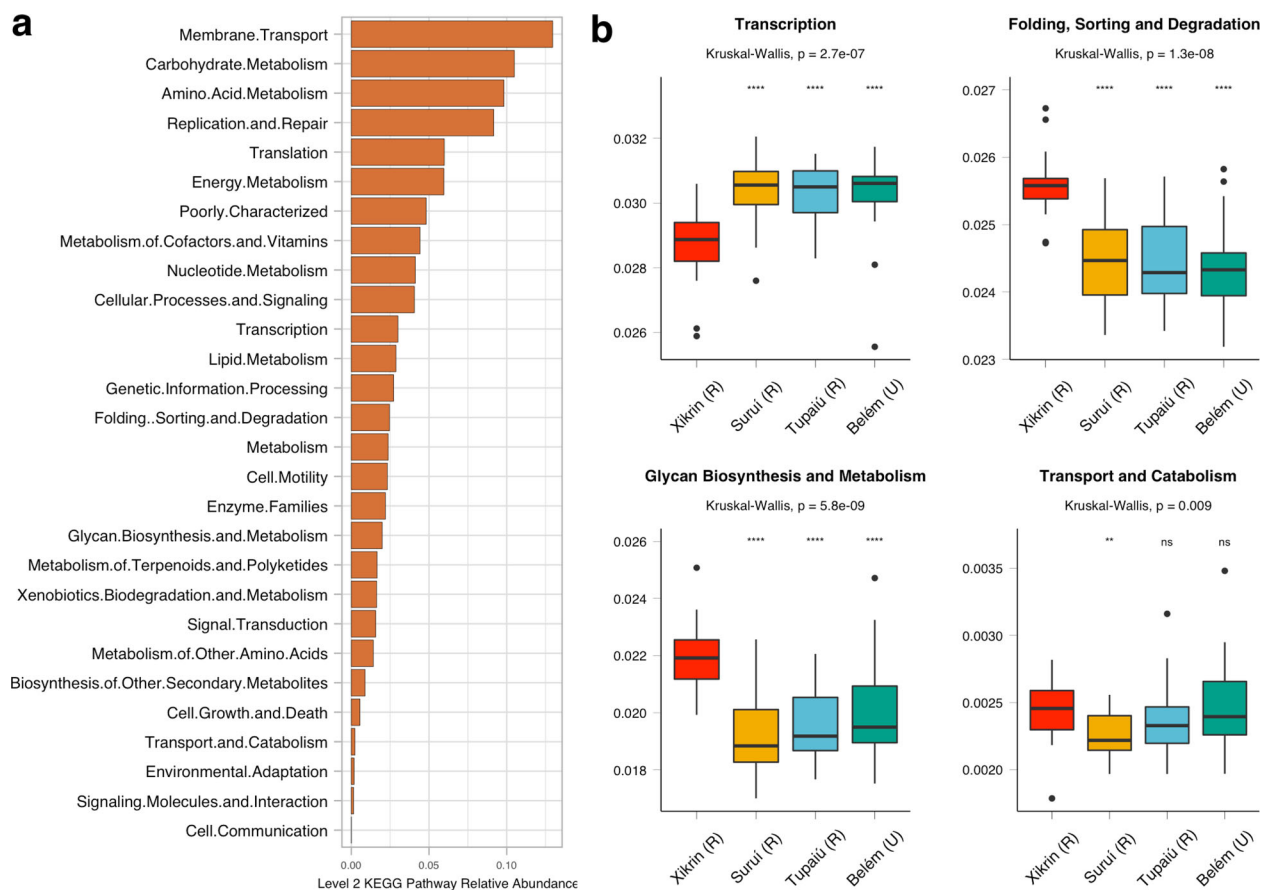


Fig. 6 Functional predictions based on PICRUSt results. **a** Relative abundance of level 2 KEGG pathways including all samples. **b** Differentially abundant KEGG pathways as determined by ANCOM ($W > 0.9$). NS not significant, $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$, $***p \leq 0.001$, $****p \leq 0.0001$.

The fact that only Xikrin (R) and Belém (U) core microbiomes showed group-specific taxa (genera not present in core microbiomes of other populations), such as *Treponema* and *Parabacteroides*, respectively, suggests that they represent opposite extremes of the urbanisation gradient in the Amazonian gut microbiomes (Fig. 3D). However, it is noteworthy that the urban Amazonian microbiome is different and should not be regarded as a typically urban-like profile such as what is shown for the United States, Italian and other industrialised societies^{5,17,27}. This is especially evidenced by the similarities shared by Belém (U) and urban and semi-urban groups from Cameroon²² and its differences from USA and Rio de Janeiro individuals (Fig. 5a).

Despite being the capital of the Pará state and populated by nearly two million people, Belém is an urban centre in which only 14% of the population receives sewage collection and, of these, only 3% are treated²⁸. Moreover, the city is located at the margins of the Pará river and in close proximity to the rainforest environment, which may have an important role in microbial dispersal and composition. Such factors may explain the prevalence of gut protozoa and alpha-diversity values among the urban individuals in our study. In addition, the dietary habits of Belém individuals are unique, as they consist of industrialised food consumption while also including fresh and unprocessed items such as cassava flour, açai and tropical fruits regularly. This diet may have an effect on the fibre intake of this population, explaining the abundance of *Prevotella* among such individuals.

We argue that diet, geographical proximity to native biodiversity and lack of adequate access to sanitation has an important role in determining the gut microbial composition of Belém individuals, in spite of subsistence strategy. Thus, we propose the term “Tropical Urban” as a category of subsistence strategy, in the

scope of microbiome research, to define populations inhabiting urban settings located in the tropical zone. This new classification considers that tropical urban environments are inserted in a context of proximity to great biodiversity, which has an important impact in defining the ecological and cultural contexts of these cities. Such circumstances determine interactions with microbial diversity and, consequently, shape gut microbial compositions, as seen for Belém and its similarities to urban African populations.

Further, we clarify that the term “semi-urban” is not an appropriate categorisation of these areas, as they constitute the urban extreme in the local gradient of urbanisation. Additional comparisons to African and Asian populations living in tropical urban settings will elucidate which aspects of such environments most influence gut microbial compositions.

Our data corroborate recent findings of gut eukaryotes being one of the main factors involved in microbiome alpha diversity among neighbouring rural and urban populations⁷. In the case of the present Amazonian populations, however, alpha diversity was influenced only by concurrent infections of *Entamoeba coli* and *E. histolytica/dispar*. As discussed by Lokmer et al.⁷, an industrialisation transition is accompanied by a loss in bacterial diversity and colonisation by *Entamoeba* sp. If we apply this concept to our data analysing overall *Entamoeba* sp. prevalence, an industrialisation gradient would have the Xikrin (R) at one side of the spectrum with increasing industrialisation passing by Suruí (R) and Belém (U) (Supplementary information 1: Figure S1E).

Since we did not obtain individual dietary information for the Native American populations, we were not able to make direct correlations between microbial composition and dietary habits. However, considering we found varying degrees of urbanisation in the microbiomes of rural populations, it is possible that factors,

such as a non-sexual subdivision of labour, play a part in determining gut microbial composition, similar to what has been described for the Hazda hunter-gatherers³.

We hypothesise that individuals responsible for periodically leaving the indigenous territory for commercial or social affairs in close-by semi-urban towns may display more urbanised gut microbiomes when compared to those in charge of tending to crops, for instance. This access to a semi-urban environment may increase the consumption of industrialised foods and exposure to antimicrobial medications, driving compositional changes in gut microbial communities. Future studies controlling for such community roles as well as longitudinal studies will be helpful in determining the conditions under which the gut microbiomes of rural Native American people are more prone to urbanisation.

The transition gradient observed in the present cohort may, therefore, be driven by factors that influence access to an urbanised environment in general. For instance, access to the Xikrin (R) community is the most difficult, which makes it troublesome (but not impossible) to obtain urban food products. This is not the case for the Suruí (R) and Tupaiú (R), although the latter is only accessible by boat or helicopter. Moreover, language is expected to impose a barrier for transitioning. The Xikrin (R) are part of the Jean linguistic group, and only a select number of individuals speak Portuguese. Conversely, the Suruí (R), although having non-Portuguese speakers, has a larger number of individuals who were able to communicate with the research staff. Regarding Tupaiú (R), their native language was hardly spoken, considering they are a mixture of multiple Native American ethnicities.

Language may also stand as a genetic obstacle, meaning non-Portuguese speaking communities are possibly more ethnically homogeneous. It is possible, therefore, that a language barrier is one of the causes for little to no evidence of urbanisation among the Xikrin gut microbiome, as substantial and continued contact with urbanised populations is rare for a majority of these individuals. Therefore, we suggest that future research should investigate host genetic diversity as a means of elucidating its role in the urbanisation transition on gut microbiomes.

In this sense, we highlight that ethnicity has also been found to play a role in determining gut microbiome structures, as it can serve as a proxy for dietary and lifestyle variability²⁹. Considering the urban population of Belém is ethnically diverse³⁰ and the Tupaiú are made up of individuals from multiple Native American ethnicities³¹, it is possible that this may influence the high inter-individual variability observed among the Belém and Tupaiú populations. This is further supported by the homogeneous ethnicity of the Xikrin, which also displayed homogeneous gut microbial profiles, but is contradicted by the microbial variability seen among the Suruí, which are not ethnically diverse³².

Regarding clustering analyses with other South American traditional populations, the Xikrin (R) showed more proximity to the Andean Tunapuco⁵ than to the recently contacted Yanomami of Venezuela⁴. Despite both Yanomami and Xikrin being Amazonian native communities, the Yanomami follow a hunter-gatherer lifestyle, while the Xikrin are adapted to an agricultural system. In addition, this might explain the separation between the Xikrin and other hunter-gatherers such as the Bostwana San and the Tanzania Sandawe²² (Supplementary information 1: Figure S10A), and their similarities with the Tunapuco population, which also presents rural agriculture subsistence strategies (Fig. 5a)⁵. It is important, however, to state the possible bias in interpreting meta-population microbiome data given the technical differences employed in the generation of each dataset.

Nonetheless, compared to other rural populations, all the Amazonian samples analysed in this study showed higher abundances of *Coprococcus*, *Lachnospira* and *Sutterella* taxa (Supplementary information 1: Figure S8). A similar abundance of such groups was found to be associated with urban populations

of Burkina Faso and Italy²⁷. *Lachnospiraceae* family seems to be associated with non-communicable diseases such as obesity and metabolic syndrome³³, while its *Coprococcus* genus has also been associated with low high-density lipoprotein concentrations, high blood pressure and hyperglyceridaemia across the epidemiological transition³⁴. Members of the *Lachnospiraceae* family (such as *Coprococcus*) were also found to be enriched among the Native American Cheyenne and Arapaho individuals from North America, which are increasingly shifting towards an industrialised lifestyle pattern³⁵. Considering a recent report³⁶ showing increased prevalence of obesity and type 2 diabetes among the Xikrin (R), the abundance of these taxa points to a gut microbiome similar to that of urbanised populations even in an environment with minimal intake of processed foods and medication, difficult access and linguistic barriers. In an Amazonian rural Native American population, this double burden of diseases can lead to public health issues.

An urbanisation of the gut microbiome of rural populations is also corroborated by PICRUSt metabolic pathway predictions. Despite limitations of this approach, predictions show an increasing abundance of pathways linked to urbanised microbiomes among Amazonian populations, such as membrane transport, carbohydrate metabolism and xenobiotics biodegradation, similar to what has been seen for Bantu, Tanzania and Botswana populations undergoing urbanisation^{8,22}. As discussed by Gomez et al.⁸ for the Bantu individuals, such pathways are associated with higher exposure to pesticides as well as food additives, frequently present in industrialised and processed foods.

The gut microbiome characterisation of heterogeneous traditional/rural and urban communities from the Amazon represents the opportunity to observe the worldwide tendency of changes in gut microbiome composition and transitions in an environment known for its tremendous biodiversity. We observe a local and global transitioning gradient among such populations, with the Native American Xikrin (R) as the most rural-like microbiome and similar to that of other agricultural South American societies. Suruí (R) and Tupaiú (R) show a transitioning microbiome with both signs of traditional and industrialised communities, and the urban Belém (U) was similar to the urban and semi-urban African population.

It is critical that we promote the inclusivity of diverse populations in microbiome research to allow that all human groups benefit from scientific/clinical advancements. The increasing rhythm observed in the prevalence of metabolic diseases and its association with gastrointestinal microbiomes makes the characterisation of Amazonian gut microbiomes an urgent topic in terms of public health. Further studies should investigate a longitudinal perspective for tracking the transition process while controlling for disease biomarkers and host genetic factors.

METHODS

Ethics approval

Ethics approval and indigenous territory entry permits were obtained through the Research Ethics Council from the Federal University of Pará and from the National Council on Research Ethics, under protocol number 3.094.486. Written informed consent was obtained from the urban-living participants individually and a group consent was obtained from the ethnic leadership in each Native American community, as established in the Brazilian legislation for research in Native American communities (CNS 304/2000). This research was carried out according to the ethical principles established by the Declaration of Helsinki.

Population characterisation

We sampled 114 individuals from four locations in the Brazilian Amazon including rural Native American communities (Xikrin, *N* = 22, Suruí, *N* = 30 and Tupaiú, *N* = 30) and one urban population (Belém, *N* = 32). All three

Native American communities were visited during the dry season in the Amazon rainforest, which spans from May to December. Figure 1 shows population locations in relation to South America and the Brazilian Amazon. Maps were designed by the authors in QGIS v.3.18 using geographical limits from IBGE public database^{37,38}.

Access to the Trincadeira-Bacajá indigenous territory, home to the Cateté Xikrin and Bacajá Xikrin ethnic groups, is the most difficult as it requires over 12 h of land and river travel through the dense Amazonian rainforest, characterising it as the most remote of the sampled populations. The Cateté and Bacajá Xikrin people inhabit opposing sides of the territory and are named according to nearby rivers. In this study, we included the Bacajá Xikrin individuals (here referred to as Xikrin), who inhabit the margins of the Bacajá River. Subsistence practices among the Xikrin include mostly subsistence agriculture (sweet potatoes, cassava, corn, pumpkin and bananas), small game hunting, fishing and gathering of nuts and fruits. The Xikrin are known for hunting and gathering over long distances across the territory, which allows for a great food variety.

The Suruí live in the Sororó indigenous territory and access is done by land; the villages are located ~100 km from the closest rural town. Subsistence modes among the Suruí consist of small-scale cattle raising, rice cultivation and small game hunting, and is progressively less dependent on subsistence agriculture, although it is still present mainly through cassava root and sweet potatoes. Industrialised food products such as frozen poultry, sugar, dairy and crackers are increasingly common.

The Tupaiú are one of the several emergent Native American people that inhabit the Tapajós-Arapiuns Extractive Reserve, located by the margins of the Tapajós River, a major tributary of the Amazon River³¹. Access to this territory is only possible by boat or helicopter. Nevertheless, communication among neighbouring villages is common, and communities are frequently formed by people from multiple ethnic backgrounds. Located in a riverine setting, the subsistence practices are largely dependent on fishing, small game, cassava root agriculture and fruit harvesting.

The urban population from Belém was recruited in the Federal University of Pará (UFPA) and samples consisted of university students, faculty members and surrounding neighbourhoods. Belém is the capital and largest city of the Pará state, in the northern region of Brazil, and is located at the mouth of the Amazon River. The typical diet reported by participants consists mainly of rice, beans, animal protein, manioc flour, dairy products and industrialised foods.

Sampling and metadata collection

Each participant received a stool collection container with a lid and instructions for collecting the sample. When received by the research staff, a midsection of the stool sample was immediately stored in a 5 mL tube containing RNA/later stabilising solution (Thermo Fisher Scientific) and frozen at -20°C until arrival at UFPA, where samples underwent immediate DNA extraction.

Metadata collection for dietary information consisted of individual dietary habits interviews with urban-living participants and several interviews with ethnic leaders in the Native American populations. Further, stool samples were microscopically examined for intestinal parasites, and medical information regarding medication intake, previous and current diseases were obtained through the local medical staff responsible for each community or through individual interviews with urban-living participants.

DNA extraction and 16S rDNA amplicon sequencing

Total DNA from faecal samples was extracted using the DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol with small modifications. Eluted DNA was quantified with fluorometry and subsequently stored at -20°C . The next-generation sequencing library preparation was carried out according to the Illumina Metagenomic Sequencing Library Prep protocol with established primers and Illumina Nextera adapters targeting the V3–V4 region of the 16S rDNA, as follows: Bakt 341F (CCTACGGGNGGCWGCAG) and Bakt 805R (GACTACHVGGG-TATCTAATCC). Libraries were subsequently pooled and quantified with TapeStation (Agilent, Santa Clara, CA) before being sequenced as 300 bp paired-end reads on the Illumina MiSeq platform in two sequencing runs, yielding an average $141,377 \pm 52,840$ raw reads per sample.

Quality control and ASV classification

Initial raw data quality visualisation was carried out in FastQC³⁹. All raw read quality control was performed in Quantitative Insights into Microbial Ecology (QIIME 2) software⁴⁰. Reads were demultiplexed, denoised, merged, low-quality reads were trimmed, filtered and chimeras were removed using DADA2⁴¹. After filtering, reads per sample were an average of $11,925 \pm 4051$. Amplicon sequence variant (ASV) data were generated by a Naive–Bayes machine-learning classifier in QIIME 2, which subsequently output a feature table identifying a total of 39,085 ASVs. A phylogenetic tree was inferred from ASVs using FastTree v.2.1.3⁴² and taxonomic classification was carried out in QIIME 2 using a Naive–Bayes classifier based on Greengenes database v.13.8 clustered at 97% similarity. Prior to taxonomic analyses, we removed one sample that yielded no mapped reads and any singleton ASVs and taxa with an unassigned phylum level.

Data analyses

All alpha- and beta-diversity analyses were performed in R v.3.5.3⁴³ using “phyloseq”⁴⁴ and “vegan” packages⁴⁵. Based on rarefaction curves (Supplemental information 1: Figure S12), we rarefied samples to 5000 reads to compute a number of observed species, Simpson, Chao1 and Shannon diversity metrics, which maintained 97.3% of samples and 75% of operational taxonomic units (OTUs) (Supplementary Data 1: Table 1). Statistical differences among population alpha diversity were tested using one-way ANOVA and Kruskal–Wallis H and pairwise comparisons were computed using T test and Wilcoxon's rank-sum (Mann–Whitney U) test.

Beta diversity analyses were carried out by normalising unrarefied sample counts to relative abundances, removing taxa unobserved in at least 1% of samples and agglomerating taxa to genus level. We computed Bray–Curtis, Unifrac and Weighted Unifrac distances. Differences in dispersion from centroids in both Unifrac and Weighted Unifrac distances were tested with PERMANOVA. Pairwise PERMANOVA implemented in the *adonis* function of the “vegan”⁴⁵ package in R was used to determine distances between population pairs. Spearman's correlations were used to evaluate the relationship between alpha- and beta-diversity metrics. PCoA was computed in R using ggplot2 package⁴⁶.

To compare our samples to data from other worldwide population gut microbiomes, we downloaded the filtered data from each study^{4,5,7,17,22} and performed OTU picking and taxonomic assignment with QIIME 2 using vsearch closed-reference based on Greengenes v.13.8 clustered at 97% similarity.

The most prevalent genus was determined considering taxa present in at least 1% of samples. The core microbiome taxa for each population were computed by determining taxa observed at least three times in the dataset and with a minimum frequency of 50% of samples within each population. Results were observed through an interaction network at genus and phylum levels created using the Cytoscape software (<http://www.cytoscape.org/>). Statistical analyses were carried out through hypergeometric enrichment tests to determine significant overlaps between core microbiomes of different populations using the *hyper* function in R v.3.5.3 “stats” package v.3.6.2⁴³. P values were adjusted for multiple testing with the Benjamini–Hochberg method (Supplementary Data 1: Table 2).

Correlations between OTU abundances were calculated using SparCC software implemented in python²³. For this analysis, we selected only the taxa present in at least 5% of samples to avoid any false correlations for low abundant taxa. Results were represented as a heatmap with Ward's hierarchical clustering of taxa based on the dissimilarity matrix. The optimal number of clusters was determined based on k -means and PAM methods and validated with Hopkins statistic. An interaction network for visualisation was created with the Cytoscape software.

To test differences in taxa abundance among Amazonian and worldwide microbiome samples, we used ANCOM²⁴, which accounts for the compositional nature of microbiome data. W -statistic cut-offs are reported in Supplementary Data 1: Table 3, but significance was defined as $W > 0.9$ in this analysis. Relative abundances are shown as the logarithm of re-scaled abundances as described by Hansen et al.²².

For functional prediction analyses, reads were taxonomically classified by closed-reference using vsearch with Greengenes v.13.5 database clustered at 97% similarity. KEGG pathways were predicted using PICRUSt 1 v.1.1.4²⁵. Predicted metagenome functions were collapsed at level 2 pathways, and after removing eukaryote-related pathways, they were analysed using ANCOM²⁴ to determine differentially abundant pathways among the population. Results were displayed in boxplots of relative abundances and p values were determined by Kruskal–Wallis H test and pairwise Wilcoxon's rank-sum (Mann–Whitney U) test.

Reporting summary

Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

DATA AVAILABILITY

Datasets generated in this study are available in the European Nucleotide Archive repository under accession number: PRJEB39990. Worldwide data analysed in this research is deposited in EBI with IDs ERA387449 and ERP008799⁴, NCBI Sequence Read Archive with ID PRJNA395034²², European Nucleotide Archive with ID PRJEB30836⁷, QIIME database ID 1448⁵, and NCBI Sequence Read Archive ID PRJNA547608¹⁷.

Received: 29 January 2021; Accepted: 8 July 2021;

Published online: 05 August 2021

REFERENCES

- Yatsunenko, T. et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **486**, 222–227 (2012).
- Lloyd-Price, J., Abu-ali, G. & Huttenhower, C. The healthy human microbiome. *Genome Med.* **8**, 1–11 (2016).
- Schnorr, S. L. et al. Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. *Nat. Commun.* **5**, 3654 (2014).
- Clemente, J. C. et al. The microbiome of uncontacted Amerindians. *Sci. Adv.* **1**, e1500183 (2015).
- Obregon-tito, A. J. et al. Subsistence strategies in traditional societies distinguish gut microbiomes. *Nat. Commun.* **6**, 6505 (2015).
- Smits, S. A. et al. Seasonal cycling in the gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers of Tanzania. *Science* **357**, 802–805 (2017).
- Lokmer, A. et al. Response of the human gut and saliva microbiome to urbanization in Cameroon. *Sci. Rep.* **10**, 2856 (2020).
- Gomez, A. et al. Gut microbiome of coexisting BaAka pygmies and Bantu reflects gradients of traditional subsistence patterns. *Cell Press* **14**, 2142–2153 (2016).
- Davenport, E. R. et al. Seasonal variation in human gut microbiome composition. *PLoS ONE* **9**, e90731 (2014).
- Morton, E. R. et al. Variation in Rural African Gut Microbiota Is Strongly Correlated with Colonization by Entamoeba and Subsistence. *PLoS Genet.* **11**, 1–28 (2015).
- Blaser, M. J. The theory of disappearing microbiota and the epidemics of chronic diseases. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 461–463 (2017).
- Sonnenburg, E. D. & Sonnenburg, J. L. The ancestral and industrialized gut microbiota and implications for human health. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 383–390 (2019).
- Ou, J. et al. Diet, microbiota, and microbial metabolites in colon cancer risk in rural Africans and African Americans. *Am. J. Crit. Nutr.* **98**, 111–120 (2013).
- Sonnenburg, E. D. et al. Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. *Nature* **529**, 212–215 (2016).
- Noce, A. et al. Impact of gut microbiota composition on onset and progression of chronic non-communicable diseases. *Nutrients* **11**, 1073 (2019).
- Foster, K. R., Schluter, J., Coyte, K. Z. & Rakoff-nahoum, S. The evolution of the host microbiome as an ecosystem on a leash. *Nature* **548**, 43–51 (2017).
- Pires, E. S. et al. The gut microbiome and metabolome of two riparian communities in the Amazon. *Front. Microbiol.* **10**, 2003 (2019).
- EIA-RIMA. *Estudo Socioambiental da TI Trinchira/Bacajá - EIA-RIMA do Projeto AHE Belo Monte* (EIA-RIMA, 2009).
- IBGE. *Censo Demográfico 2010: Características gerais dos indígenas - Resultados do universo* (IBGE, 2010).
- ICMBio. *Plano de Manejo - Reserva Extrativista Tapajós-Arapiuns (Diagnóstico)* (ICMBio, 2012).
- IBGE. *Censo Brasileiro de 2010* (IBGE, 2010).
- Hansen, M. E. B. et al. Population structure of human gut bacteria in a diverse cohort from rural Tanzania and Botswana. *Genome Biol.* **20**, 16 (2019).
- Friedman, J. & Alm, E. J. Inferring correlation networks from genomic survey data. *PLoS Comput. Biol.* **8**, e1002687 (2012).
- Mandal, S. et al. Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. *Microb. Ecol. Health Dis.* **26**, 27663 (2015).
- Langille, M. G. I. et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat. Biotechnol.* **31**, 814–821 (2013).
- Soverini, M. et al. Variations in the post-weaning human gut metagenome profile as result of bifidobacterium acquisition in the western microbiome. *Front. Microbiol.* **07**, 1058 (2016).
- De Filippo, C. et al. Diet, environments, and gut microbiota. A preliminary investigation in children living in rural and urban Burkina Faso and Italy. *Front. Microbiol.* **8**, 1979 (2017).
- ABES. *Ranking ABES da Universalização do Saneamento* (ABES, 2020).
- Dwiyanto, J. et al. Ethnicity influences the gut microbiota of individuals sharing a geographical location: a cross-sectional study from a middle-income country. *Sci. Rep.* **11**, 2618 (2021).
- de Souza, A. M., Resende, S. S., de Sousa, T. N. & de Brito, C. F. A. A systematic scoping review of the genetic ancestry of the Brazilian population. *Genet. Mol. Biol.* **42**, 495–508 (2019).
- Bartolomé, M. A. As etnógeneses: velhos atores e novos papéis no cenário cultural e político. *Mana* **12**, 39–68 (2006).
- Ribeiro-dos-Santos, A. M. et al. Exome sequencing of native populations from the Amazon reveals patterns on the peopling of South America. *Front. Genet.* **11**, 548507 (2020).
- Vacca, M. et al. The controversial role of human gut Lachnospiraceae. *Microorganisms* **8**, 573 (2020).
- Fei, N. et al. The human microbiota is associated with cardiometabolic risk across the epidemiologic transition. *PLoS ONE* **14**, e0215262 (2019).
- Sankaranarayanan, K. et al. Gut microbiome diversity among Cheyenne and Arapaho individuals from western Oklahoma. *Curr. Biol.* **25**, 3161–3169 (2016).
- Barbosa, C. C., Sacuena, E. S. R., Pinto, A. M., Cardoso-Costa, G. L. & Guerreiro, J. F. Anthropometric and metabolic profile of a Brazilian Amerindian group: The Xikrin (Mebengôkre). *Am. J. Hum. Biol.* **31**, e23255 (2019).
- QGIS Development Team. *QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. v.3.18* (QGIS Development Team, 2021).
- IBGE. Portal de Mapas - Bases Cartográficas Contínuas. <https://portaldemaps.ibge.gov.br/portal.php#homepage> (IBGE, 2020).
- Andrews, S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (2010).
- Caporaso, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* **7**, 335–336 (2011).
- Callahan, B. J. et al. DADA2: high resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* **13**, 581–583 (2016).
- Price, M. N., Dehal, P. S. & Arkin, A. P. FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS ONE* **5**, e9490 (2010).
- R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing* (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2020).
- McMurdie, P. J. & Holmes, S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE* **8**, e61217 (2013).
- Oksanen, J. et al. *vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-6.* <https://CRAN.R-project.org/package=vegan> (2019)
- Wickham, H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis* (Springer, 2016).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the urban and traditional Amazonian communities and individuals who participated in this study. We also thank Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Amparo e Desenvolvimento da Pesquisa (FADESP/Brazil) and Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPEP) of Universidade Federal do Pará (UFPA) for the received grants. This work is part of Rede de Pesquisa em Genômica Populacional Humana (Biocomputacional—Protocol no. 3381/2013/CAPES). We highlight that A.P.S. is supported by CAPES/Brazil (88882.160155/2017-01), G.C.C. is supported by HYDRO/UFPA/FADESP (4227) and A.R.-d.S. is supported by CNPq/Produtividade (304413/2015-1). The funders had no role in the study design or preparation of the manuscript.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.P.S. and A.R.-d.S. conceived and designed the experiments. A.P.S., G.C.C., and L.M. performed the experiments. A.P.S. and D.S. analysed the data. A.P.S., E.R.P.S., J.C., D.F., V. J.M., and J.F.G. performed participant recruitment and sample processing. A.P.S. and A.R.-d.S. wrote and critically revised the manuscript.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41522-021-00237-0>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Å.R.-d.S.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing,

adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

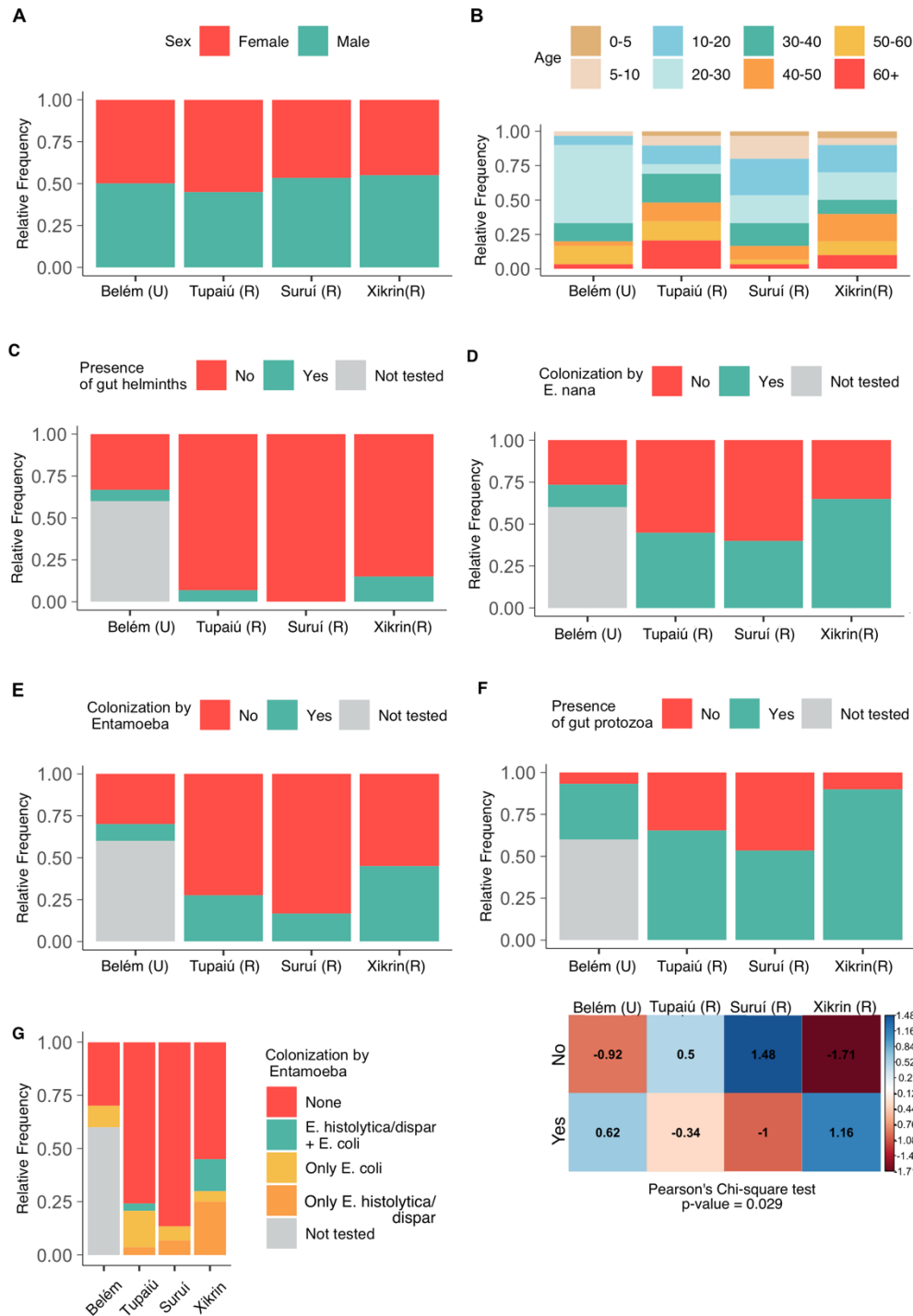


Figure S1

Metadata collection. A) Sex relative frequency per population. B) Relative frequencies of age groups per population. C) Presence of gut helminths as determined by microscopic examination of fecal samples. D) Gut colonisation by *Endolimax nana*. E) Gut colonisation by *Entamoeba* sp. F) Presence of gut protozoa as determined by microscopic examination of fecal samples (Pearson's Chi-Square test, p value = 0.029). G) Subtypes of *Entamoeba* sp. observed in fecal samples.

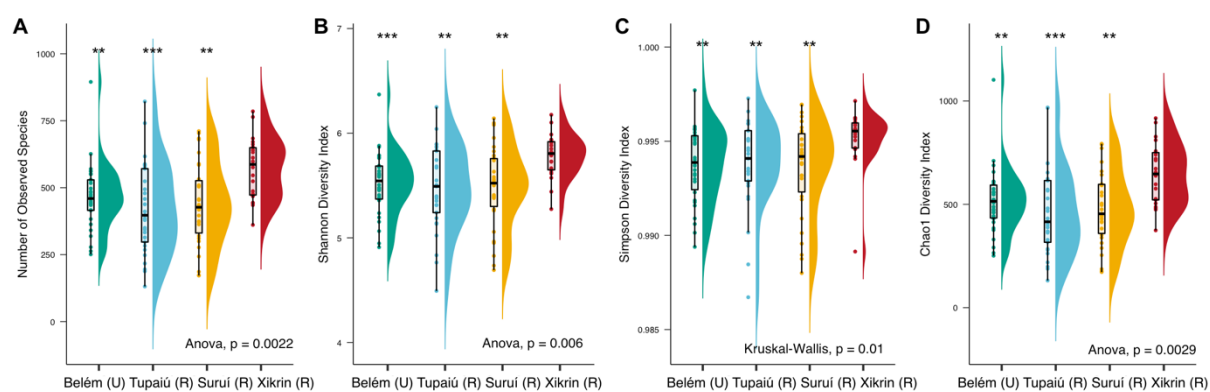


Figure S2

Alpha diversity measures. A) Number of observed species. B) Shannon diversity index. C) Simpson diversity index. D) Chao1 diversity index.

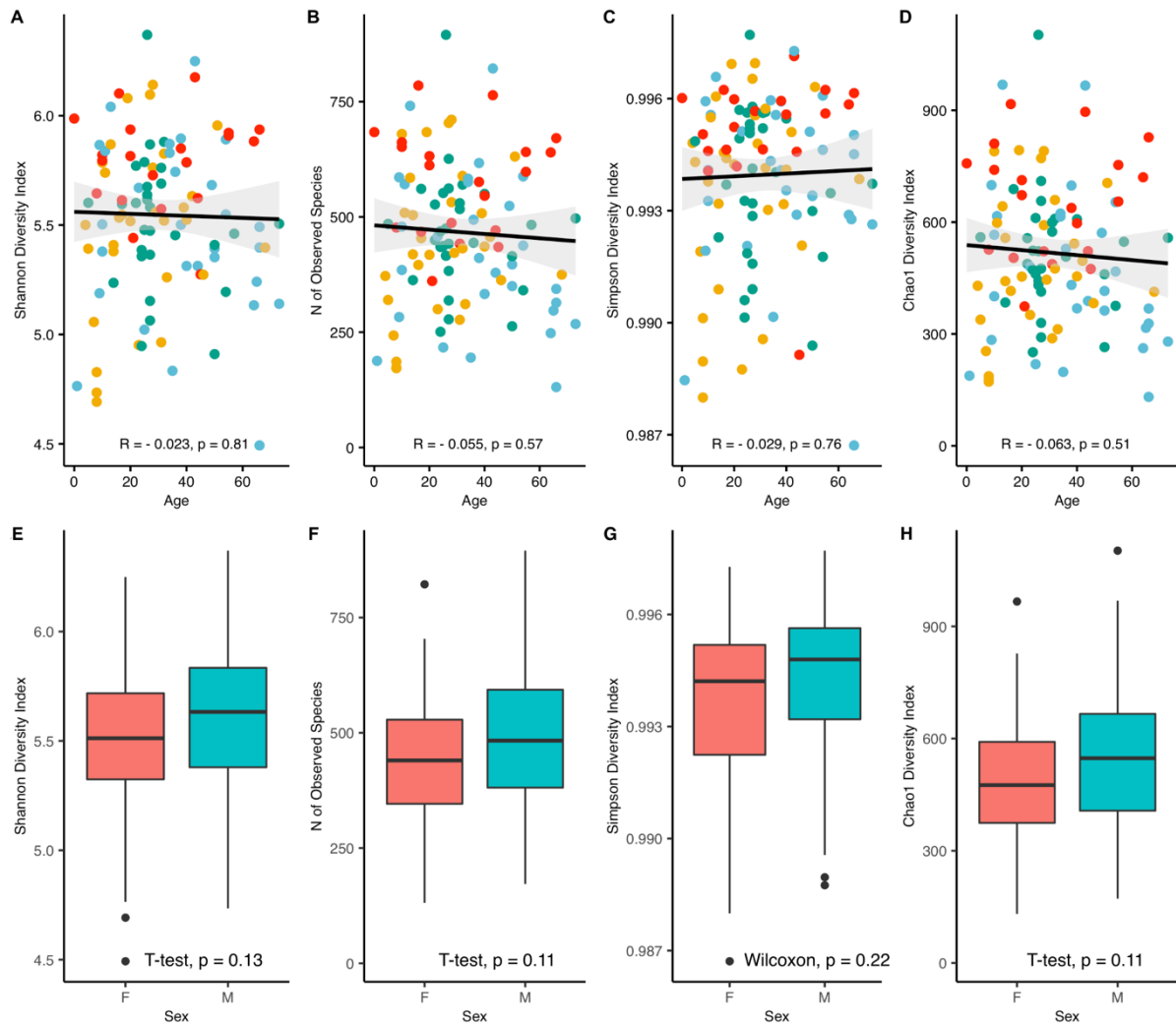


Figure S3

Box plots and scatter plots of alpha diversity indexes and information on participant age and sex. Significance was determined using Spearman correlation, t-test, and Wilcoxon rank sum (Mann Whitney U) tests. (Red = Xikrin (R), Yellow = Suruí (R), Blue = Tupaiú (R), Green = Belém (U)).

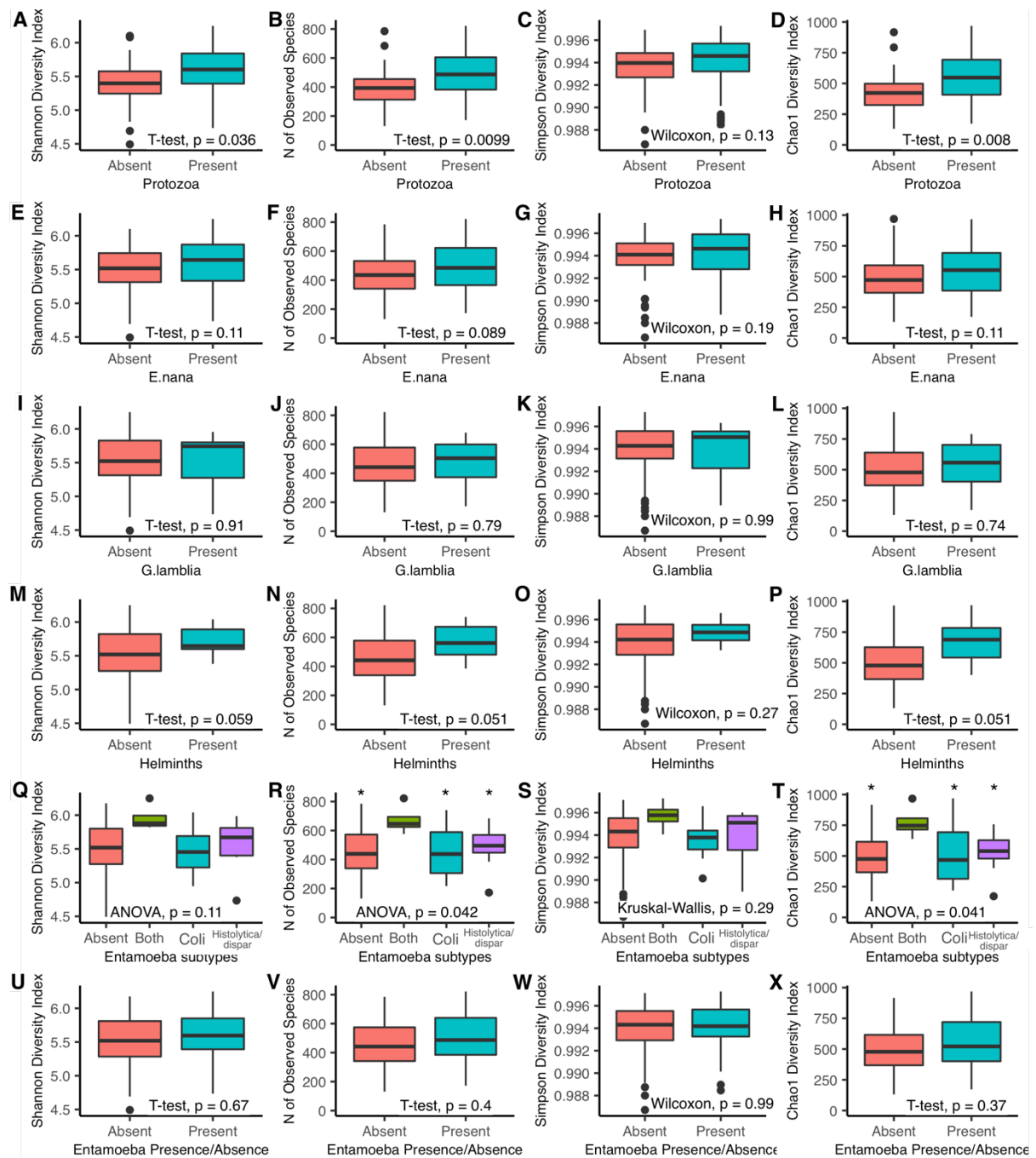


Figure S4

Box plots of alpha diversity indexes and metadata variables. A-D: Gut protozoa colonisation. E-H: Gut colonisation by *Endolimax nana*. I-L: Gut colonisation by *Giardia lamblia*. M-P: Gut helminth colonisation. Q-T: Gut colonisation by *Entamoeba* species. U-X: Gut colonisation by *Entamoeba* sp. Significance was determined using t-test, Wilcoxon rank sum (Mann Whitney U), ANOVA, and Kruskal-Wallis H tests.

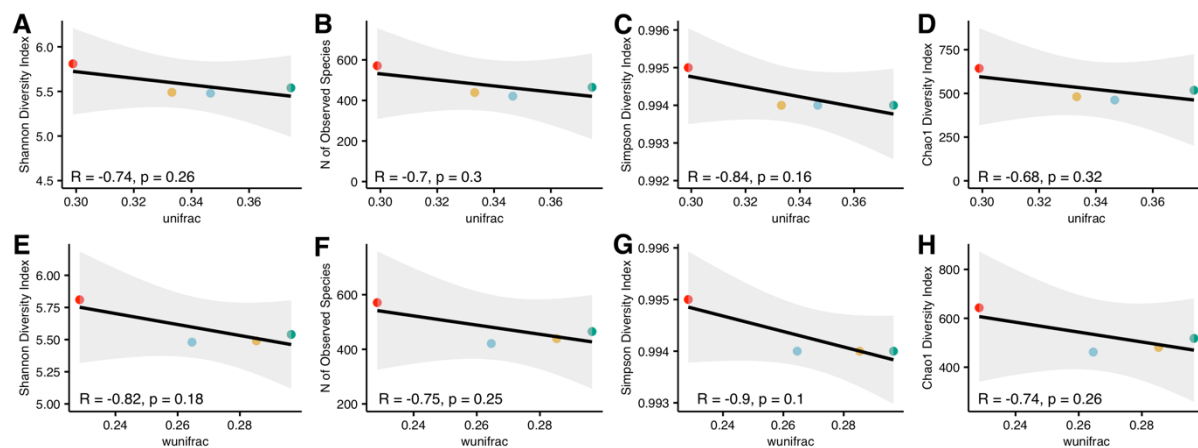


Figure S5

Scatter plots of within-population mean alpha diversity indexes versus weighted and unweighted Unifrac distances. Significance was determined using Spearman correlation tests. (Red = Xikrin (R), Yellow = Suruí (R), Blue = Tupaiú (R), Green = Belém (U)).

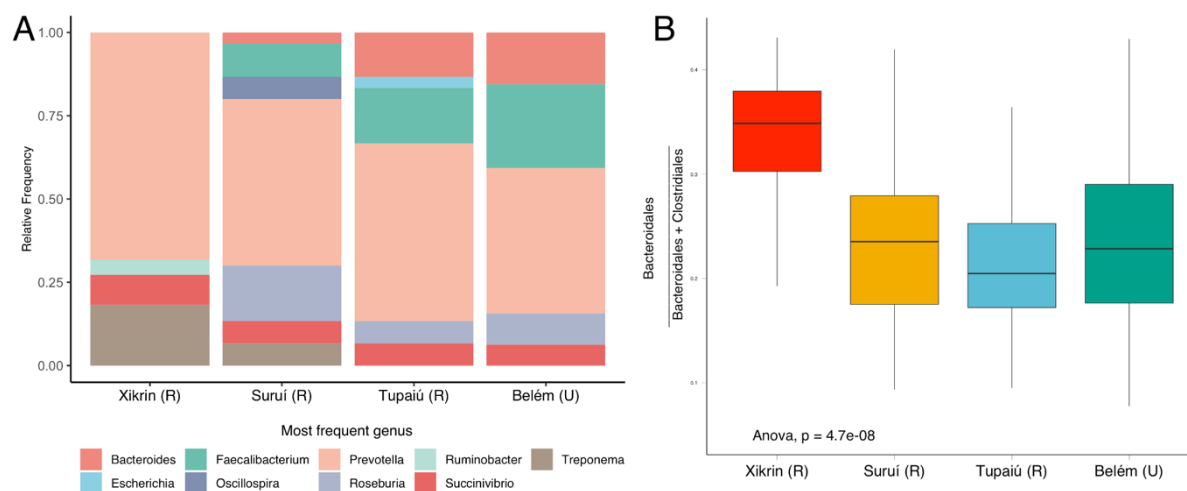


Figure S6

Taxa distribution among populations. A) Distribution of most prevalent genera among population groups. B) Relative proportion of *Bacteroidales* per total of *Bacteroidales* and *Clostridiales* across population groups.

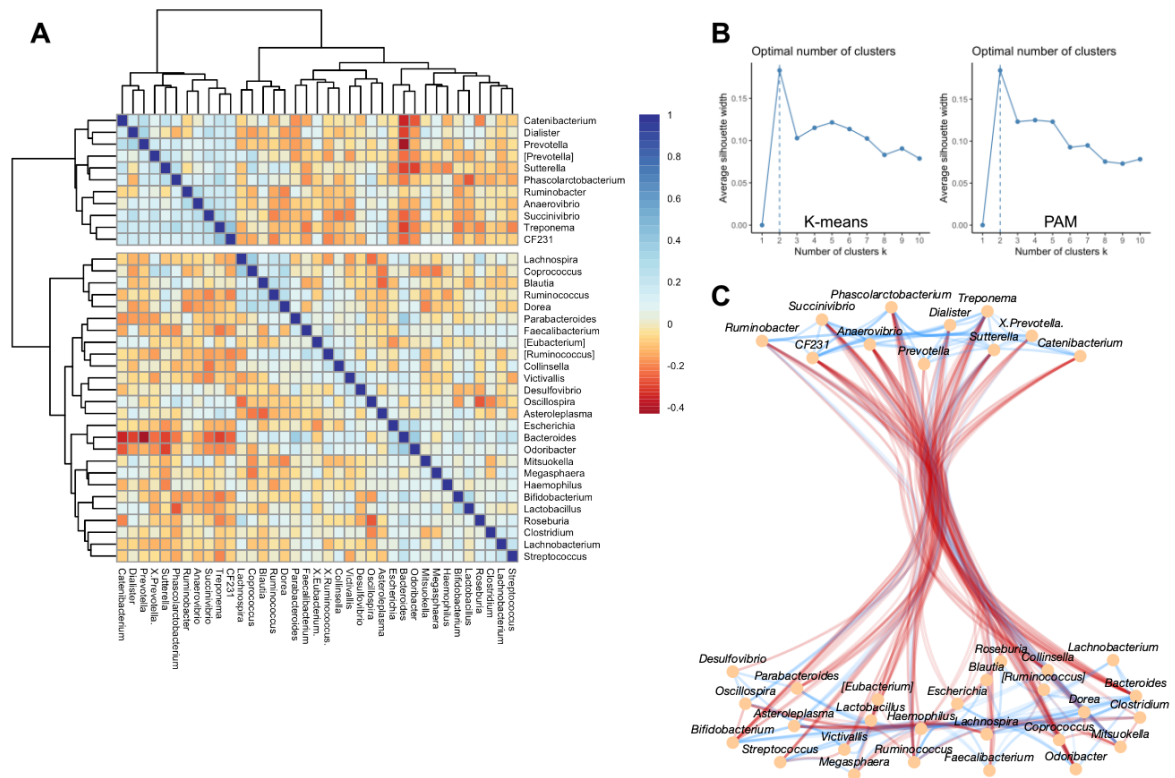


Figure S7

Microbial co-abundance analyses. A) Heatmap based on microbial sparse correlation coefficients. B) Co-abundance clustering tendencies based on k-means and PAM methods. C) Network representation of microbial co-abundance patterns, where blue edges indicate positive correlations and red represent negative correlations.

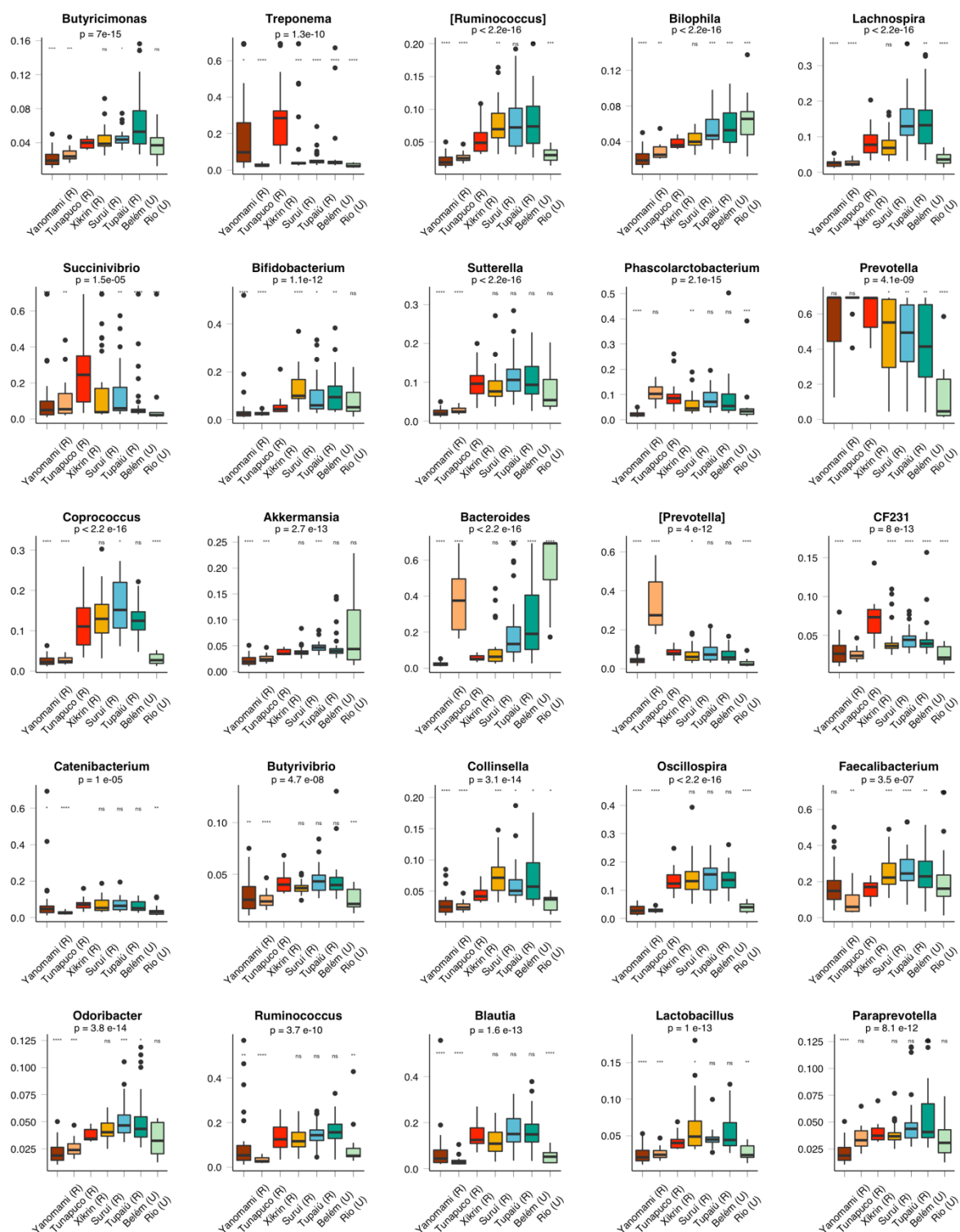


Figure S8

ANCOM results comparing differential abundances among taxa from other South American populations. Populations are ordered from most rural (left) to most urbanised (right) lifestyles. R = rural, SU = semi-urban, U = urban. Displayed p -values refer to Kruskal-Wallis H statistical tests.

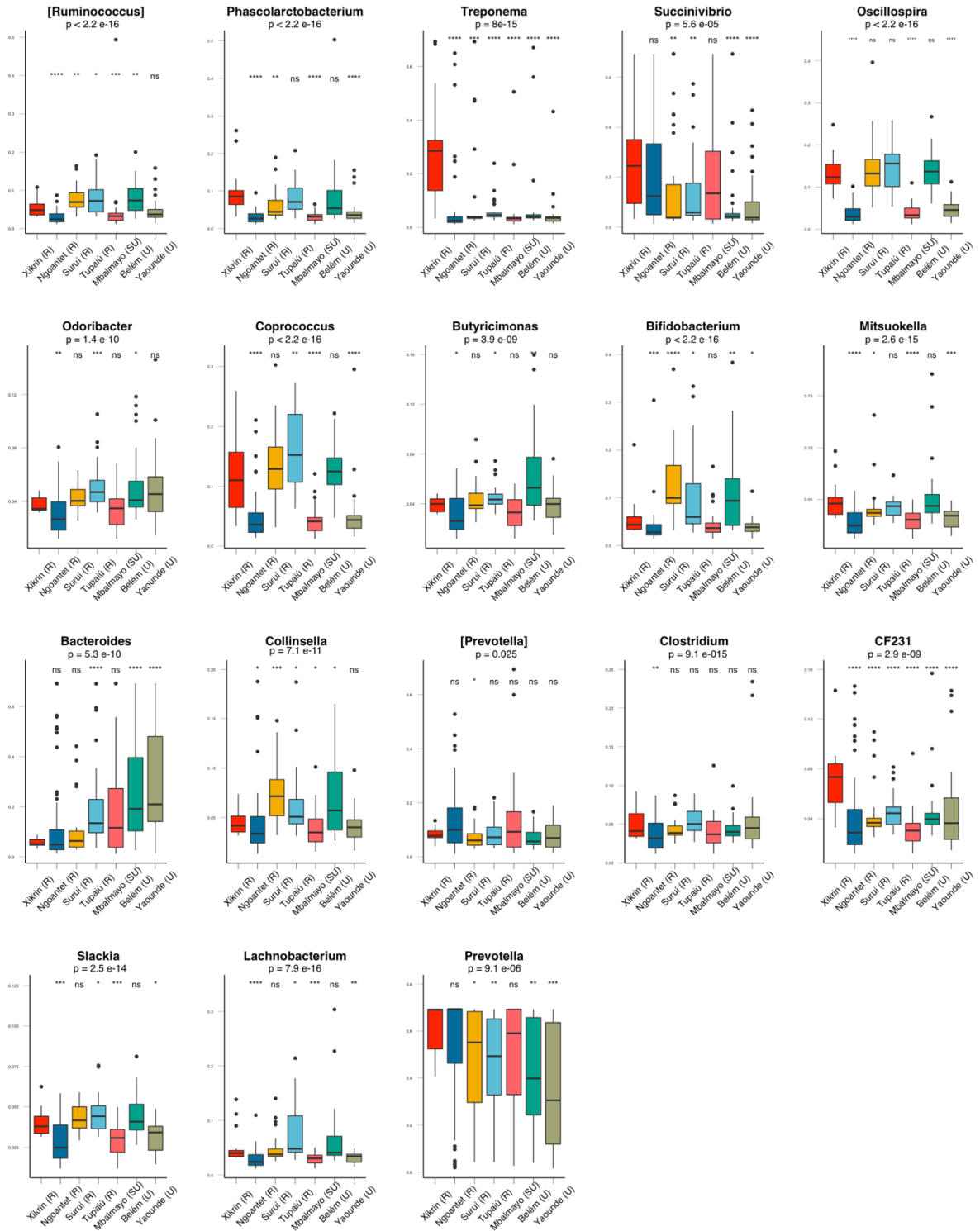


Figure S9

ANCOM results comparing differential abundances among taxa from African Cameroonian populations living in an urbanization gradient. Populations are ordered from most rural (left) to most urbanized (right). R = rural, SU = semi-urban, U = urban. Displayed *p*-values refer to Kruskal-Wallis H statistical tests.

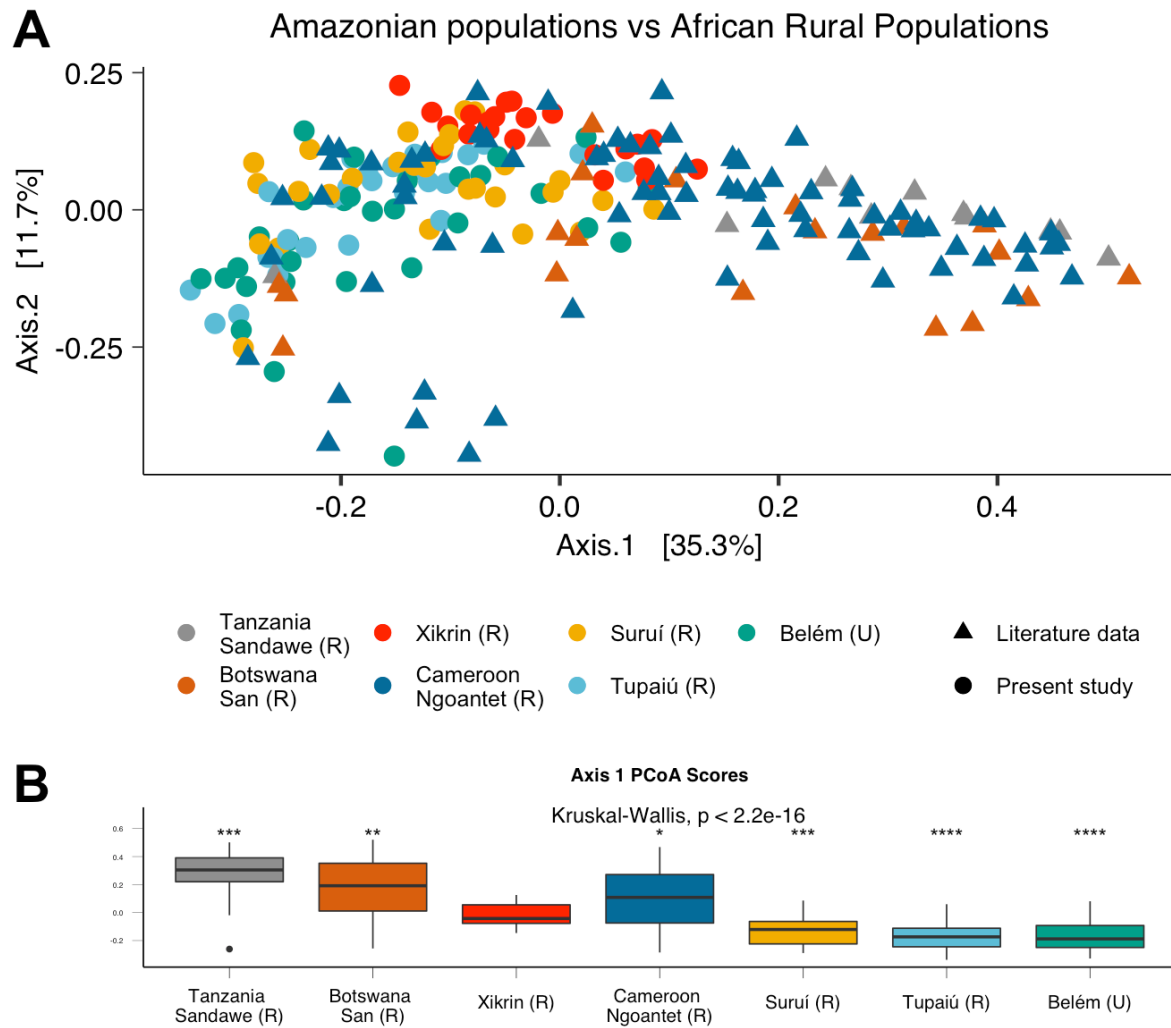


Figure S10

A) Principal Coordinate Analysis for visualizing Brazilian Amazonian samples compared to African individuals living in rural settings. B) Boxplots of PCA scores along axis 1. R = rural, SU = semi-urban, U = urban.

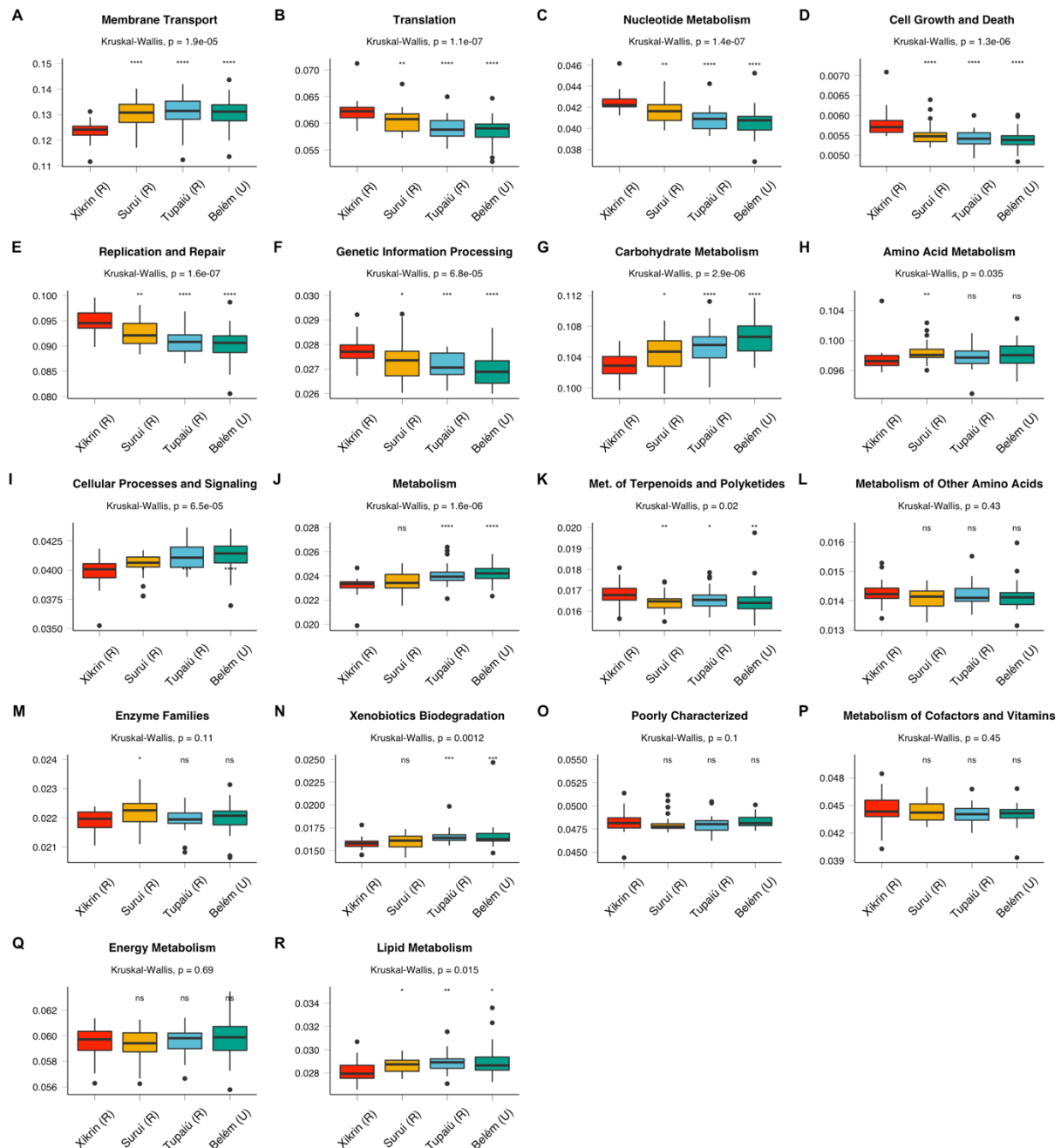


Figure S11

Boxplots of the relative abundance of differentially abundant KEGG Level 2 pathways as determined by ANCOM on PICRUSt functional prediction results. Here, significance is considered based on $W = 0.6$ ANCOM threshold. Global and pairwise statistical comparisons were carried out with Kruskal-Wallis H and Wilcoxon (Mann Whitney U) tests.

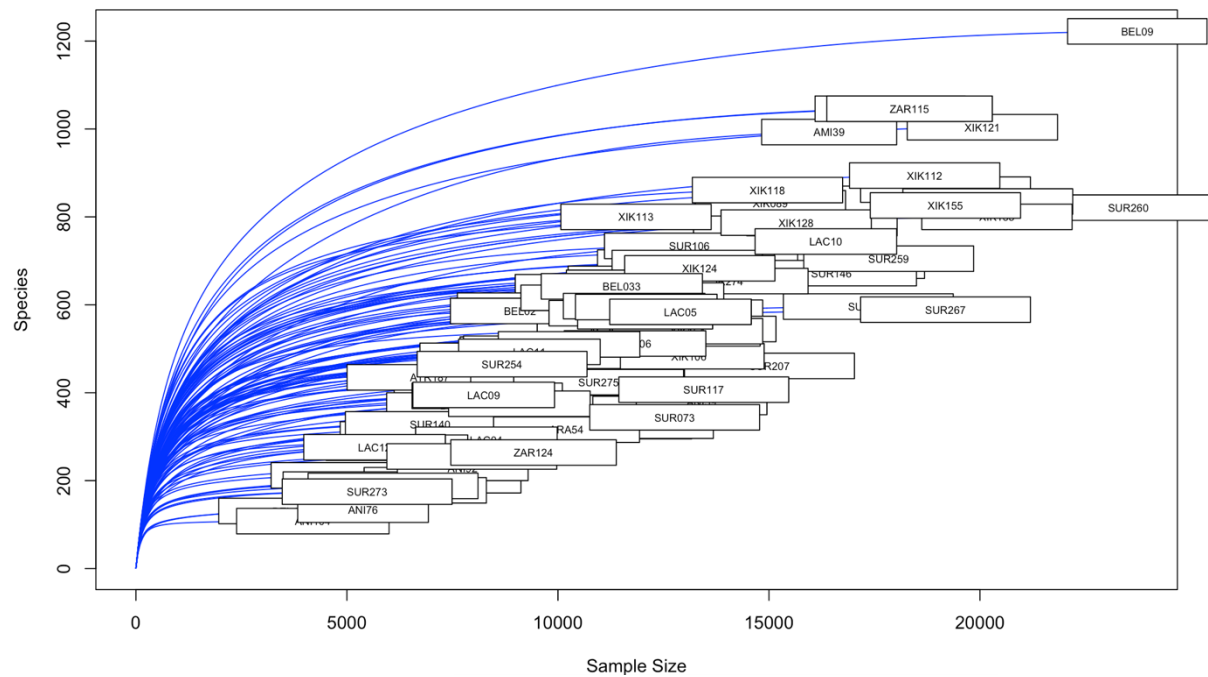


Figure S12

Species accumulation (rarefaction) curve to determine the number of species detected as a function of the number of sequences per sample. According to the rarefaction curve, the sampling effort was sufficient to describe the bacterial diversity in the samples.

5. CAPÍTULO 2

Temporal dynamics of gut microbiomes in non-industrialized urban Amazonia

Artigo a ser submetido à revista ***Genome Biology***

ISSN: 1465-2148

Fator de impacto: 17.91 / Qualis A1

Temporal dynamics of gut microbiomes in non-industrialized urban Amazonia

Ana Paula Schaan¹; Amanda Vidal²; Anni Zhang^{3,4}; Mathilde Poyet^{3,4,5,7}; Eric J Alm^{3,4,7},
Mathieu Groussin^{3,4,6,7,*}; Ândrea Ribeiro-dos-Santos^{1,8,*}

¹Laboratório de Genética Humana e Médica, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil

²Instituto Tecnológico Vale, Belém, PA, Brazil

³Department of Biological Engineering, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA

⁴Center for Microbiome Informatics and Therapeutics, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA

⁵Institute of Experimental Medicine, Christian-Albrecht University of Kiel, Kiel, Germany

⁶Institute of Clinical Molecular Biology, Christian-Albrecht University of Kiel, Kiel Germany

⁷The Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, MA, USA

⁸Center for Oncology Research, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil

*Corresponding authors

ABSTRACT

Increasing levels of industrialization have been associated with changes in gut microbiome structure and loss of features thought to be crucial for maintaining gut ecological balance. The stability of gut communities over time seems to be largely affected by this transition, but has been overlooked among transitioning populations from low to middle-income countries. Here, we used shotgun sequencing to characterize the temporal dynamics of gut microbiomes of 24 individuals living in an urban non-industrialized lifestyle in the Brazilian Amazon and contextualized our data with 165 matching longitudinal samples from an urban industrialized and a rural non-industrialized population. Results show that gut microbiome composition and diversity is increasingly variable over time among non-industrialized individuals and that the same taxa may have different temporal dynamics across populations. Using enterotype classifications we show that temporal shifts in microbiome structure may lead to enterotype changes within healthy individuals. Further, by tracking genomes over time, we show that levels of strain replacements are more frequent among Amazonian individuals and that microbial populations of the *Bacteroides* species are the most dynamic. Our results suggest that the stability of gut microbiomes is influenced by levels of industrialization and that microbial population dynamics is important to track how host-microbiome interactions will adapt to these transitions.

BACKGROUND

The gut microbiome consists of a complex and dynamic community of microbes that interacts closely with host physiology and has a large role in maintaining human health ¹. These communities are sensitive to perturbations, and it is well established that the composition of gut microbiomes is dependent upon environmental forces, such as host diet, antibiotic use, and sanitation practices ²⁻⁴.

Existing research recognizes the critical role of lifestyle and subsistence strategies in determining the structure and function of the gut microbiome. Overall, individuals living in rural non-industrialized societies show gut microbiomes with increased levels of diversity and abundance of dietary fiber-degrading taxa when compared to that of urban industrialized populations ⁴⁻⁶.

Among several features that distinguish microbiomes based on lifestyle, compositional shifts driven by annual seasonality have been presented as putative hallmarks of rural and traditional societies ^{7,8}. Such seasonal variability, reported among the Hadza hunter-gatherers of Tanzania, is thought to be caused by the cyclical availability of certain food groups, which in turn drives the cyclical abundance of bacterial taxa and phylogenetic diversity ⁸. Being that humans have been transitioning from foraging and hunter-gathering lifestyles to industrialization, the absence of these defining characteristics of isolated and rural microbiomes highlights the loss of potentially fundamental properties of host-microbiome adaptations in urbanizing populations.

Thus, in order to understand how transitions to urbanized lifestyles affect gut microbiome health, it is crucial to determine how these communities behave over time. Existing accounts on the stability of gut microbiomes in urban individuals point to highly resilient and stable communities, despite fluctuations at monthly and even daily timescales ⁹⁻¹¹. Defining what levels of temporal changes are expected for healthy individuals will aid in the understanding of microbiome-associated disease development. For instance, tracking the diversity of gut microbiomes over time can be used to predict the onset of type 2 diabetes ¹².

In middle and low-income countries, urbanization of gut microbiomes will likely have a negative impact on host health. Given that urbanization in these societies often includes high levels of socio-economic disparities that influence patterns of human nutrition, it is expected that nutritional and epidemiological transitions will influence the composition of gut microbiomes ¹³. However, what is currently known about the temporal dynamics of gut microbial populations is largely biased by data on high-income countries ^{11,14-17}.

Previously, we demonstrated the existence of an urbanization gradient in the Brazilian Amazon. Our results showed that the urban population of Belém, located on the margins of the Amazon basin, shares gut microbiome features with local indigenous populations, as well as with urban individuals from the United States and Cameroon, which thus characterizes an urbanization transition ⁶.

Here, we investigate the presence of seasonal cycling and temporal stability in the gut microbiome of individuals from Belém, an urban non-industrialized (UN) community in the Brazilian Amazon. By employing shotgun metagenomic sequencing, we examine species and strain level dynamics, while leveraging data from urban industrialized and rural non-industrialized individuals to appropriately contextualize temporal changes of gut communities among diverse populations.

RESULTS

Lifestyle variation between Amazonian seasons

In order to investigate the temporal variation in gut microbiomes of urban Amazonia, we enrolled 24 adult individuals living in the urban non-industrialized Amazonian city of Belém and carried out shotgun sequencing of 48 longitudinal stool samples from two time points. To include both rainforest seasons, samples were collected in March/April 2021 (wet season, T1) and July/August 2021 (dry season, T2). Additionally, three-day self-reported dietary records were collected for all individuals at both time points, along with other lifestyle metadata (Additional file 1: Table 1).

To effectively explore how stability may be affected by levels of urbanization and industrialization, we included two sets of gut microbiome longitudinal shotgun metagenomic data from the literature in our analysis. To represent an urban industrialized (UI) population, we retrieved data from 127 samples from the Broad Institute-OpenBiome Microbiome Library (BIO-ML), which consists of longitudinally collected stool samples of individuals living in the Boston area, USA ¹¹. To match time series data from Belém, we filtered data from Boston to include individuals who had collected stool samples in the interval of five to seven months, which yielded a total of 27 individuals (Figure 1A).

As an isolated-rural and non-industrialized (RN) population, we analyzed data from 38 stool samples of the Hadza hunter-gatherers of Tanzania that were collected across seasons ⁸. Importantly, only three individuals from the Hadza population were longitudinally sampled and selected for shotgun sequencing. Nonetheless, we incorporated this dataset as it consists of the only record of seasonal cycling of the gut microbiome in a rural population; when individual-level data was crucial, the dataset was disregarded from the analysis. For all populations, we hereby refer to time points as T1 (wet season or first collection date) and T2 (dry season or second collection date) (see Methods section).

Analysis of dietary records from Belém individuals showed that the average nutrient intake did not change between seasons in regards to animal proteins, total fats, fiber, and dairy consumption. However, we observed a decrease in the average intake of plant proteins and an increase in the consumption of açaí, an important local food staple, in T2 (Additional file 2: Figure S1). Overall, reported dietary habits were similar to what we had previously described ⁶, consisting of typically westernized food items combined with unprocessed, natural ingredients such as cassava flour and tropical fruits.

Stability of microbial diversity and composition across industrialization levels

The first set of analyses aimed to characterize how microbiome diversity is impacted across time (Figure 1). Unsurprisingly, overall, alpha diversity measures were significantly different between populations and followed a gradient of urbanization, with lowest microbial richness in Boston (UI) microbiomes, followed by Belém (UN) and the Hadza hunter-gatherers (RN) (Shannon index, Kruskal-Wallis, $p = 1.4e-11$) (Additional file 2: Figure S2). Seasonal-dependent variation in diversity was not observed in Belém and Boston, given there is no trend in increase or decrease of microbiome richness for any given time point, unlike the Hadza individuals, who display increased levels of alpha diversity during T2 (Figure 1B).

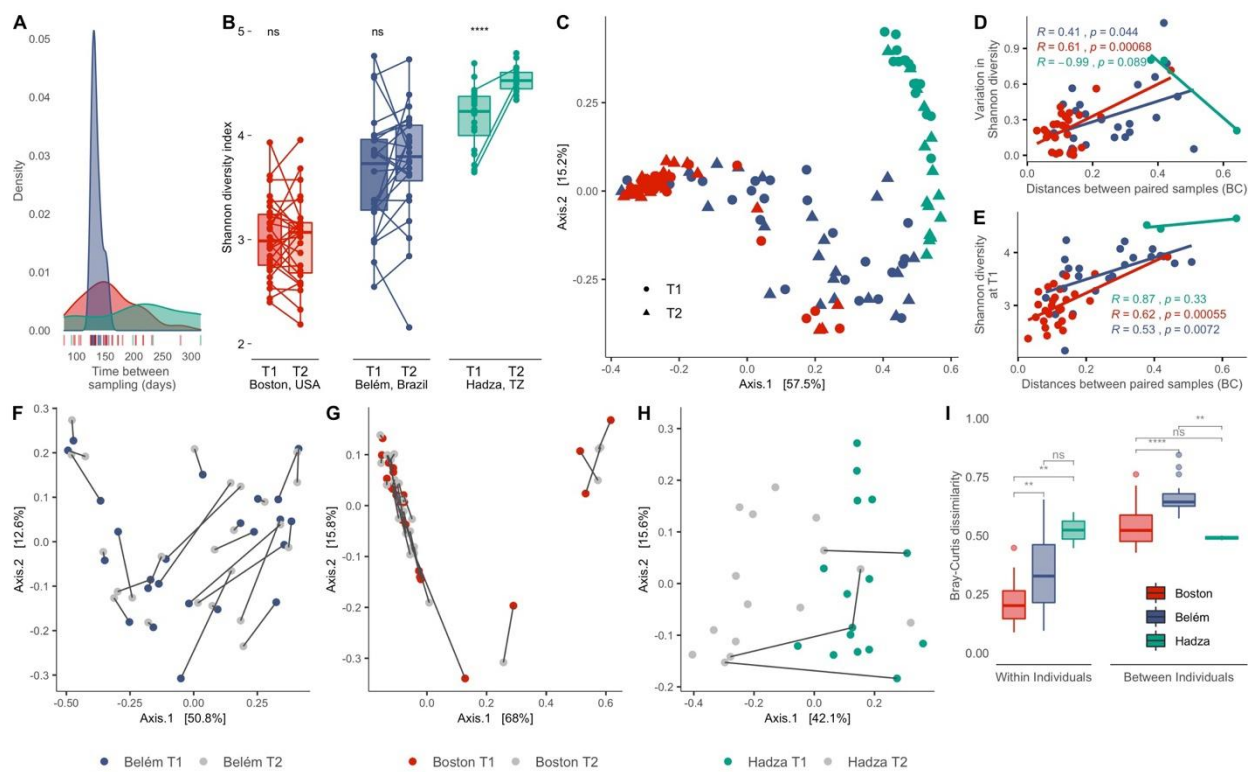


Figure 1. A) Density plot showing the interval between sample collection for each population (in days). B) Alpha diversity levels calculated using Shannon diversity index. Lines connect individuals across sampling time points. C) PCoA plot of Bray-Curtis beta diversity distances comparing all three populations. D,E) Scatter plots showing the associated between Shannon diversity metrics and Bray-Curtis distances between individuals. F,G,H) PCoA of Bray-Curtis distances between samples, lines connected samples from the same individual. I) Boxplots of Bray-Curtis dissimilarities within and between individuals. F). (ns : $p > 0.05$; *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$; ****: $p \leq 0.0001$)

A Principal Coordinate Analysis (PCoA) of Bray-Curtis distances between populations shows discrete population clustering with several points of overlap between Belém and Boston, which constitute the two urbanized groups in our sample (Figure 1C). There is no evidence of discrete clustering based on collection time point for urban populations, whereas seasonal-specific clustering among the Hadza individuals can be observed (Figure 1H). Next, we used Pearson correlation coefficients to test whether alpha diversity is associated with levels of compositional shifts in the gut microbiome. We found that increased values of alpha diversity variation between time points (Boston, $R = 0.61$, $p = 0.00068$; Belém, $R = 0.41$, $p = 0.044$) and alpha diversity index at T1 (Boston, $R = 0.62$, $p = 0.00055$; Belém, $R = 0.53$, $p = 0.0072$) were positively associated with within-individual Bray-Curtis distances across time for urbanized populations (Figure 1D-E).

Levels of compositional differences between time points were measured using Bray-Curtis dissimilarity, which revealed lower amounts of structural shifts in the gut microbiome of Boston individuals when compared to non-industrialized populations (Figure 1F-I). Nonetheless, in Belém and Boston, differences between individuals were greater than within individuals, illustrating the individual-specific nature of gut microbiome structure. Species-level analyses revealed that Boston and Belém individuals maintained a similar proportion of taxa from T1 to T2 (0.84 ± 0.12 and 0.89 ± 0.16 , respectively) (Wilcoxon, $p = 0.42$). Such inferences could not be drawn from the Hadza dataset due to the small individual-level longitudinal sampling size.

Next, we used Analysis of Composition of Microbiomes (ANCOM)¹⁸ to investigate whether such compositional differences could be driven by variability in the abundance of specific taxa between time points. At the species-level, no taxa were found to be differentially abundant across time points for Belém and Boston. For the Hadza, however, ANCOM reported a total of 10 differentially abundant species between time points. For inter-population analysis, results showed a total of 110 bacterial genera to be differentially abundant between all three populations when disregarding specific time points. (Additional file 1: Table 2).

To assess whether temporal variations in microbiome composition result in functional and metabolic changes, we performed an alignment of protein-coding sequences predicted from contigs to the KEGG Orthology database (Additional file 2: Figure S3). Using ANCOM, we tested the differential abundance of levels 2 and 3 KEGG pathways. The Hadza of Tanzania were the only population to show a significant differential abundance of metabolic pathways across sampling time points, as shown in Additional file 2: Figure S4. We did not observe any significant differences in the functional potential of microbial communities across time for the urban populations of Belém and Boston, which demonstrates a high level of

functional stability and redundancy of the gut microbiome, even when subject to structural modifications over time.

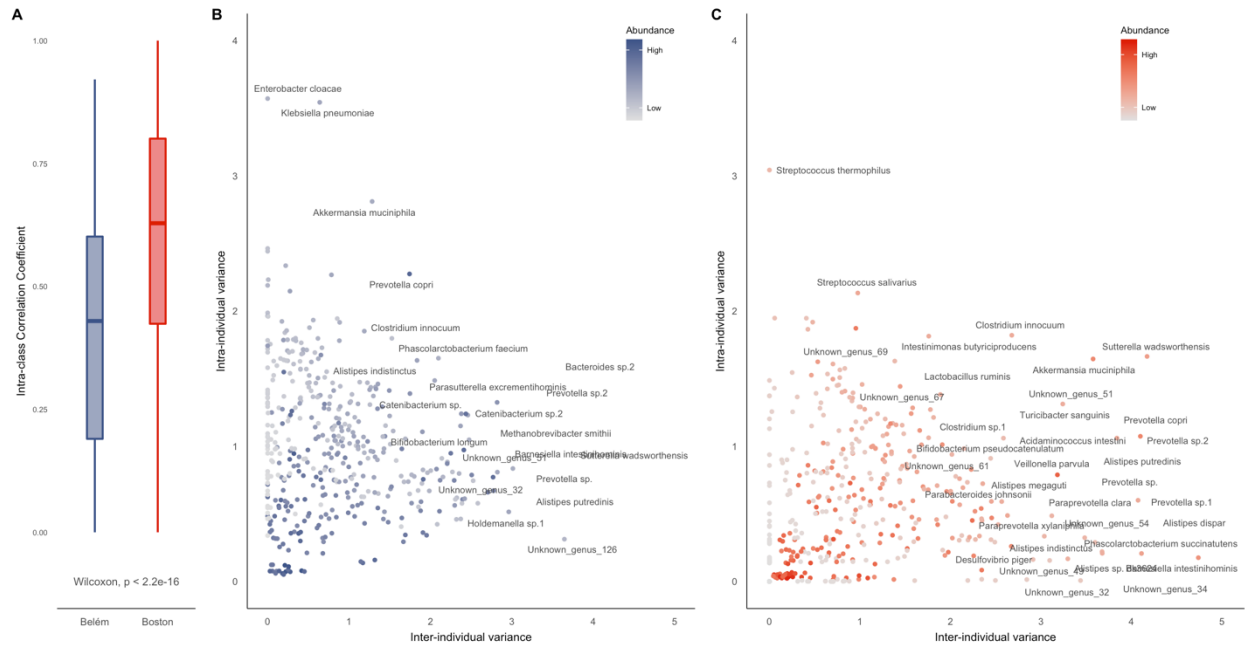


Figure 2. A) Boxplot showing the intra-class correlation coefficient (ICC) for gut microbial species of Belém and Boston cohorts. B,C) Relationship between within and between-individual species variance, as calculated using mixed-effects models. Species are colored according to their relative abundance in each respective population. Species with total variance > 3 are labeled.

Next, we used intra-class correlation coefficients (ICC) to determine the level of stability for all 440 individual species across urban populations. This metric is calculated based on abundance variance within and between individuals for each species (see Methods section). An ICC of 0 indicates no stability, while an ICC of 1 shows high species stability over time.

We observed that the gut microbiome of individuals from Boston (UI) has overall greater stability than that of Belém (UN) (Wilcoxon, $p < 2.2e-16$) (Figure 2A). The median ICC score for species in Boston individuals was 0.63, while in Belém the median ICC was 0.4 (Additional file 1: Table S3). This is explained by the increased levels of intra-individual variance among species from Belém when compared to species from Boston cohort, which in turn have higher levels of inter-individual variance (Figure 2B-C).

Interestingly, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* and *Akkermansia muciniphila*, species previously linked to gut inflammation, showed the highest intra-individual variance and, therefore, the lowest amount of stability in Belém (Figure 2B). On the other hand, for Boston individuals, intra-individual variance is mostly driven by probiotic species such as *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius* (Figure 2C).

Further, *Prevotella copri* and *Prevotella sp.*, which are generally associated with non-industrialized lifestyles or higher intake of dietary non-digestible fibers show distinct patterns of contribution to variance in both populations. In Belém (UN), *P. copri* is highly abundant and more associated with fluctuation in abundance at the intra-individual level, whereas the opposite is observed for Boston (UI).

Enterotype changes across time points

Classification of microbiomes based on enterotypes has been used to distinguish healthy and disease-prone gut communities¹⁹. Here, we used community typing to test how three populations living in diverse levels of industrialization would be classified and grouped according to community composition. Additionally, our goal was to understand to what extent levels of microbiome stability affect enterotype classification across time. We employed a Dirichlet Multinomial Mixtures (DMM) model on abundance data for all three populations in our study and chose the optimal number of clusters based on the best model fit according to performance metrics, as shown in Figure 3A.

Using samples from Hadza, Belém, and Boston, clustering based on community composition determined the existence of four distinct enterotypes. Two of these community types, hereby referred to as BactA and BactB, are driven by high abundances of the *Bacteroides* genus, as well as the presence of *Parabacteroides* and *Alistipes* taxa, respectively (Figure 3B, Additional file 2: Figure S5A). The second set of enterotypes, PrevA and PrevB, is defined by high abundances of the *Prevotella* genus, with the marked distinction that PrevA includes increased abundances of *Bacteroides* genus, whereas PrevB has *Faecalibacterium* and *Blautia* as secondary drivers (Figure 3B).

A PCoA of Bray-Curtis dissimilarities shows that samples form distinct clusters based on enterotypes, with evidence of overlap between BactA and BactB community types (Figure 3C). At the population level, we observed that the PrevB enterotype is exclusive to the Hadza individuals, which harbor a highly distinct microbiome composition from the other populations (Figure 3D). Most samples from Belém (UN) cluster into the PrevA enterotype, followed by BactB and BactA. On the other hand, BactA is the most common community type among Boston samples, followed by BactB and PrevA.

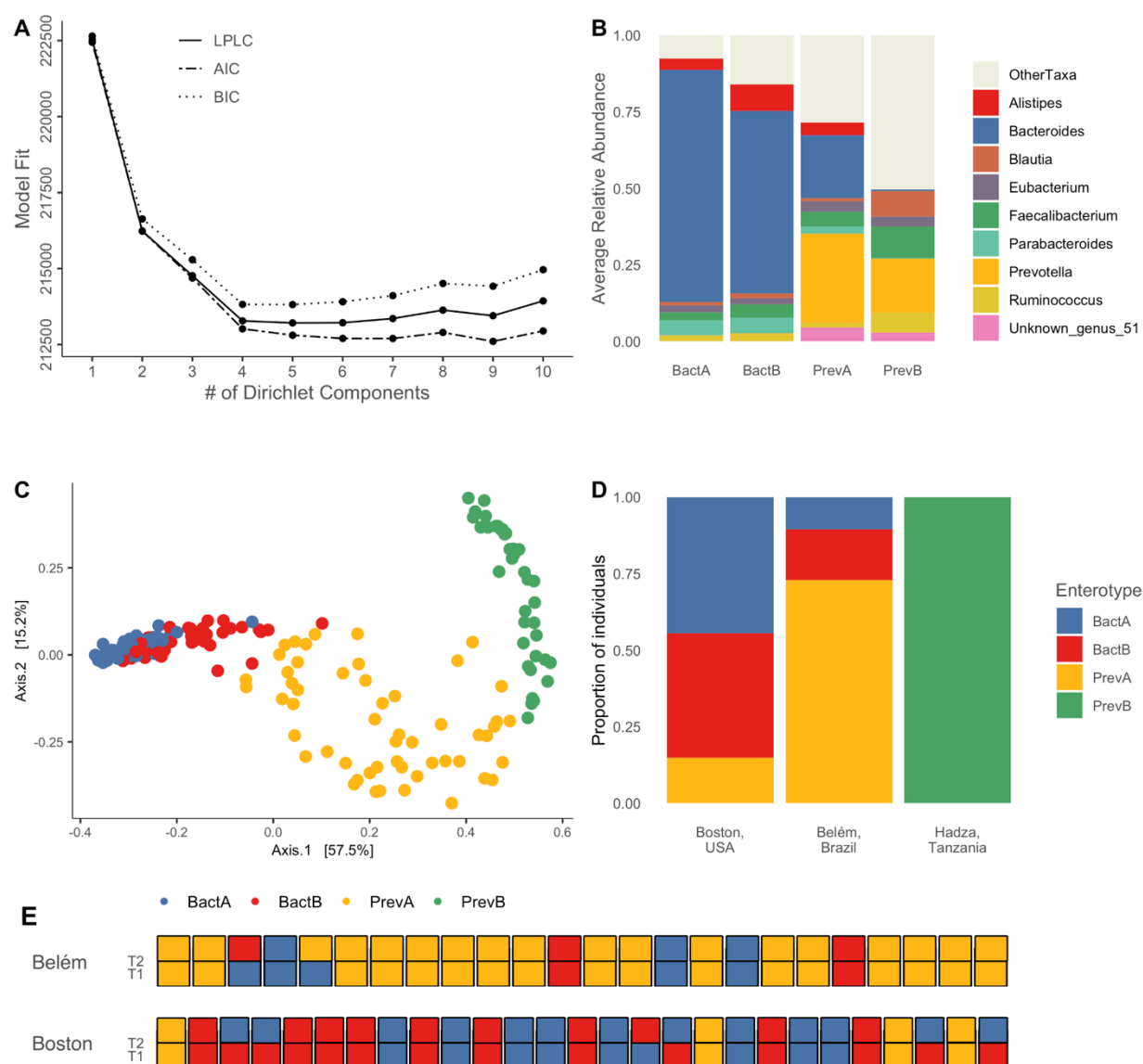


Figure 3. A) Optimal number of enterotypes (or community clusters) according to model performance metrics (LPLC – Laplace, AIC – Akaike information criterion, BIC – Bayesian information criterion). B) Average relative abundance of driver taxa that define each enterotype. C) PCoA of Bray-Curtis distances where colors indicate the enterotype of each sample. D) Proportion of individuals per population that have gut microbiomes belonging to each enterotype classification.

Remarkably, despite having shown a higher level of compositional stability, a total of six individuals from the Boston cohort changed enterotypes between time points, all of which transitioned from BactA to BactB or vice versa (Figure 3E). In Belém, this shift was seen in

two individuals, which followed a gradient directionality as well, from BactA to BactB and PrevA to BactB.

In view of previous associations between *Bacteroides*-dominated enterotypes and systemic low-grade inflammation, diabetes, and obesity ¹⁹, we assessed Body Mass Index (BMI) data for Belém individuals to identify associations between increased BMI and community typing. Our analysis showed there was no significant association between BactA and BactB enterotypes and high BMI values (Kruskal-Wallis, $p = 0.11$) (Additional file 2: Figure S5B).

Strain replacements as a genomic metric of microbiome stability

Population dynamics within different species in the gut microbiome may be influenced by strain-level interactions and replacements over time. To understand microbial population stability in the gut microbiome of individuals living in different levels of industrialization, we analyzed the genomic similarities between individual strains across time points.

First, genomes were *de novo* assembled from metagenomic sequences using metaSPAdes ^{20,21} and clustered into bins with MetaBAT2 ²². Overall, metagenome-assembled genomes had high quality (89% median completeness, 0.7% median contamination, a median length of 2.236.137 base pairs, and a median *N50* of 30.513 base pairs), according to CheckM analyses ²³.

Next, we joined bins from each individual from both time points and used dRep v.3.2.2 ²⁴ to dereplicate genomes. Then, we ran InStrain ²⁵ on 22 pairs of individuals per population to identify the level of genomic similarities (average nucleotide identity – ANI) between genomes from the same species in each individual across time points. We also used InStrain to calculate the number of shared strains within and between individuals, as shown in Figure 4. Predictably, strains are more similar within individuals than between individuals across time points.

After filtering bins for those that were compared considering at least 25% of their length, we obtained a total of 506 genomes, 254 from Belém and 251 from Boston individuals, spanning across 35 distinct bacterial families, 83 genera, and 168 species (Additional file 1: Table S4).

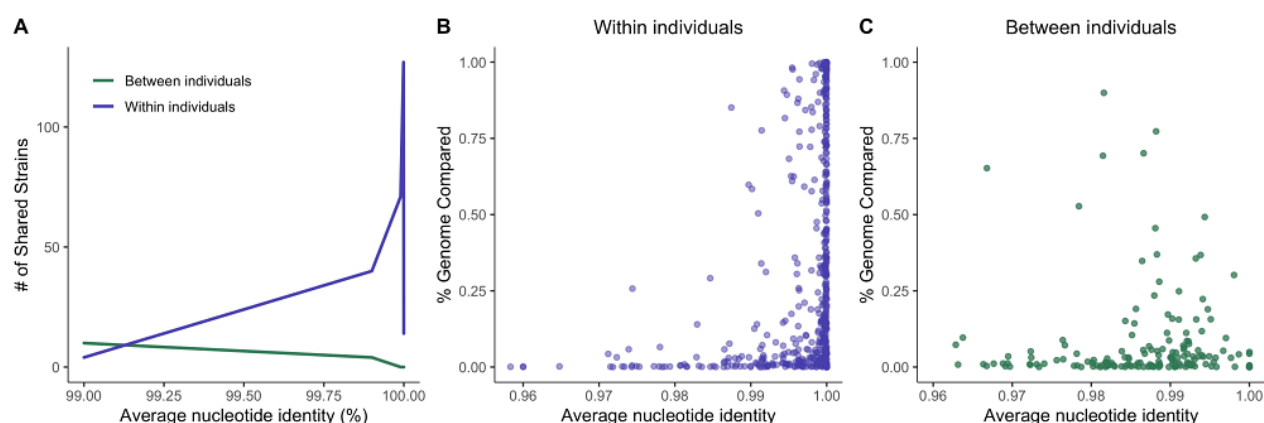


Figure 4. A) Shared strains within and between individuals, calculated with genome pairs in InStrain using 99.999% conANI as threshold to identify identical strains. B, C) Average nucleotide identity of strain pairs considering the amount of overlap between genomes within and between individuals, respectively.

Results yielded information for both conANI and popANI (see Methods section). InStrain defines conANI (or consensus average nucleotide identity) as the average similarity between two sequences when considering SNPs that modify the consensus base (major allele) in either sequence. PopANI (or population average nucleotide identity) refers to the similarity between a pair of sequences when taking into account only SNPs that modify more than one allele. Here, we considered genomes to be identical when $\text{conANI} \geq 0.99999$. Pairs of genomes with $\text{conANI} < 0.99999$ and > 0.97 were regarded as distinct strains of the same species, and will hereby be referred to as “strain replacements”.

When comparing both analyzed populations, we observed that individuals from Belém have a higher number of strains than those from Boston (Figure 5A-B). Overall, nucleotide identity values are a reflection of the number of SNPs found between pairs of genomes, and our results indicate that there is an increased level of genomic differences between strains that were replaced in Belém individuals versus replaced strains in Boston individuals.

Strikingly, 21% of strains assembled from Belém individuals, versus 13% from Boston, had population-level SNPs indicating a change in genomic identity that represents no common alleles. This suggests that strains replaced across time points in Belém are increasingly divergent from each other.

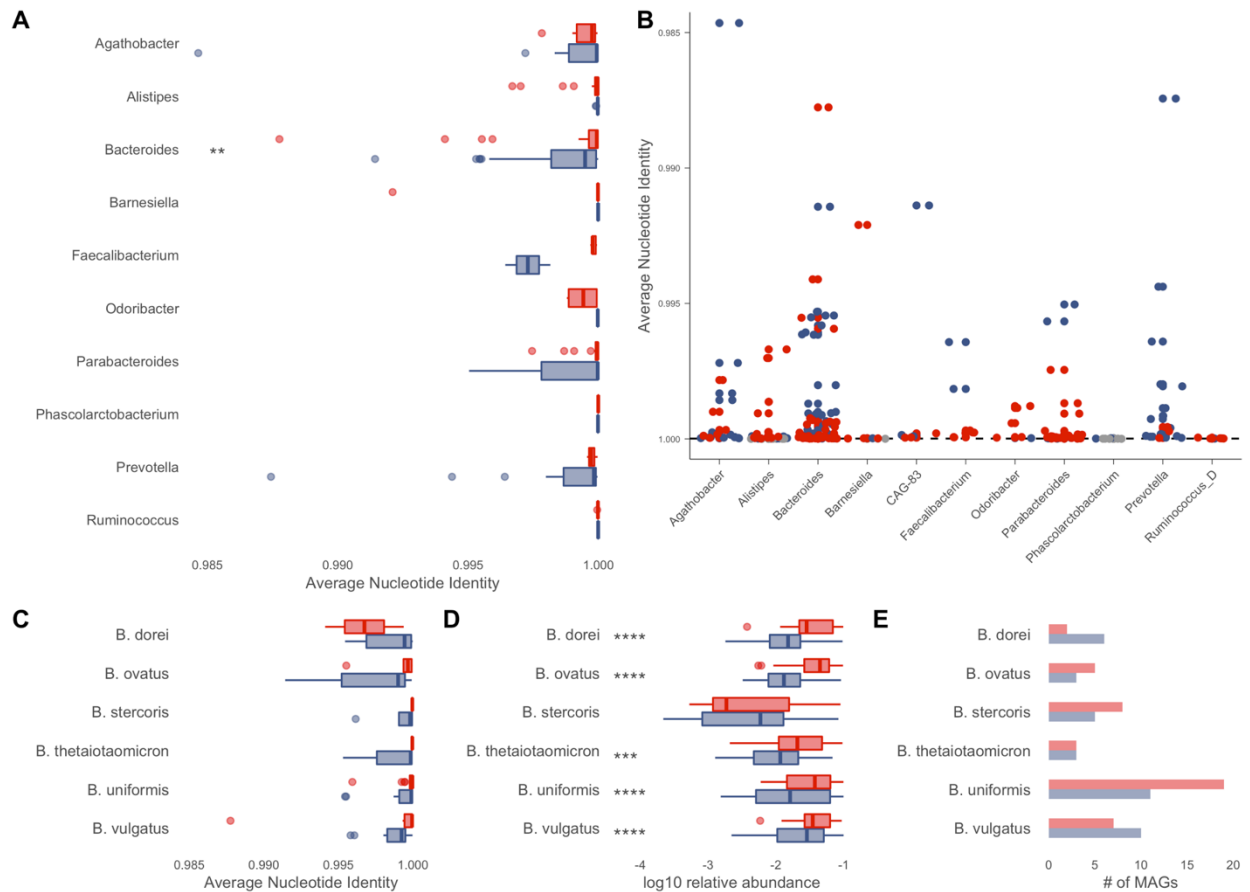


Figure 5. Strain replacements by genus and species as calculated by InStrain using a threshold of 99.999% genome identity to classify strains as identical. A) Boxplots of average nucleotide identity (conANI) between strain pairs within each genus for Belém and Boston individuals. B) Manhattan plot displaying levels of average nucleotide identity (conANI) for strain pairs within each genus. Gray points indicate identical strains. C) Average nucleotide identity between strains belonging to species within the *Bacteroides* genus. D) Boxplots of log10 relative abundance of each *Bacteroides* species for both populations. E) Number of metagenome-assembled genomes for each of the *Bacteroides* species tested for strain replacements.

We found that this pattern of higher genomic distances between species was especially the case for strains belonging to the *Bacteroides* genus (Figure 5A-B, Additional file 2: Figure S6). Despite genus-level distances, closer inspection of *Bacteroides* species revealed no significant differences between Belém and Boston when analyzing nucleotide identity between strains (Figure 5C). Further, we observed that in spite of representing the greatest amount of genomic diversity in our Belém dataset, *Bacteroides* abundances were significantly lower than what was found for Boston individuals, indicating there is not

necessarily an association between species abundance and levels of strain replacements across time (Figure 5D).

DISCUSSION

In this paper, we report the temporal dynamics of gut microbiomes from a non-industrialized urban population of the Brazilian Amazon. We placed our studied population in context by incorporating literature data consisting of individuals from divergent lifestyles but similar sampling intervals, in order to obtain an appropriate understanding of gut microbial variability across diverse populations.

Similar to what was reported for the Hadza population⁸, we also identified a slight shift in dietary intake among Belém individuals. Previous studies had reported that changes in host diet are the main factor for causing compositional shifts in the microbiome^{2,26}. Here, although we observed signals of such changes, it is unlikely that the higher consumption of açai berry in the Dry season would lead to significantly detectable shifts in microbiome composition.

Considering the population of Belém (UN) is located at the center of the urbanization gradient between Boston and the Hadza hunter-gatherers (according to alpha and beta diversity metrics), it is reasonable to assume that increased compositional differences across time points among non-industrialized populations may be linked to levels of transition to industrialization.

Interestingly, aside from *Prevotella*, the species that displayed the highest values of intra-individual variance in Belém (*Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Akkermansia muciniphila*) are typically associated with industrialized populations. Gibbons et al.,²⁷ and David et al.,⁹ showed that abundance variability is part of the equilibrium dynamics of the healthy gut microbiome, and that deviations are expected to occur within weekly or even daily timescales, eventually returning to a steady community state.

One hypothesis is that we captured a moment of such deviation from stability, in which there was a bloom of these specific species. Alternatively, their high intra-individual variance may also be explained by external forces, such as shifts in host diet or exposure to microbes, which are likely considering the transitioning context of this population.

Nevertheless, the unchanged functional profiles of gut microbiomes in our dataset and evidence that individuals are more similar to themselves than to others, further corroborate previous findings that the gut microbiome has evolved to maintain equilibrium for long periods of time^{14,16,28–30}.

Our enterotyping analyses provide further validation of the extent gut microbial stability. Populations from both the industrialized and non-industrialized cohorts rarely shifted to another enterotype in the course of 4 to 6 months, and diverging cases always transitioned to the next enterotype following a gradient-like shift. This also demonstrates that subtle compositional variations are enough to cause a switch of community type, thus supporting earlier studies that argue in favor of a non-discrete interpretation of such community profiles³¹.

Genomic analyses showed that strain replacements were more common among the urban non-industrialized individuals from Brazil than those from urban industrialized United States. Our most interesting finding demonstrates that microbial temporal dynamics are variable across species, which is in agreement with previous research²⁸. Here, species belonging to the *Bacteroides* genus were more frequently replaced and had the most SNPs differentiating T1 and T2 strains.

This could be explained by alternations in dominant strains among members of the *Bacteroides* genus. The fact that other species did not show the same level of divergence and replacements suggests that temporal dynamics in the gut affect taxa in different ways^{28,32,33}. It could be that *Bacteroides*, a commensal highly associated with industrialized populations^{6,26}, experiences increased ecological pressures to stably colonize the gut of transitioning non-industrialized individuals. Previous work on temporal gut microbial stability showed that *Bacteroides* was among the most stable genera in the microbiome of individuals from urban Europeans, which provides support to our hypothesis²⁸.

Moreover, it has been shown that other evolutionary mechanisms, such as horizontal gene transfer, may play an important role in industrialized and transitioning microbiomes³⁴. Experimental work has demonstrated that within-host adaptive evolution is a common feature of gut commensals, even in the absence of disruptive perturbations such as antibiotic intake³⁵. It can thus be suggested that such adaptations are important to overcome initial barriers imposed by well-established stable communities during a transition to industrialization.

Another possible explanation for our findings is that multiple strains of the same species were present at both time points, but our sequencing efforts solely captured one of them. According to earlier findings^{11,14}, the coexistence of related strains within the gut microbiome may be the result of independent niche occupations, thus allowing for the stable presence of two or more members of the same phylogenetic clade.

Here, a note of caution is due, considering one major limitation of our study was that the genomic divergence of strains was tracked only in cases where genomes for the same

species were reconstructed across both time points. Given the nature of metagenomic data, this means we were not able to identify the loss or confirm a decrease in the abundance of specific strains across time points. Second, we did not investigate the biological repercussions of the SNPs that caused strain divergence across time points. It is possible that information on which genes accumulated SNPs over time can help elucidate details and drivers of gut population dynamics.

Additionally, despite showing signals of seasonal cycling to some extent, the lack of longitudinal data derived from the shotgun metagenomic sequencing of Hadza hunter-gatherer stool samples, carried out by Smits et al.⁸, is a significant limitation that hindered appropriate data analysis and impacted our ability to draw conclusions from individual-level data from two non-industrialized populations.

CONCLUSION

Taken together, our results show that gut bacterial communities of individuals living in urban environments are subject to distinct population dynamics and that levels of industrialization may have a role in determining their stability. Characterizing the temporal variability of gut microbiomes of Brazilian Amazonians and other non-industrialized populations is a fundamental step toward understanding the effects of industrialization on gut communities and overall host health. To fully grasp the extent and impact of strain replacements and compositional shifts, future research should focus on additional time series associated with isolate culturing to uncover both the short-term and long-term stability of non-industrialized gut microbiomes.

METHODS

Ethics approval

Written informed consent was obtained from all individuals. Ethics approvals were granted by the Institutional Ethics Review Board of Universidade Federal do Pará, under protocol number 2.686.839. This study was carried out according to the ethical principles established by the Declaration of Helsinki.

Study cohort and sampling

We recruited a total of 24 individuals living in the city of Belém, Pará, Brazil. The average age of participants was 30 years old (18-59), and we recruited both male (N = 9) and female (N = 15) individuals. Participants recruited and included in this study did not report antibiotic medication intake at least three months prior to sample collection.

Belém is the capital and largest city of the Pará state, in the northern region of Brazil, and is located at the mouth of the Amazon River. It is classified as an urban non-industrialized city, according to criteria employed by the Global Microbiome Conservancy³⁴, due to a human development index (HDI) of 0.689 and population density of approximately 3800 inhabitants per km²^{36,37}. We aimed to recruit inhabitants of different regions of the city, which consists of medium-income urbanized centers and low-income stilt slum communities.

Participants were asked to provide stool samples at two time points during the year, the first in March/April of 2021, during the Wet/Rainy season of the Amazon, which spans from December through May. The second sample collection took place in July/August 2021, during the Dry season, which occurs from June to November. For the purposes of this study, the Wet/Rainy season is referred to as Time point 1 (T1) and the Dry season is referred to as Time point 2 (T2).

Stool samples were collected in sterile containers and returned to the research staff up to six hours after collection. Samples were stored in RNA later stabilization solution (Thermo Fischer Scientific) and frozen at -80°C until DNA extraction.

Literature data

Longitudinal gut microbiome metagenomic data was also included for two other populations in order to create an urbanization gradient for the purposes of our analyses. A total of 38 samples (from 34 individuals) from the Hadza hunter-gatherers of Tanzania, representing the subset of samples submitted for shotgun sequencing from Smits et al.⁸, were

processed and analyzed in this study. The Hadza represent a rural non-industrialized lifestyle. Importantly, only three individuals from this population were longitudinally sampled across at least two distinct seasons and were represented in shotgun metagenomic sequencing (namely, individuals 54, 55, and 56). Thus, the Hadza were removed from genomic analyses that aimed to identify SNPs among microbial strains across time points and that required paired sequencing data.

A total of 127 longitudinal gut microbiome samples from the Broad Institute-OpenBiome Microbiome Library (BIO-ML)¹¹, collected in the Boston area, USA, were included to represent an urban and industrialized lifestyle. Of these, 27 individuals were sampled in periods ranging from five to seven months apart, and were selected for analysis of bacterial strain replacements in order to match sampling periods from Belém, Brazil. In the paper, this population is referred to as “Boston, USA”.

We also classified Hadza samples into T1 and T2, where samples collected in Early or Late-Wet periods (November to April) are referred to as T1, and those collected during Early or Late-Dry periods (May to October) are referred to as T2. For Boston samples, first collection date is referred to as T1, and the second collection date as T2.

Metadata collection

Dietary information was collected using food journals during three days prior to sample collection. This consisted of detailed information on meals and food consumption, which were later assessed for nutrient intake. We also applied a questionnaire for participants to provide information on previous and current clinically diagnosed diseases, medication intake, BMI, household type (brick, wooden, apartment building), sewage treatment or lack thereof, source of drinking water, pets, and number of co-inhabiting individuals.

DNA Extraction and Sequencing

Total DNA from fecal samples was extracted using the DNeasy PowerSoil Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer’s protocol. Eluted DNA was quantified with fluorometry and subsequently stored at –20°C. Library preparation for sequencing was carried out according to the Illumina DNA Prep protocol. Libraries were subsequently pooled and quantified with TapeStation (Agilent, Santa Clara, CA) before paired-end (2x150-bp) sequencing on the Illumina NextSeq500 platform.

Metagenome quality control and processing

Sequencing yielded a median of 1.7 million reads per sample. Read quality was assessed with FastQC ³⁸ and quality-filtered using FastUniq v1.1 ³⁹ to dereplicate reads and Trimmomatic v0.39 ⁴⁰ with parameters LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:5:20 MINLEN:50. We indexed the human genome (version hg 38) using BWA ⁴¹ and removed reads that aligned to human sequences using Samtools v1.9 ⁴².

Taxonomic classification and diversity assessment

Filtered reads were assigned taxonomic labels with Kraken2 v2.0.8 ⁴³ and abundance estimates were carried out by Bracken v2.5 ⁴⁴. Taxonomic classification was based on sequences from the Kraken2 standard database completed with a sequence database derived from the Global Microbiome Conservancy isolate library ^{11,34}. Employing this custom database increased taxonomic profiling by 1.7 times when compared to classification using solely the Kraken2 standard database (Wilcoxon, $p = < 2.2e-16$) (Additional file 2: Figure S7).

Alpha and beta diversity analyses were performed in R v.3.5.3. ⁴⁵ using functions implemented in “phyloseq” and “vegan” packages ^{46,47}. For alpha diversity metrics, samples were rarefied to the minimum number of reads and calculated based on Number of Observed Species, Shannon index, Chao1 index, and Simpson index. For beta diversity analyses, data was filtered to remove taxa not present in at least 10% of samples. Compositional dissimilarities were computed using relative abundances and genus level taxonomy with Bray-Curtis distances.

Intra-class correlation coefficient analysis

We employed intra-class correlation coefficients (ICC) to determine the reliability of stability data for all 440 individual species across Belém and Boston individuals. First, the mean and variance of each species were calculated and fit into Mixed Effects Models using the lme4 package implemented in R ⁴⁸. For this, we used $\log_{10}$ -transformed abundance counts for each species and fit the model by considering individuals as random variables and time points as fixed effect. The model outputs information regarding total variance, which is separated into within-individual (σ^2_{WI}) and between-individual variance (σ^2_{BI}). Thus, ICC values are equal to $\sigma^2_{BI}/(\sigma^2_{BI} + \sigma^2_{WI})$.

Differential abundance analysis

In order to assess differential abundances between pairs of individuals and groups of populations, we used ANCOM ¹⁸, which compared absolute abundances of taxa while

accounting for the compositional nature of microbiome data. Here, we considered taxa as differentially abundant if it passed the W-statistic 0.6 cutoff.

Metagenome assembly

Samples were processed independently for *de novo* genome assembly with metaSPAdes software, implemented in SPAdes v3.15.3^{20,21}. Contigs were indexed, aligned, and sorted using Samtools v1.9 and Bowtie2 v.2.4.2^{42,49}. Then, contigs were clustered into bins with MetaBAT2²² and dereplicated with dRep v3.2.2 (10% maximum contamination, 50% minimum completeness)²⁴. Assembly quality statistics were measured using CheckM v1.1.11²³ and are available in Additional file 1: Table S2.

Functional annotation

Protein coding sequences were predicted from contigs using Prodigal v2.6.3⁵⁰. To identify the metabolic functions associated with the microbial population of each sample, protein sequences were aligned to the KEGG Orthology database using HMMER v3.1b2 (hmmsearch)⁵¹ filtering for hits with E-value < 0.01 and coverage ≥75%.

Strain profiling

Population-level diversity analyses were performed using InStrain²⁵ to determine strain replacements across time points in individuals from Belém, Brazil and from the BIO-ML cohort from Boston, USA. InStrain calculates the average nucleotide identity (ANI) between reads and the genomes they map to. We joined, indexed and aligned dereplicated genomes from each individual and ran InStrain using the profile and compare function, to determine differences between genomes assembled from each individual. InStrain outputs results for ANI between genome pairs and calculations for consensus ANI (conANI) and population ANI (popANI). For each comparable base pair in each genome pair, InStrain determines whether there is a conANI substitution (major alleles differ between sequences) and/or a popANI substitution (no alleles are shared between sequences). We used a threshold of < 99.999% conANI to identify different strains, as suggested by Olm et al.²⁵, and also filtered for genomes belonging to species recovered from at least five samples and with >25% of genomes compared between paired samples. Taxonomic classification of each genome was carried out using GTDB-Tk v.1.0.2⁵² against the Genome Taxonomy Database Release 89²³. To perform strain-level analyses, we selected strains from species present at least five times in each population.

Enterotype assignments

Enterotyping (also known as community typing) was performed on genus-level relative abundance data filtered for ASVs present in at least 50% of samples using Dirichlet Multinomial Mixtures (DMM) models, as described in Holmes et al.⁵³. This method uses probabilistic modeling to calculate the optimal number of clusters (enterotypes) and classify each sample into an enterotype based on compositional similarity. These calculations were applied to our dataset including all 213 samples from all three populations using the DirichletMultinomial package version 1.24.1 implemented in R^{45,54}. Measures of model performance (AIC Akaike information criterion, BIC Bayesian information criterion, Laplace). Choose the model that best describes the observed data.

Data availability

Datasets generated in this study are available in the European Nucleotide Archive repository under accession number XXXX.

REFERENCES

1. The Human Microbiome Project. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* **486**, 207–214 (2012).
2. David, L. A. *et al.* Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* **505**, 559–563 (2014).
3. De Filippo, C. *et al.* Diet, Environments, and Gut Microbiota. A Preliminary Investigation in Children Living in Rural and Urban Burkina Faso and Italy. *Front. Microbiol.* **8**, (2017).
4. Yatsunenko, T. *et al.* Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **486**, 222–227 (2012).
5. Gomez, A. *et al.* Gut Microbiome of Coexisting BaAka Pygmies and Bantu Reflects Gradients of Traditional Subsistence Patterns. *Cell Press* **14**, 2142–2153 (2016).
6. Schaan, A. P. *et al.* The structure of Brazilian Amazonian gut microbiomes in the process of urbanisation. *npj Biofilms Microbiomes* **7**, 65 (2021).
7. Merrill, B. D. *et al.* Ultra-deep Sequencing of Hadza Hunter-Gatherers Recovers Vanishing Gut Microbes. <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2022.03.30.486478> (2022) doi:10.1101/2022.03.30.486478.
8. Smits, S. A. *et al.* Seasonal cycling in the gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers of Tanzania. *Science* **357**, 802–805 (2017).
9. David, L. A. *et al.* Host lifestyle affects human microbiota on daily timescales. *Genome biology* **15**, R89 (2014).
10. Faith, J. J. *et al.* The Long-Term Stability of the Human Gut Microbiota. *Science* **341**, 1237439 (2013).
11. Poyet, M. *et al.* A library of human gut bacterial isolates paired with longitudinal multiomics data enables mechanistic microbiome research. *Nat Med* **25**, 1442–1452 (2019).

12. Zhou, W. *et al.* Longitudinal multi-omics of host–microbe dynamics in prediabetes. *Nature* **569**, 663–671 (2019).
13. Harrison, C. A. & Taren, D. How poverty affects diet to shape the microbiota and chronic disease. *Nat Rev Immunol* **18**, 279–287 (2018).
14. Garud, N. R., Good, B. H., Hallatschek, O. & Pollard, K. S. Evolutionary dynamics of bacteria in the gut microbiome within and across hosts. *PLoS biology* **17**, e3000102 (2019).
15. Lloyd-Price, J. *et al.* Multi-omics of the gut microbial ecosystem in inflammatory bowel diseases. *Nature* **569**, 655–662 (2019).
16. Mehta, R. S. *et al.* Stability of the human faecal microbiome in a cohort of adult men. *Nat Microbiol* **3**, 347–355 (2018).
17. Olsson, L. M. *et al.* Dynamics of the normal gut microbiota: A longitudinal one-year population study in Sweden. *Cell Host & Microbe* **30**, 726-739.e3 (2022).
18. Mandal, S. *et al.* Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. *Microb Ecol Health Dis* **26**, (2015).
19. MetaCardis Consortium *et al.* Statin therapy is associated with lower prevalence of gut microbiota dysbiosis. *Nature* **581**, 310–315 (2020).
20. Nurk, S., Meleshko, D., Korobeynikov, A. & Pevzner, P. A. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome Res.* **27**, 824–834 (2017).
21. Prjibelski, A., Antipov, D., Meleshko, D., Lapidus, A. & Korobeynikov, A. Using SPAdes De Novo Assembler. *Current Protocols in Bioinformatics* **70**, (2020).
22. Kang, D. D., Froula, J., Egan, R. & Wang, Z. MetaBAT, an efficient tool for accurately reconstructing single genomes from complex microbial communities. *PeerJ* **3**, e1165 (2015).

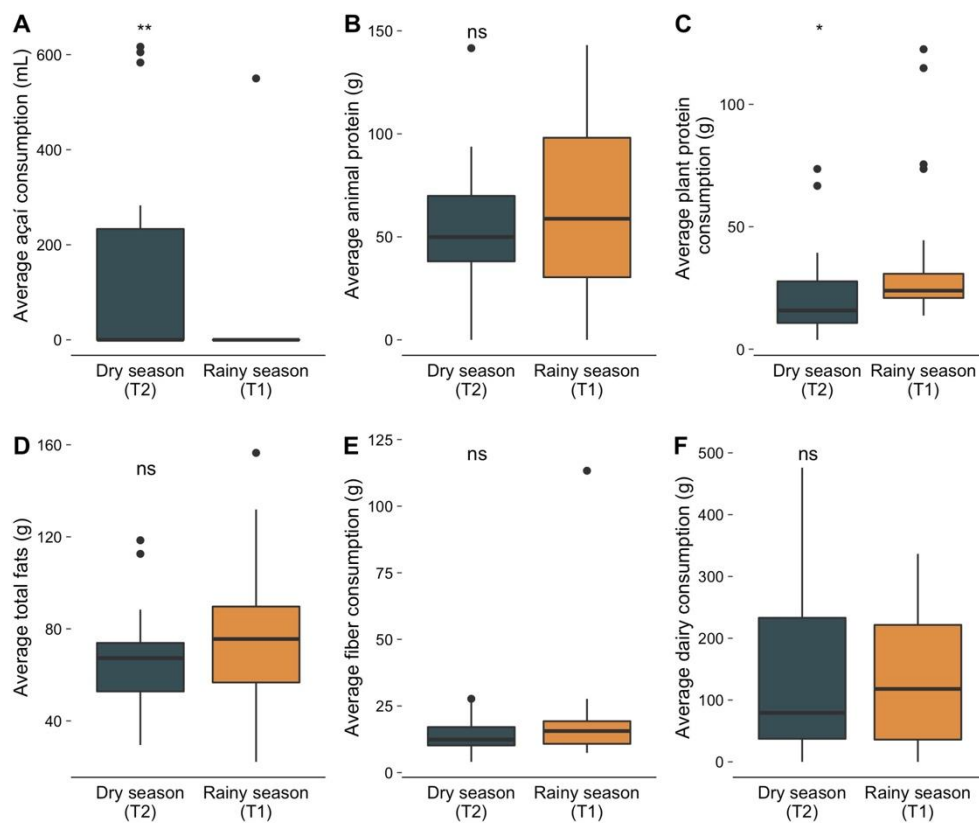
23. Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P. & Tyson, G. W. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res.* **25**, 1043–1055 (2015).
24. Olm, M. R., Brown, C. T., Brooks, B. & Banfield, J. F. dRep: a tool for fast and accurate genomic comparisons that enables improved genome recovery from metagenomes through de-replication. *ISME J* **11**, 2864–2868 (2017).
25. Olm, M. R. *et al.* inStrain profiles population microdiversity from metagenomic data and sensitively detects shared microbial strains. *Nat Biotechnol* **39**, 727–736 (2021).
26. Vangay, P. *et al.* US Immigration Westernizes the Human Gut Microbiome. *Cell* **175**, 962-972.e10 (2018).
27. Gibbons, S. M., Kearney, S. M., Smillie, C. S. & Alm, E. J. Two dynamic regimes in the human gut microbiome. *PLoS Computational Biology* **13**, e1005364 (2017).
28. Chen, L. *et al.* The long-term genetic stability and individual specificity of the human gut microbiome. *Cell* **184**, 2302-2315.e12 (2021).
29. Davenport, E. R. *et al.* Seasonal Variation in Human Gut Microbiome Composition. *PLoS ONE* **9**, (2014).
30. Lloyd-Price, J. *et al.* Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project. *Nature* **550**, 61–66 (2017).
31. Knights, D. *et al.* Rethinking ‘Enterotypes’. *Cell Host and Microbe* **16**, 433–437 (2014).
32. Good, B. H., Martis, S. & Hallatschek, O. Adaptation limits ecological diversification and promotes ecological tinkering during the competition for substitutable resources. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **115**, (2018).
33. Shoemaker, W. R., Chen, D. & Garud, N. R. Comparative Population Genetics in the Human Gut Microbiome. *Genome Biology and Evolution* **14**, evab116 (2022).
34. Groussin, M. *et al.* Elevated rates of horizontal gene transfer in the industrialized human microbiome. *Cell* **184**, 2053-2067.e18 (2021).

35. Zhao, S. *et al.* Adaptive Evolution within Gut Microbiomes of Healthy People. *Cell Host & Microbe* (2019) doi:10.1016/j.chom.2019.03.007.
36. SEDAC Population Estimation Service. (2015).
37. United Nations Development Program. (2021).
38. Andrews. FastQC: A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (2010).
39. Xu, H. *et al.* FastUniq: A Fast De Novo Duplicates Removal Tool for Paired Short Reads. *PLoS ONE* **7**, e52249 (2012).
40. Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**, 2114–2120 (2014).
41. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics (Oxford, England)* **26**, 589–95 (2010).
42. Danecek, P. *et al.* Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience* **10**, giab008 (2021).
43. Wood, D. E., Lu, J. & Langmead, B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biol* **20**, 257 (2019).
44. Lu, J., Breitwieser, F. P., Thielen, P. & Salzberg, S. L. Bracken: estimating species abundance in metagenomics data. *PeerJ Computer Science* **3**, e104 (2017).
45. Team, R. C. R: A Language and Environment for Statistical Computing. (2016).
46. Jari Oksanen *et al.* vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-6. (2019).
47. Paul J. McMurdie & Susan Holmes. phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **8**, (2013).
48. Bates, D., Mächler, M., Bolker, B. & Walker, S. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *J. Stat. Soft.* **67**, (2015).

49. Langmead, B. & Salzberg, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* **9**, 357–359 (2012).
50. Hyatt, D. *et al.* Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* **11**, 119 (2010).
51. HMMER. <http://hmmer.org> (2020).
52. Chaumeil, P.-A., Mussig, A. J., Hugenholtz, P. & Parks, D. H. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. *Bioinformatics* btz848 (2019) doi:10.1093/bioinformatics/btz848.
53. Holmes, I., Harris, K. & Quince, C. Dirichlet Multinomial Mixtures: Generative Models for Microbial Metagenomics. *PLoS ONE* **7**, e30126 (2012).
54. Martin Morgan. DirichletMultinomial: Dirichlet-Multinomial Mixture Model Machine Learning for Microbiome Data. R package version 1.24.1. (2022).

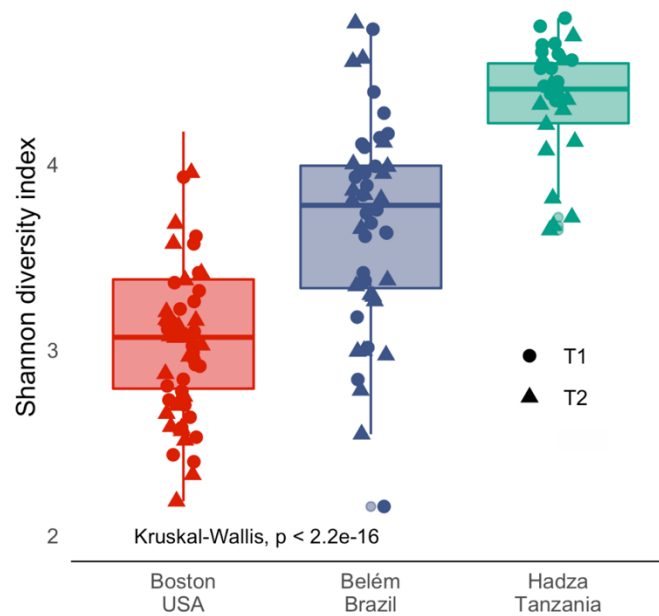
Additional file 2: Fig S1

Nutrient intake across time points as calculated from three-day self-reported dietary records from Belém, Brazil individuals. A) Average açai consumption (mL) in T1 and T2. B) Average intake of animal protein (g) in T1 and T2. C) Average intake of plant protein (g) in T1 and T2. D) Average intake of fats (g) in T1 and T2. E) Average fiber intake (g) in T1 and T2. F) Average consumption of dairy products (g) in T1 and T2.



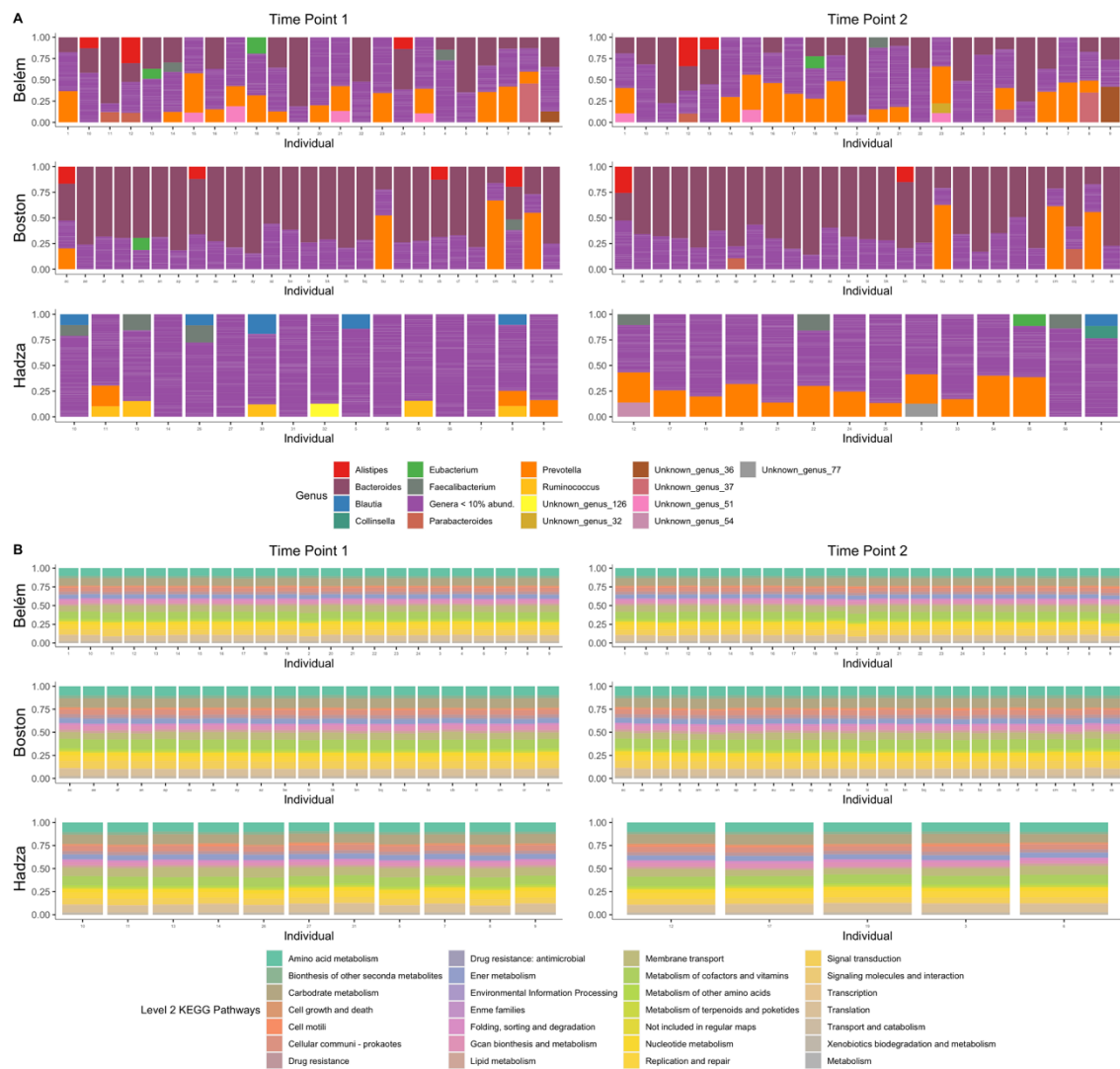
Additional file 2: Fig S2

Shannon alpha diversity metrics for Boston, USA, Belém, Brazil, and Hadza, Tanzania individuals. Shapes indicate sample collection times.



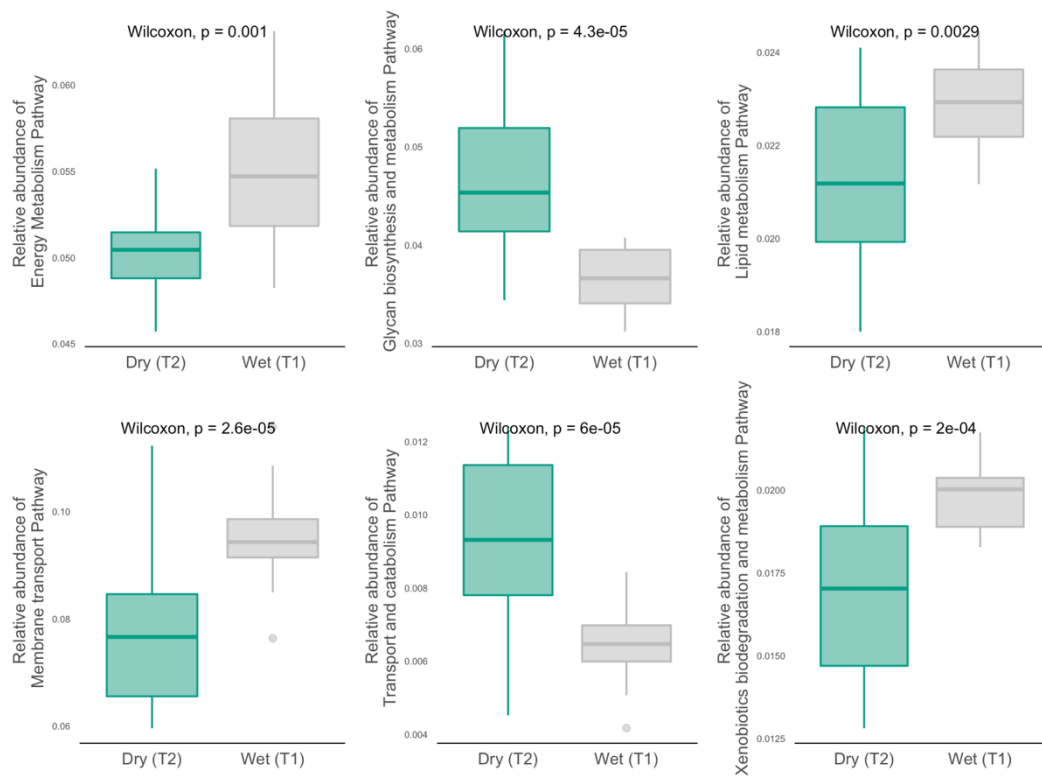
Additional file 2: Fig S3

A) Abundance plots of core taxa (genera prevalent in at least 50% of individuals from each location) according to collection time points. B) Abundance plots of level 2 KEGG pathways per population and time points.



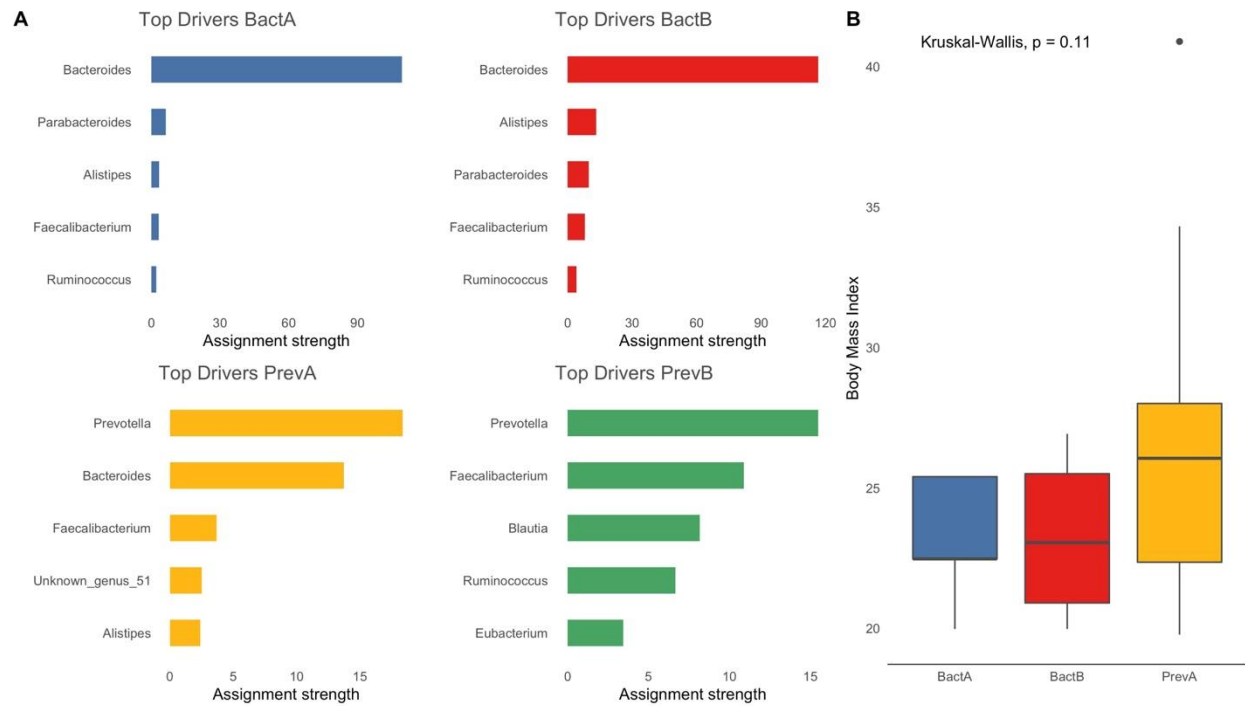
Additional file 2: Fig S4

Differential abundance of level 2 KEGG pathways across time points among the Hadza hunter-gatherers according to ANCOM results.



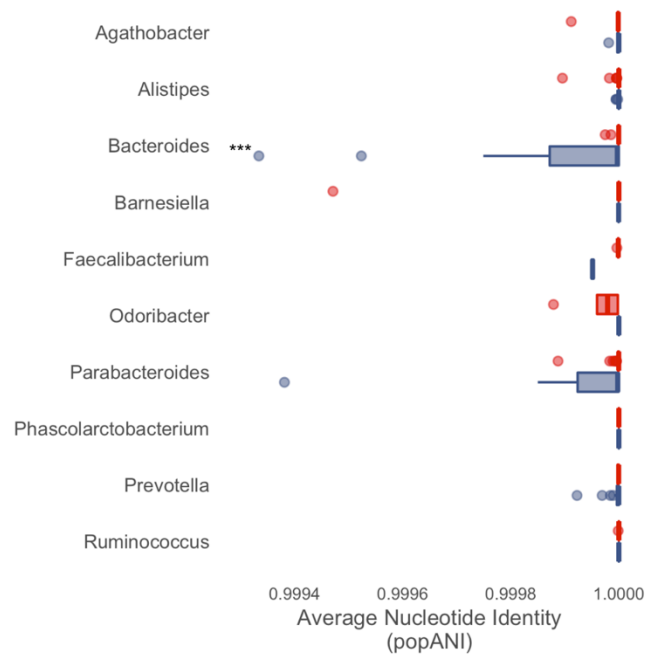
Additional file 2: Fig S5

A) Top driver taxa of the four enterotypes attributed to individuals from Boston, USA, Belém, Brazil, and Hadza, Tanzania. B) Body mass index values per enterotype classification for individuals from Belém, Brazil.



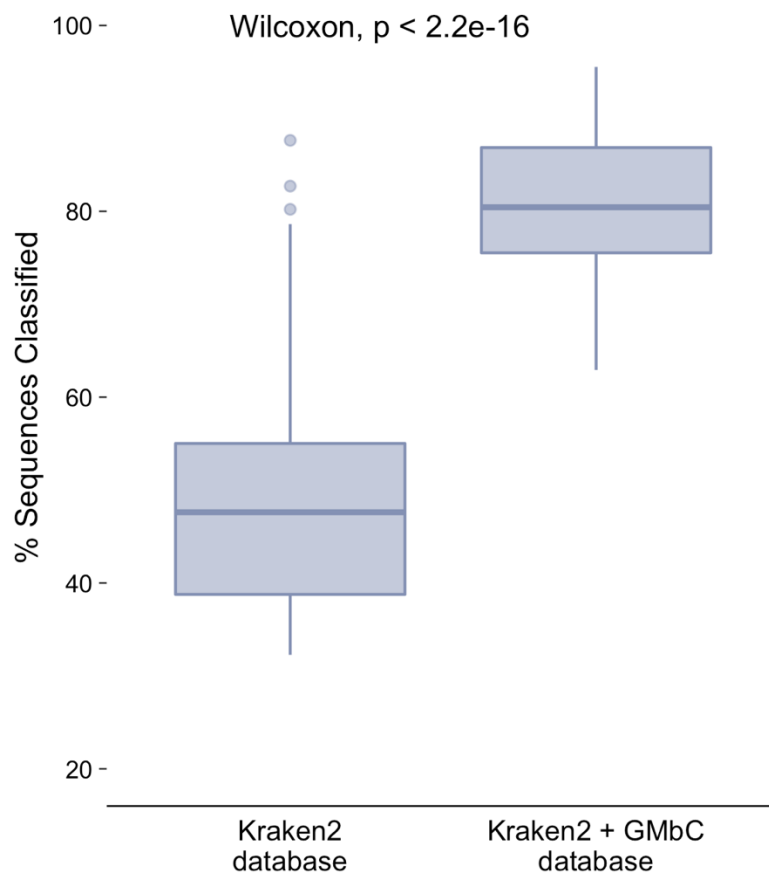
Additional file 2: Fig S6

Average nucleotide identity at the genus level according to the presence of population SNPs (more than two different alleles) (***: $p \leq 0.001$).



Additional file 2: Fig S7

Taxonomic classification of metagenomic reads when using the standard Kraken2 database and when implementing a custom database containing sequences from the Global Microbiome Conservancy isolate library.



6. DISCUSSÃO GERAL

No primeiro capítulo desta tese, publicamos o primeiro registro de transição para a urbanização entre microbiomas gastrointestinais de populações indígenas da Amazônia brasileira. Por meio do sequenciamento metagenômico por 16S, realizamos a caracterização taxonômica de comunidades intestinais de três populações indígenas rurais (Suruí-Aikewara, Xikrin do Cateté, Tupaiú) e uma população urbana (Belém do Pará) não industrializada. Nossos resultados revelaram que padrões de diversidade microbiológica e abundância de táxons tidos como biomarcadores da industrialização seguem um gradiente de urbanização entre essas populações, fato este que retrata a adaptação do microbioma ao novo estilo de vida adotado gradualmente pelo hospedeiro.

Inicialmente, a coleta de dados secundários revelou características dos padrões de alimentação de cada população. É importante notarmos as particularidades de se realizar entrevistas entre populações indígenas, uma vez que as mesmas são comumente representadas por lideranças comunitárias, a partir das quais estes dados são fornecidos. Assim, entre os Xikrin, Suruí e Tupaiú, as entrevistas sobre hábitos alimentares não foram realizadas a nível individual, o que pode representar uma limitação da capacidade de realizar inferências sobre nutrientes específicos e seus reflexos na composição do microbioma. No entanto, destacamos a importância de se adaptar metodologias e protocolos de pesquisa que contemplem a realidade de cada população a ser investigada, de modo a não perpetuar a exclusão de povos historicamente pouco representados (Dominguez-Bello et al., 2016).

Nossos resultados mostraram que a alimentação das populações rurais segue rica em fibras não-digeríveis provenientes da cultura de mandioca e batata doce, ao mesmo tempo em que alimentos processados e ricos em açúcares são gradativamente introduzidos nestas comunidades. As análises de diversidade microbiológica revelaram que existe um gradiente de riqueza média entre os microbiomas das populações estudadas (resultados

observados a partir do índice Shannon de diversidade), no qual os indivíduos Xikrin e os da cidade de Belém constituem cada um dos extremos do gradiente. É interessante observar que entre as populações Suruí e Tupaiú, os índices de riqueza são menos homogêneos, o que indica níveis variados de diversidade microbiana a nível intrapopulacional. Além disso, estes dados sinalizam uma transição gradual do microbioma para um estado menos diverso, e sugerem que o ritmo desta transição é único de cada indivíduo e pode depender de fatores intrínsecos, como resiliência do microbioma e genética do hospedeiro ou fatores extrínsecos, como exposição à dieta industrializada ou ingestão de medicamentos. Propomos que futuras pesquisas investiguem, a nível intrapopulacional, o papel de diferentes fatores internos e externos para a manutenção ou perda de níveis de diversidade entre populações vulnerabilizadas.

As evidências que indicam a urbanização dos microbiomas incluem a diminuída abundância de gêneros associados a populações tradicionais rurais como *Treponema*, *Succinivibrio* e *Prevotella* e o aumento da abundância do gênero *Bacteroides* entre as populações indígenas analisadas neste estudo. Propusemos que fatores como distância de centros urbanos, diminuição de práticas de cultivo para subsistência, ingestão de medicamentos e idiomas falados nas aldeias podem ser determinantes para essa transição, uma vez que influenciam o acesso à alimentação industrializada e a composição do microbioma intestinal. Resultados semelhantes já haviam sido observados entre outras populações rurais, como em Botswana, onde o microbioma de indivíduos que praticam a subsistência agropastoril compartilha características com o microbioma de indivíduos urbanizados vivendo na Philadelphia, nos Estados Unidos (Hansen et al., 2019). Essas semelhanças indicam que a transição dos microbiomas é uma tendência global, que se expandirá à medida em que a manutenção de estilos de vida isolados e rurais se tornam insustentáveis frente à urbanização.

Por fim, nossos achados revelaram que a população urbana da Amazônia, aqui representada pela população que vive na cidade de Belém, não deve ser considerada uma população tipicamente urbana para fins de classificação de microbiomas. Portanto, propomos uma nova nomenclatura àquelas populações urbanas, provavelmente por se tratar de uma população urbana não-industrializada, próxima a floresta e que ainda mantém um gradiente de microbiomas que perpassa as populações tradicionais e urbanas. Apontamos, todavia, que o estado em que se encontra o microbioma de populações “tropicais urbanas” seja talvez um estágio intermediário e que os aproximará, com o tempo, do que é observado em populações industrializadas fora de regiões tropicais.

Observamos que a composição do microbioma da população de Belém compartilha características principalmente com indivíduos de regiões urbanas e semi-urbanas de países do continente africano (Lokmer et al., 2020), e apresenta divergências em relação ao microbioma de indivíduos brasileiros de outras regiões, como o Rio de Janeiro (Pires et al., 2019). A partir destes dados, concluímos que as pressões ambientais às quais o microbioma de indivíduos da Amazônia está sujeito são únicas e podem indicar diferenças na forma com que o microbioma desta população se adapta ao hospedeiro.

Concluímos que para uma correta classificação e caracterização do microbioma das populações amazônicas é necessário considerar múltiplos aspectos para além do perfil taxonômico fornecido pela metagenômica de amplicon (16S). Uma vez que identificamos a presença de características de microbiomas isolados e rurais em indivíduos da cidade de Belém, como menor abundância de *Bacteroides* quando comparada com a população do Rio de Janeiro e Estados Unidos, nossa hipótese era que a transição para a urbanização na Amazônia segue ritmos ou estágios diferentes, e que é possível que outros elementos (por exemplo, vias metabólicas) das populações isoladas e rurais ainda não tenham sido perdidos nesta região.

Por exemplo, a presença de dinâmicas sazonais tem sido discutida como importante biomarcador de microbiomas em regiões de subsistência tradicional, aspecto este observado entre os Hadza, grupo de caçadores-coletores da Tanzânia (Merrill et al., 2022; Smits et al., 2017; E. D. Sonnenburg & Sonnenburg, 2019). Além disso, a estabilidade das populações bacterianas no intestino é vista como um indicador de saúde deste ecossistema, e tem potencial para ser um fator decisivo em se tratando da aplicação de terapias de modulação microbiológica, como o transplante de microbioma, e o restabelecimento do equilíbrio após perturbações (Aho et al., 2019; Baktash et al., 2018; Mehta et al., 2018; Zhou et al., 2019).

Portanto, no segundo capítulo desta tese, exploramos as dinâmicas temporais do microbioma gastrointestinal da população urbana de Belém com o objetivo de caracterizar sua estabilidade e os fatores envolvidos na sua manutenção. Optamos por realizar amostragens longitudinais em dois períodos do ano, de modo a representar as comunidades bacterianas presentes na estação chuvosa (inverno amazônico), que compreende o período entre dezembro e maio, e na estação seca (verão amazônico), que corresponde ao período entre os meses de junho a novembro.

Nesta etapa, empregamos a metagenômica “shotgun”, cujo objetivo é sequenciar o genoma completo de todos os organismos presentes na amostra. Dessa forma, os dados permitem que analisemos não só a composição taxonômica das comunidades, como também a constituição genômica dos micro-organismos ali presentes. Adicionalmente, incluímos dados metagenômicos de outras populações que vivem em variados modos de subsistência com o objetivo de contextualizar o microbioma amazônico do ponto de vista da urbanização. Para isso, inicialmente classificamos a população de Belém como uma população urbana não-industrializada utilizando critérios de densidade populacional e índice de desenvolvimento humano, conforme proposto e empregado por Groussin et al. (2021) e pelo Global Microbiome Conservancy. Em seguida, buscamos incluir uma população urbana industrializada e uma população não-urbana/rural e não-industrializada. Seleccionamos,

portanto, indivíduos da cidade de Boston, nos Estados Unidos e a população dos Hadza, da Tanzânia (Poyet et al., 2019; Smits et al., 2017).

Nossos resultados mostraram que, no microbioma intestinal da Amazônia urbana, não existe uma dinâmica sazonal que acompanhe necessariamente a mudança das estações, como o que é relatado para os caçadores-coletores africanos. Observamos que as variações em diversidade nesta população ocorrem a nível individual, de modo que tanto a riqueza quanto a composição das comunidades intestinais sofrem modificações temporais únicas de cada hospedeiro. Como era esperado, observamos maior riqueza no microbioma dos indivíduos de Belém quando comparados com a população de Boston, além de constataremos novamente a presença de um gradiente de urbanização que posiciona a população urbana da Amazônia ao centro.

No que corresponde à composição do microbioma, mostramos que indivíduos de Belém apresentaram elevados níveis de variações estruturais, o que indica que estas comunidades são menos estáveis ao longo do tempo em relação à população urbana dos Estados Unidos. Posteriormente, consideramos a importância de rastrear de que forma esses microbiomas seriam classificados de acordo com uma métrica proposta para diagnosticar estados de saúde e adoecimento de comunidades intestinais. Apesar de controverso, o emprego de enterotipos tem recuperado a atenção da comunidade científica nos últimos anos por ser uma ferramenta capaz de discriminar microbiomas de pacientes doentes e saudáveis (Knights et al., 2014; MetaCardis Consortium et al., 2020; Yang et al., 2019). Nossos resultados revelaram que é possível que indivíduos sem qualquer doença aparente troquem de enterotipo ao longo do ano, chamando atenção para o fato de que mesmo modificações estruturais pequenas são capazes de mudar a classificação destes indivíduos.

Além disso, é importante notar que a inclusão de populações diversas pode influenciar a agrupamento de enterotipos, pois os Hadza, um grupo rural cujo microbioma apresenta clara variabilidade sazonal, foi classificado inteiramente como pertencente a um único

enterotipo devido às diferenças quando comparado com os dois grupos urbanos. Logo, destacamos a necessidade de desenvolver métodos que contemplem essa diversidade populacional para evitar classificações errôneas como adoecimento em microbioma de populações saudáveis não-urbanas.

A recuperação e montagem de genomas bacterianos a partir dos dados de sequenciamento nos permitiu acompanhar a dinâmica populacional do microbioma intestinal ao longo do tempo. Identificamos, para a população de Belém e de Boston, quais cepas bacterianas se mantiveram idênticas ao longo dos períodos de coleta e quais foram possivelmente substituídas ou tiveram sua abundância aumentada em detrimento de outras. Nossos resultados revelaram que no microbioma de indivíduos da Amazônia é mais frequente que linhagens de algumas espécies sejam substituídas por outras, o que mostra não só que esse ecossistema é mais dinâmico quando comparado com outra a população urbana, mas também que tais substituições são espécie-específicas. Além disso, mostramos que as distâncias genômicas entre as linhagens de um período e outro na Amazônia são maiores, o que pode ser resultado das pressões advindas da transição para a urbanização.

Essa hipótese é corroborada principalmente pelo fato de que o gênero que mais sofreu tais substituições e divergências genômicas foi *Bacteroides*, um biomarcador de populações industrializadas (Gorvitovskaia et al., 2016; E. D. Sonnenburg & Sonnenburg, 2019). Estudos anteriores mostraram que evolução intra-hospedeiro é comum no microbioma intestinal, e que espécies podem acumular variantes benéficas ao longo do tempo, que favorecem sua colonização e a manutenção de seus nichos no ecossistema intestinal (Poyet et al., 2019; Zhao et al., 2019). É esperado que, conforme seres humanos modificam seus estilos de vida, o microbioma acompanhe tais transformações com novas maneiras de se adaptar aos novos nichos. Groussin et al. (2021), mostraram que transferências genéticas horizontais são mais comuns entre indivíduos urbanizados, e que os genes compartilhados refletem o contexto de cada população. Por exemplo, no microbioma de indivíduos rurais,

genes relacionados à degradação de fibras são mais frequentemente transferidos entre espécies, enquanto que genes associados à plasmídeos e transposons são os mais transferidos entre as bactérias que colonizam populações industrializadas (Groussin et al., 2021). Portanto, nossos resultados estão de acordo com a ideia de que níveis de urbanização têm um papel importante em determinar de que forma o microbioma se adaptará ao hospedeiro.

O conhecimento que acumulamos até o presente acerca do microbioma humano é enviesado pela falta de representatividade populacional adequada. No total, 71% dos dados de metagenômica humana depositados nos três principais repositórios de sequências genômicas são provenientes do microbioma de indivíduos europeus e norte-americanos, que juntos representam menos de 5% da população mundial (Abdill et al., 2022). Enquanto isso, dados relativos ao microbioma da população do sul e sudeste asiático, que compõem mais de um quarto da população mundial, correspondem a menos de 2% destas sequências. No que concerne à população brasileira, amostras coletadas na América Latina e Caribe representam apenas 4% do que se encontra armazenado em bancos de dados. Este importante levantamento realizado por Abdill et al. (2022) evidencia que nosso entendimento sobre o microbioma humano possui uma lacuna e ignora o impacto da diversidade populacional na evolução e estabelecimento de comunidades microbianas.

Essa tendência impossibilita que populações não estudadas sejam também favorecidas pelas conquistas tecnológicas e terapêuticas advindas da compreensão da fisiologia humana em associação com comunidades microbianas. Assim como é debatido nas pesquisas em genética humana, abordar a diversidade biológica é indispensável para expandir a aplicabilidade e efetividade da medicina genômica (Peterson et al., 2019). Portanto, é fundamental que em microbiologia humana também consideremos e compreendamos o contexto biológico, geográfico e sociocultural de cada grupo populacional.

O impacto da diversidade humana no estudo do microbioma engloba também aspectos socioeconômicos, como discutem Harrison e Tarren (2018) ao proporem que a desigualdade em países de baixa e média renda está relacionada às diferenças observadas na composição do microbioma gastrointestinal. Um dos padrões resultantes dessa disparidade, por exemplo, é que o grupo com menor poder aquisitivo tende a basear suas escolhas nutricionais na razão “calorias-por-dólar”, e consequentemente, possui uma dieta de alta densidade calórica e pouco valor nutritivo (Harrison & Taren, 2018). Conforme apresentado anteriormente, nutrientes que favorecem a colonização de bactérias benéficas para a saúde humana se encontram majoritariamente em alimentos frescos e naturais, que são pouco acessíveis para indivíduos de baixa renda residentes de áreas urbanas (Harrison & Taren, 2018; Makki et al., 2018). Logo, em se tratando de diversidade humana, variados aspectos e dinâmicas populacionais podem influenciar a constituição do microbioma.

Neste estudo, realizamos a caracterização das comunidades microbianas intestinais de populações amazônicas vivendo em diferentes contextos geográficos e modos de subsistência, com foco na representatividade de indivíduos vivendo em espaços urbanos, rurais e isolados. Estimativas da Organização das Nações Unidas apontam que, até 2050, 90% da população brasileira residirá em áreas urbanas (United Nations Department of Economic and Social Affairs, 2022). Evidentemente, tais projeções incluem populações que hoje vivem em territórios rurais, onde, sobretudo na Amazônia, o acesso à infraestrutura em saúde coletiva é precária e a urbanização se apresenta como fator de risco para modificações estruturais do microbioma e consequente desenvolvimento de doenças não transmissíveis (T. C. da Silva et al., 2022; I. P. Silva et al., 2021). Enfim, destacamos a importância dos nossos achados para a compreensão dos fatores que influenciam a trajetória evolutiva humana, que depende invariavelmente de sua relação com comunidades microbiológicas, e para a vigilância em saúde das populações indígenas e urbanas do Brasil.

7. CONCLUSÃO

Neste estudo, propusemos a caracterização do microbioma gastrointestinal de populações urbanas e tradicionais saudáveis da Amazônia. Mostramos que a metagenômica é uma ferramenta eficaz para acompanhar a resposta dos micro-organismos à transição para a urbanização e industrialização. Ademais, fornecemos uma perspectiva evolutiva das constantes adaptações das comunidades microbiológicas às formas de interagir com o ambiente e seu hospedeiro.

Nossos achados servirão de base para futuras pesquisas focadas na caracterização de microbiomas em adoecimento ou em modulação terapêutica de comunidades microbianas intestinais. Dessa forma, permitiremos que populações humanas da Amazônia sejam representadas e incluídas nos avanços conquistados a partir do conhecimento em microbiologia humana.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aagaard, K., Ma, J., Antony, K. M., Ganu, R., Petrosino, J., & Versalovic, J. (2014). The Placenta Harbors a Unique Microbiome. *Science Translational Medicine*, 6(237), 237ra65-237ra65. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008599>
- Abdill, R. J., Adamowicz, E. M., & Blekhman, R. (2022). Public human microbiome data are dominated by highly developed countries. *PLOS Biology*, 20(2), e3001536. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001536>
- Abusleme, L., Dupuy, A. K., Dutzan, N., Silva, N., Burleson, J. A., Strausbaugh, L. D., Gamonal, J., & Diaz, P. I. (2013). The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *The ISME Journal*, 7(5), 1016–1025. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.174>
- Aho, V. T. E., Pereira, P. A. B., Voutilainen, S., Paulin, L., Pekkonen, E., Auvinen, P., & Scheperjans, F. (2019). Gut microbiota in Parkinson's disease: Temporal stability and relations to disease progression. *EBioMedicine*, 44, 691–707. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.05.064>
- Ahola, A. J., Lassenius, M. I., Forsblom, C., Harjutsalo, V., Lehto, M., & Groop, P.-H. (2017). Dietary patterns reflecting healthy food choices are associated with lower serum LPS activity. *Scientific Reports*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-068857>
- Ajslev, T. A., Andersen, C. S., Gamborg, M., Sørensen, T. I. A., & Jess, T. (2011). Childhood overweight after establishment of the gut microbiota: The role of delivery mode, pre-pregnancy weight and early administration of antibiotics. *International Journal of Obesity (2005)*, 35(4), 522–529. <https://doi.org/10.1038/ijo.2011.27>
- Albenberg, L., Esipova, T. V., Judge, C. P., Bittinger, K., Chen, J., Laughlin, A., Grunberg, S., Baldassano, R. N., Lewis, J. D., Li, H., Thom, S. R., Bushman, F. D., Vinogradov, S. A., & Wu, G. D. (2014). Correlation Between Intraluminal Oxygen Gradient and Radial

- Partitioning of Intestinal Microbiota. *Gastroenterology*, 147(5), 1055-1063.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.07.020>
- Almeida, A., Mitchell, A. L., Boland, M., Forster, S. C., Gloor, G. B., Tarkowska, A., Lawley, T. D., & Finn, R. D. (2019). A new genomic blueprint of the human gut microbiota. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0965-1>
- Almeida, A., Nayfach, S., Boland, M., Strozzi, F., Beracochea, M., Shi, Z. J., Pollard, K. S., Sakharova, E., Parks, D. H., Hugenholtz, P., Segata, N., Kyrpides, N. C., & Finn, R. D. (2020). A unified catalog of 204,938 reference genomes from the human gut microbiome. *Nature Biotechnology*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0603-3>
- Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., van der Veeken, J., deRoos, P., Liu, H., Cross, J. R., Pfeffer, K., Coffey, P. J., & Rudensky, A. Y. (2013). Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*, 504(7480), 451–455. <https://doi.org/10.1038/nature12726>
- Arrifano, G. P. F., Alvarez-Leite, J. I., Souza-Monteiro, J. R., Augusto-Oliveira, M., Paraense, R., Macchi, B. M., Pinto, A., Oriá, R. B., do Nascimento, J. L. M., & Crespo-Lopez, M. E. (2018). In the Heart of the Amazon: Noncommunicable Diseases and Apolipoprotein E4 Genotype in the Riverine Population. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(9). <https://doi.org/10.3390/ijerph15091957>
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Paslier, D. L., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J., Bertalan, M., Borruel, N., Consortium, M., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D., & Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473, 174–180. <https://doi.org/10.1038/nature09944>
- Audebert, C., Even, G., Cian, A., Loywick, A., Merlin, S., Viscogliosi, E., & Chabé, M. (2016). Colonization with the enteric protozoa *Blastocystis* is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. *Scientific Reports*, 6(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep25255>

- Ayeni, F. A., Biagi, E., Rampelli, S., Fiori, J., Soverini, M., Audu, H. J., Cristino, S., Caporali, L., Schnorr, S. L., Carelli, V., Brigidi, P., Candela, M., & Turrone, S. (2018). Infant and Adult Gut Microbiome and Metabolome in Rural Bassa and Urban Settlers from Nigeria. *Cell Reports*, 23(10), 3056–3067. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.018>
- Azad, M. B., Bridgman, S. L., Becker, A. B., & Kozyrskyj, A. L. (2014). Infant antibiotic exposure and the development of childhood overweight and central adiposity. *International Journal of Obesity* (2005), 38(10), 1290–1298. <https://doi.org/10.1038/ijo.2014.119>
- Bäckhed, F., Fraser, C. M., Ringel, Y., Sanders, M. E., Sartor, R. B., Sherman, P. M., Versalovic, J., Young, V., & Finlay, B. B. (2012). Defining a healthy human gut microbiome: Current concepts, future directions, and clinical applications. *Cell Host & Microbe*, 12(5), 611–622. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.10.012>
- Backhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2005). Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science*, 307(5717), 1915–1920. <https://doi.org/10.1126/science.1104816>
- Bäckhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., Li, Y., Xia, Y., Xie, H., Zhong, H., Khan, M. T., Zhang, J., Li, J., Xiao, L., Al-Aama, J., Zhang, D., Lee, Y. S., Kotowska, D., Colding, C., ... Wang, J. (2015). Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host & Microbe*, 17(5), 690–703. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.004>
- Baktash, A., Terveer, E. M., Zwartink, R. D., Hornung, B. V. H., Corver, J., Kuijper, E. J., & Smits, W. K. (2018). Mechanistic Insights in the Success of Fecal Microbiota Transplants for the Treatment of Clostridium difficile Infections. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1242. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01242>

- Barbosa, C. C., Sacuena, E. S. R., Pinto, A. M., Cardoso-Costa, G. L., & Guerreiro, J. F. (2019). Anthropometric and metabolic profile of a Brazilian Amerindian group: The Xikrin (Mebengôkre). *American Journal of Human Biology*, 31(4), e23255. <https://doi.org/10.1002/ajhb.23255>
- Beaumont, M., Goodrich, J. K., Jackson, M. A., Yet, I., Davenport, E. R., Vieira-Silva, S., Debelius, J., Pallister, T., Mangino, M., Raes, J., Knight, R., Clark, A. G., Ley, R. E., Spector, T. D., & Bell, J. T. (2016). Heritable components of the human fecal microbiome are associated with visceral fat. *Genome Biology*, 17(1), 189. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1052-7>
- Belforte, F. S., Fernandez, N., Tonín Monzón, F., Rosso, A. D., Quesada, S., Cimolai, M. C., Millán, A., Cerrone, G. E., Frechtel, G. D., Burcelin, R., Coluccio Leskow, F., & Penas-Steinhardt, A. (2019). Getting to Know the Gut Microbial Diversity of Metropolitan Buenos Aires Inhabitants. *Frontiers in Microbiology*, 10, 965. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00965>
- Blaser, M. J. (2018). The Past and Future Biology of the Human Microbiome in an Age of Extinctions. *Cell*, 172(6), 1173–1177. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.040>
- Blaser, M. J., & Falkow, S. (2009). What are the consequences of the disappearing human microbiota? *Nature Reviews Microbiology*, 7, 887.
- Blum, H. E. (2017). The human microbiome. *Advances in Medical Sciences*, 62(2), 414–420. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.04.005>
- Bocci, V. (1992). The neglected organ: Bacterial flora has a crucial immunostimulatory role. *Perspectives in Biology and Medicine*, 35, 251–260.
- Bokulich, N. A., Subramanian, S., Faith, J. J., Gevers, D., Gordon, I., Knight, R., Mills, D. A., Caporaso, J. G., & Manuscript, A. (2012). The Human Microbiome: Our Second Genome. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 13(1), 151–170. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-090711-163814>.The

- Byrd, A. L., Belkaid, Y., & Segre, J. A. (2018). The human skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 16(3), 143–155. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.157>
- Canfora, E. E., Jocken, J. W., & Blaak, E. E. (2015). Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nature Reviews Endocrinology*, 11(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.128>
- Chassaing, B., Koren, O., Goodrich, J. K., Poole, A. C., Srinivasan, S., Ley, R. E., & Gewirtz, A. T. (2015). Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature*, 519(7541), Article 7541. <https://doi.org/10.1038/nature14232>
- Chidambaram, S. B., Tuladhar, S., Bhat, A., Mahalakshmi, A. M., Ray, B., Essa, M. M., Bishir, M., Bolla, S. R., Nanjaiah, N. D., Guillemin, G. J., & Qoronfleh, M. W. (2020). Autism and Gut-Brain Axis: Role of Probiotics. *Advances in Neurobiology*, 24, 587–600. https://doi.org/10.1007/978-3-030-30402-7_21
- Cho, I., & Blaser, M. (2012). The Human Microbiome: At the interface of health and disease. *Nature Reviews Genetics*, 13(4), 260–270. <https://doi.org/10.1038/nrg3182>.The
- Cho, J. M., Pestana, L., Pardi, R., Pardi, D. S., & Khanna, S. (2019). Fecal microbiota transplant via colonoscopy may be preferred due to intraprocedure findings. *Intestinal Research*. <https://doi.org/10.5217/ir.2019.00056>
- Clemente, J. C., Pehrsson, E. C., Blaser, M. J., Sandhu, K., Gao, Z., Wang, B., Magris, M., Hidalgo, G., Contreras, M., Noya-Alarcon, O., Lander, O., McDonald, J., Cox, M., Walter, J., Oh, P. L., Ruiz, J. F., Rodriguez, S., Shen, N., Song, S. J., ... Dominguez-Bello, M. G. (2015). The microbiome of uncontacted Amerindians. *Science Advances*, 1(3), e1500183–e1500183. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500183>
- Collins, F. S., & McKusick, V. A. (2001). Implications of the Human Genome Project for medical science. *JAMA*, 285(5), 540–544. <https://doi.org/10.1001/jama.285.5.540>

- Conde, W. L., & Monteiro, C. A. (2014). Nutrition transition and double burden of undernutrition and excess of weight in Brazil. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 100(6), 1617S-1622S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.114.084764>
- Cordain, L., Eaton, S. B., Sebastian, A., Mann, N., Lindeberg, S., Watkins, B. A., Keefe, J. H. O., & Brand-miller, J. (2005). Origins and evolution of the Western diet: Health implications for the 21st century. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 341–354.
- Corr, S. C., Li, Y., Riedel, C. U., O'Toole, P. W., Hill, C., & Gahan, C. G. M. (2007). Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(18), 7617–7621. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700440104>
- Cox, L. M., & Blaser, M. J. (2015). Antibiotics in early life and obesity. *Nature Reviews. Endocrinology*, 11(3), 182–190. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.210>
- Crovesy, L., Masterson, D., & Rosado, E. L. (2020). Profile of the gut microbiota of adults with obesity: A systematic review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41430-020-0607-6>
- Cuevas-Sierra, A., Ramos-Lopez, O., Riezu-Boj, J. I., Milagro, F. I., & Martinez, J. A. (2019). Diet, Gut Microbiota, and Obesity: Links with Host Genetics and Epigenetics and Potential Applications. *Advances in Nutrition*, 10(suppl_1), S17–S30. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy078>
- Dai, Z., Zhang, J., Wu, Q., Fang, H., Shi, C., Li, Z., Lin, C., Tang, D., & Wang, D. (2020). Intestinal microbiota: A new force in cancer immunotherapy. *Cell Communication and Signaling*, 18(1), 90. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00599-6>
- Das, B., Ghosh, T. S., Kedia, S., Rampal, R., Saxena, S., Bag, S., Mitra, R., Dayal, M., Mehta, O., Surendranath, A., Travis, S. P. L., Tripathi, P., Nair, G. B., & Ahuja, V. (2018). Analysis of the Gut Microbiome of Rural and Urban Healthy Indians Living in Sea Level

- and High Altitude Areas. *Scientific Reports*, 8(1), 10104. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28550-3>
- David, L. A., Materna, A. C., Friedman, J., Campos-Baptista, M. I., Blackburn, M. C., Perrotta, A., Erdman, S. E., & Alm, E. J. (2014). Host lifestyle affects human microbiota on daily timescales. *Genome Biology*, 15(7), R89. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-7-r89>
- Davies, J. (2001). In a map for human life, count the microbes, too. *Science*, 291(5512).
- De Filippis, F., Pellegrini, N., Vannini, L., Jeffery, I. B., La Storia, A., Laghi, L., Serrazanetti, D. I., Di Cagno, R., Ferrocino, I., Lazzi, C., Turrone, S., Cocolin, L., Brigidi, P., Neviani, E., Gobbetti, M., O'Toole, P. W., & Ercolini, D. (2015). High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. *Gut*, 65, 1812–1821. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309957>
- De Filippo, C., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Albanese, D., Pieraccini, G., Banci, E., Miglietta, F., Cavalieri, D., & Lionetti, P. (2017). Diet, Environments, and Gut Microbiota. A Preliminary Investigation in Children Living in Rural and Urban Burkina Faso and Italy. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01979>
- De Sordi, L., Lourenço, M., & Debarbieux, L. (2018). “I will survive”: A tale of bacteriophage-bacteria coevolution in the gut. *Gut Microbes*, 10(1), 92–99. <https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1474322>
- Dickson, R. P., Erb-Downward, J. R., Martinez, F. J., & Huffnagle, G. B. (2016). The Microbiome and the Respiratory Tract. *Annual Review of Physiology*, 78, 481–504. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105238>
- Dill-McFarland, K. A., Tang, Z.-Z., Kemis, J. H., Kerby, R. L., Chen, G., Palloni, A., Sorenson, T., Rey, F. E., & Herd, P. (2019). Close social relationships correlate with human gut microbiota composition. *Scientific Reports*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37298-9>

- Dominguez-Bello, M. G., & Blaser, M. J. (2011). The Human Microbiota as a Marker for Migrations of Individuals and Populations. *Annual Review of Anthropology*, 40, 451–474. <https://doi.org/10.1146/annurev-anthro-081309-145711>
- Dominguez-Bello, M. G., Godoy-Vitorino, F., Knight, R., & Blaser, M. J. (2019). Role of the microbiome in human development. *Gut*. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317503>
- Dominguez-Bello, M. G., Peterson, D., Noya-Alarcon, O., Bevilacqua, M., Rojas, N., Rodríguez, R., Pinto, S. A., Baallow, R., & Caballero-Arias, H. (2016). Ethics of exploring the microbiome of native peoples. *Nature Microbiology*, 1(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.97>
- Donaldson, G. P., Lee, S. M., & Mazmanian, S. K. (2016). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 14(1), 20–32. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3552>
- Donia, M. S., Cimerancic, P., Schulze, C. J., Wieland Brown, L. C., Martin, J., Mitreva, M., Clardy, J., Linington, R. G., & Fischbach, M. A. (2014). A systematic analysis of biosynthetic gene clusters in the human microbiome reveals a common family of antibiotics. *Cell*, 158(6), 1402–1414. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.032>
- Doumatey, A. P., Adeyemo, A., Zhou, J., Lei, L., Adebamowo, S. N., Adebamowo, C., & Rotimi, C. N. (2020). Gut Microbiome Profiles Are Associated With Type 2 Diabetes in Urban Africans. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 63. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00063>
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., & Relman, D. A. (2005). Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science*, 308(5728), 1635–1638.
- Escobar, J. S., Klotz, B., Valdes, B. E., & Agudelo, G. M. (2015). The gut microbiota of Colombians differs from that of Americans, Europeans and Asians. *BMC Microbiology*, 14(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0311-6>

- Falcony, G., Joossens, M., Vieira-Silva, S., Wang, J., Darzi, Y., Faust, K., Kurilshikov, A., Bonder, M. J., Valles-Colomer, M., Vandeputte, D., Tito, R. Y., Chaffron, S., Rymenans, L., Verspecht, C., De Sutter, L., Tigchelaar, E. F., Eeckhaut, L., Fu, J., Henckaerts, L., ... Raes, J. (2016). Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science*, 352(6285), 560–564. <https://doi.org/10.1126/science.aad3503>
- Fehlner-Peach, H., Magnabosco, C., Raghavan, V., Scher, J. U., Tett, A., Cox, L. M., Gottsegen, C., Watters, A., Wiltshire-Gordon, J. D., Segata, N., Bonneau, R., & Littman, D. R. (2019). Distinct Polysaccharide Utilization Profiles of Human Intestinal *Prevotella copri* Isolates. *Cell Host & Microbe*, 26(5), 680-690.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.10.013>
- Fei, N., Bernabé, B. P., Lie, L., Baghdan, D., Bedu-Addo, K., Plange-Rhule, J., Forrester, T. E., Lambert, E. V., Bovet, P., Gottel, N., Riesen, W., Korte, W., Luke, A., Kliethermes, S. A., Layden, B. T., Gilbert, J. A., & Dugas, L. R. (2019). The human microbiota is associated with cardiometabolic risk across the epidemiologic transition. *PloS One*, 14(7), e0215262. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215262>
- Fettweis, J. M., Serrano, M. G., Brooks, J. P., Edwards, D. J., Girerd, P. H., Parikh, H. I., Huang, B., Arodz, T. J., Edupuganti, L., Glascock, A. L., Xu, J., Jimenez, N. R., Vivadelli, S. C., Fong, S. S., Sheth, N. U., Jean, S., Lee, V., Bokhari, Y. A., Lara, A. M., ... Buck, G. A. (2019). The vaginal microbiome and preterm birth. *Nature Medicine*, 25(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0450-2>
- Filippo, C. D., Cavalieri, D., Di, M., Ramazzotti, M., Baptiste, J., Massart, S., Collini, Si., Peraccini, G., & Lionetti, P. (2010). 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*, 107(33), 14691–14696. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005963107>

- Fujio-Vejar, S., Vasquez, Y., Morales, P., Magne, F., Vera-Wolf, P., Ugalde, J. A., Navarrete, P., & Gotteland, M. (2017). The Gut Microbiota of Healthy Chilean Subjects Reveals a High Abundance of the Phylum Verrucomicrobia. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1221. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.01221>
- Garrett, W. S. (2017). Cancer and the microbiota. *Cancer Immunology and Immunotherapy*, 348(6230), 80–86.
- Gianotti, R. J., & Moss, A. C. (2017). Fecal Microbiota Transplantation: From Clostridium difficile to Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology & Hepatology*, 13(4), 209–213.
- Gilbert, J. A., Blaser, M. J., Caporaso, J. G., Jansson, J. K., Lynch, S. V., & Knight, R. (2018). Current understanding of the human microbiome. *Nature Medicine*, 24, 392.
- Gilbert, J. A., Quinn, R. A., Debelius, J., Xu, Z. Z., Morton, J., Garg, N., Jansson, J. K., Dorrestein, P. C., & Knight, R. (2016). Microbiome-wide association studies link dynamic microbial consortia to disease. *Nature*, 535, 94–103. <https://doi.org/10.1038/nature18850>
- Gill, S. R., Pop, M., DeBoy, R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B. S., Gordon, J. I., Relman, D. A., Fraser-Ligget, C. M., & Nelson, K. E. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, 312(5778), 1355–1359. <https://doi.org/10.1126/science.1124234>.Metagenomic
- Girard, C., Tromas, N., Amyot, M., & Shapiro, B. J. (2017). Gut Microbiome of the Canadian Arctic Inuit. *Ecological and Evolutionary Science*, 2, e00297-16.
- Glick-bauer, M., & Yeh, M. (2014). The Health Advantage of a Vegan Diet: Exploring the Gut Microbiota Connection. *Nutrients*, 6, 4822–4838. <https://doi.org/10.3390/nu6114822>
- Goffau, M. C. de, Lager, S., Sovio, U., Gaccioli, F., Cook, E., Peacock, S. J., Parkhill, J., Charnock-Jones, D. S., & Smith, G. C. S. (2019). Human placenta has no microbiome

- but can contain potential pathogens. *Nature*, 572(7769), Article 7769.
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1451-5>
- Gomez, A., Petrzalkova, K. J., Burns, M. B., White, B. A., Leigh, S. R., Blekhman, R., Gomez, A., Petrzalkova, K. J., Burns, M. B., Yeoman, C. J., Amato, K. R., & Vlckova, K. (2016). Gut Microbiome of Coexisting BaAka Pygmies and Bantu Reflects Gradients of Traditional Subsistence Patterns. *Cell Press*, 14, 2142–2153.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.02.013>
- Goodrich, J. K., Davenport, E. R., Jackson, M. A., Beaumont, M., Knight, R., Spector, T. D., Bell, J. T., Clark, A. G., & Ley, R. E. (2016). Genetic determinants of the gut microbiome assessed in UK Twins. *Cell Host & Microbe*, 19(5), 731–743.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.017>.Genetic
- Goodrich, J. K., Waters, J. L., Poole, A. C., Sutter, J. L., Koren, O., Blekhman, R., Beaumont, M., Van Treuren, W., Knight, R., Bell, J. T., Spector, T. D., Clark, A. G., & Ley, R. E. (2014). Human Genetics Shape the Gut Microbiome. *Cell*, 159, 789–799.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.053>
- Gorvitovskaia, A., Holmes, S. P., & Huse, S. M. (2016). Interpreting Prevotella and Bacteroides as biomarkers of diet and lifestyle. *Microbiome*, 4(15).
<https://doi.org/10.1186/s40168-016-0160-7>
- Greenhill, A. R., & Walter, J. (2015). The Gut Microbiota of Rural Papua New Guineans: Composition, Diversity Patterns, and Ecological Processes. *Cell Reports*, 11, 527–538. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.049>
- Groussin, M., Poyet, M., Sistiaga, A., Kearney, S. M., Moniz, K., Noel, M., Hooker, J., Gibbons, S. M., Segurel, L., Froment, A., Mohamed, R. S., Fezeu, A., Juimo, V. A., Lafosse, S., Tabe, F. E., Girard, C., Iqaluk, D., Nguyen, L. T. T., Shapiro, B. J., ... Alm, E. J. (2021). Elevated rates of horizontal gene transfer in the industrialized human microbiome. *Cell*, 184(8), 2053-2067.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.052>

- Hansen, M. E. B., Rubel, M. A., Bailey, A. G., Ranciaro, A., Thompson, S. R., Campbell, M. C., Beggs, W., Dave, J. R., Mokone, G. G., Mpoloka, S. W., Nyambo, T., Abnet, C., Chanock, S. J., Bushman, F. D., & Tishkoff, S. A. (2019). Population structure of human gut bacteria in a diverse cohort from rural Tanzania and Botswana. *Genome Biology*, 20(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1616-9>
- Harrison, C. A., & Taren, D. (2018). How poverty affects diet to shape the microbiota and chronic disease. *Nature Reviews Immunology*, 18(4), 279–287. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.121>
- Harstra, A., Bouter, K., Bäckhed, F., & Nieuwdorp, M. (2015). Insights Into the Role of the Microbiome in Obesity and Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 38, 159–165. <https://doi.org/10.2337/dc14-0769>
- Hehemann, J.-H., Correc, G., Barbeyron, T., Helbert, W., Czejzek, M., & Michel, G. (2010). Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. *Nature*, 464(7290), 908–912. <https://doi.org/10.1038/nature08937>
- Jacobson, A., Lam, L., Rajendram, M., Tamburini, F., Honeycutt, J., Pham, T., Van Treuren, W., Pruss, K., Stabler, S. R., Lugo, K., Bouley, D. M., Vilches-Moure, J. G., Smith, M., Sonnenburg, J. L., Bhatt, A. S., Huang, K. C., & Monack, D. (2018). A Gut Commensal-Produced Metabolite Mediates Colonization Resistance to Salmonella Infection. *Cell Host & Microbe*, 24(2), 296–307.e7. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.07.002>
- Jha, A. R., Davenport, E. R., Gautam, Y., Bhandari, D., Tandukar, S., Ng, K. M., Fragiadakis, G. K., Holmes, S., Gautam, G. P., Leach, J., Sherchand, J. B., Bustamante, C. D., & Sonnenburg, J. L. (2018). Gut microbiome transition across a lifestyle gradient in Himalaya. *PLoS Biology*, 16(11), e2005396. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005396>
- Jiang, T. T., Shao, T.-Y., Ang, W. X. G., Kinder, J. M., Turner, L. H., Pham, G., Whitt, J., Alenghat, T., & Way, S. S. (2017). Commensal Fungi Recapitulate the Protective

- Benefits of Intestinal Bacteria. *Cell Host & Microbe*, 22(6), 809-816.e4.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.10.013>
- Jie, Z., Xia, H., Zhong, S.-L., Feng, Q., Li, S., Liang, S., Zhong, H., Liu, Z., Gao, Y., Zhao, H., Zhang, D., Su, Z., Fang, Z., Lan, Z., Li, J., Xiao, L., Li, J., Li, R., Li, X., ... Kristiansen, K. (2017). The gut microbiome in atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature Communications*, 8(1), 845. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00900-1>
- Karlsson, F. H., Tremaroli, V., Nookaew, I., Bergstrom, G., Behre, C. J., Fagerberg, B., Nielsen, J., & Backhed, F. (2013). Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*, 498(7452), 99–103.
<https://doi.org/10.1038/nature12198>
- Kastl, A. J., Terry, N. A., Wu, G. D., & Albenberg, L. G. (2020). The Structure and Function of the Human Small Intestinal Microbiota: Current Understanding and Future Directions. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 9(1), 33–45.
<https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2019.07.006>
- Knights, D., Ward, T. L., Mckinlay, C. E., Miller, H., Gonzalez, A., & Mcdonald, D. (2014). Rethinking “Enterotypes.” *Cell Host and Microbe*, 16(4), 433–437.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.09.013>
- Koeth, R. A., Wang, Z., Levison, B. S., Buffa, J. A., Org, E., Sheehy, B. T., Britt, E. B., Fu, X., Wu, Y., Li, L., Smith, J. D., DiDonato, J. A., Chen, J., Li, H., Wu, G. D., Lewis, J. D., Warrier, M., Brown, J. M., Krauss, R. M., ... Hazen, S. L. (2013). Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nature Medicine*, 19(5), 576–585. <https://doi.org/10.1038/nm.3145>
- Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., & Bäckhed, F. (2016). From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell*, 165(6), 1332–1345. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.041>

- Kolodziejczyk, A. A., Zheng, D., & Elinav, E. (2019). Diet–microbiota interactions and personalized nutrition. *Nature Reviews Microbiology*, 17(12), 742–753. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0256-8>
- Koskinen, K., Pausan, M. R., Perras, A. K., Beck, M., Bang, C., Mora, M., Schilhabel, A., Schmitz, R., & Moissl-Eichinger, C. (2017). First Insights into the Diverse Human Archaeome: Specific Detection of Archaea in the Gastrointestinal Tract, Lung, and Nose and on Skin. *MBio*, 8(6). <https://doi.org/10.1128/mBio.00824-17>
- Kubinak, J. L., Petersen, C., Stephens, W. Z., Soto, R., Bake, E., O’Connell, R. M., & Round, J. L. (2015). MyD88 signaling in T cells directs IgA-mediated control of the microbiota to promote health. *Cell Host and Microbe*, 17(2), 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.12.009>
- Larsen, O. F. A., & Claassen, E. (2018). The mechanistic link between health and gut microbiota diversity. *Scientific Reports*, 8(1), 2183. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20141-6>
- Leiby, J. S., McCormick, K., Sherrill-Mix, S., Clarke, E. L., Kessler, L. R., Taylor, L. J., Hofstaedter, C. E., Roche, A. M., Mattei, L. M., Bittinger, K., Elovitz, M. A., Leite, R., Parry, S., & Bushman, F. D. (2018). Lack of detection of a human placenta microbiome in samples from preterm and term deliveries. *Microbiome*, 6(1), 196. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0575-4>
- Levy, M., Kolodziejczyk, A. A., Thaiss, C. A., & Elinav, E. (2017). Dysbiosis and the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 17(4), 219–232. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.7>
- Li, H., Li, T., Li, X., Wang, G., Lin, Q., & Qu, J. (2018). Gut Microbiota in Tibetan Herdsmen Reflects the Degree of Urbanization. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1745. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01745>

- Li, K., Dan, Z., Gesang, L., Wang, H., Zhou, Y., Du, Y., & Ren, Y. (2016). Comparative Analysis of Gut Microbiota of Native Tibetan and Han Populations Living at Different Altitudes. *PLoS ONE*, 11(5), e0155863. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155863>
- Li, X., Watanabe, K., & Kimura, I. (2017). Gut Microbiota Dysbiosis Drives and Implies Novel Therapeutic Strategies for Diabetes Mellitus and Related Metabolic Diseases. *Frontiers in Immunology*, 8(December), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01882>
- Lin, A., Bik, E. M., Costello, E. K., Dethlefsen, L., Haque, R., Relman, D. A., & Singh, U. (2013). Distinct Distal Gut Microbiome Diversity and Composition in Healthy Children from Bangladesh and the United States. *PLoS ONE*, 8(1), e53838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053838>
- Lloyd-Price, J., Abu-ali, G., & Huttenhower, C. (2016). The healthy human microbiome. *Genome Medicine*, 8(51), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0307-y>
- Lokmer, A., Aflalo, S., Amougou, N., Lafosse, S., Froment, A., Tabe, F. E., Poyet, M., Groussin, M., Said-Mohamed, R., & Ségurel, L. (2020). Response of the human gut and saliva microbiome to urbanization in Cameroon. *Scientific Reports*, 10(1), 2856. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59849-9>
- Lourenço, A. E. P., Santos, R. V., Orellana, J. D. Y., & Coimbra, C. E. A. (2008). Nutrition transition in Amazonia: Obesity and socioeconomic change in the Suruí Indians from Brazil. *American Journal of Human Biology*, 20(5), 564–571. <https://doi.org/10.1002/ajhb.20781>
- Luckey, T. D. (1972). Introduction to intestinal microecology. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 25(12), 1292–1294. <https://doi.org/10.1093/ajcn/25.12.1292>
- Lugli, G. A., Milani, C., Mancabelli, L., Turroni, F., Ferrario, C., Duranti, S., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2017). Ancient bacteria of the Ötzi's microbiome: A genomic tale from the Copper Age. *Microbiome*, 5, 5. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0221-y>

- Luke, J., Stensvold, C. R., & Parfrey, L. W. (2015). Are Human Intestinal Eukaryotes Beneficial or Commensals? *PLoS Pathogens*, 11(8), 7–12.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005039>
- Macfarlane, G. T., & Macfarlane, S. (2012). Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health. *Journal of AOAC International*, 95(1), 50–60.
https://doi.org/10.5740/jaoacint.sge_macfarlane
- Macfarlane, S., & Macfarlane, G. T. (2003). Regulation of short-chain fatty acid production. *Proceeding of the Nutrition Society*, 62(1), 67–72.
<https://doi.org/10.1079/PNS2002207>
- Makki, K., Deehan, E. C., Walter, J., & Bäckhed, F. (2018). The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease. *Cell Host & Microbe*, 23(6), 705–715.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.012>
- Martens, E. C., Chiang, H. C., & Gordon, J. I. (2008). Mucosal Glycan Foraging Enhances Fitness and Transmission of a Saccharolytic Human Gut Bacterial Symbiont. *Cell Host & Microbe*, 4(5), 447–457. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.09.007>
- Mehta, R. S., Abu-Ali, G. S., Drew, D. A., Lloyd-Price, J., Subramanian, A., Lochhead, P., Joshi, A. D., Ivey, K. L., Khalili, H., Brown, G. T., DuLong, C., Song, M., Nguyen, L. H., Mallick, H., Rimm, E. B., Izard, J., Huttenhower, C., & Chan, A. T. (2018). Stability of the human faecal microbiome in a cohort of adult men. *Nature Microbiology*, 3(3), 347–355. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0096-0>
- Merrill, B. D., Carter, M. M., Olm, M. R., Dahan, D., Tripathi, S., Spencer, S. P., Yu, B., Jain, S., Neff, N., Jha, A. R., Sonnenburg, E. D., & Sonnenburg, J. L. (2022). *Ultra-deep Sequencing of Hadza Hunter-Gatherers Recovers Vanishing Gut Microbes* [Preprint]. *Microbiology*. <https://doi.org/10.1101/2022.03.30.486478>
- MetaCardis Consortium, Vieira-Silva, S., Falony, G., Belda, E., Nielsen, T., Aron-Wisnewsky, J., Chakaroun, R., Forslund, S. K., Assmann, K., Valles-Colomer, M., Nguyen, T. T.

- D., Proost, S., Prifti, E., Tremaroli, V., Pons, N., Le Chatelier, E., Andreelli, F., Bastard, J.-P., Coelho, L. P., ... Raes, J. (2020). Statin therapy is associated with lower prevalence of gut microbiota dysbiosis. *Nature*, 581(7808), 310–315. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2269-x>
- Morrison, D. J., & Preston, T. (2016). Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*, 7(3), 189–200. <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1134082>
- Morton, E. R., Lynch, J., Froment, A., Lafosse, S., Heyer, E., Przeworski, M., Blekhan, R., & Ségurel, L. (2015). Variation in Rural African Gut Microbiota Is Strongly Correlated with Colonization by *Entamoeba* and Subsistence. *PLoS Genetics*, 11(11), 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005658>
- Mosites, E., Sammons, M., Otiang, E., Eng, A., Noecker, C., Manor, O., Hilton, S., Thumbi, S. M., Onyango, C., Garland-Lewis, G., Call, D. R., Njenga, M. K., Wasserheit, J. N., Zambriski, J. A., Walson, J. L., Palmer, G. H., Montgomery, J., Borenstein, E., Omoro, R., & Rabinowitz, P. M. (2017). Microbiome sharing between children, livestock and household surfaces in western Kenya. *PLoS ONE*, 12(2), e017017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171017>
- Naidoo, N., Pawitan, Y., Soong, R., Cooper, D. N., & Ku, C.-S. (2011). Human genetics and genomics a decade after the release of the draft sequence of the human genome. *Human Genomics*, 5(6), 577–622. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-5-6-577>
- Nash, A. K., Auchtung, T. A., Wong, M. C., Smith, D. P., Gesell, J. R., Ross, M. C., Stewart, C. J., Metcalf, G. A., Muzny, D. M., Gibbs, R. A., Ajami, N. J., & Petrosino, J. F. (2017). The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome*, 5(1), 153. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0373-4>

- Nayfach, S., Shi, Z. J., Seshadri, R., Pollard, K. S., & Kyrpides, N. C. (2019). New insights from uncultivated genomes of the global human gut microbiome. *Nature*, 568(7753), Article 7753. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1058-x>
- Noce, A., Marrone, G., Di Daniele, F., Ottaviani, E., Wilson Jones, G., Bernini, R., Romani, A., & Rovella, V. (2019). Impact of Gut Microbiota Composition on Onset and Progression of Chronic Non-Communicable Diseases. *Nutrients*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/nu11051073>
- Nolan-Kenney, R., Wu, F., Hu, J., Yang, L., Kelly, D., Li, H., Jasmine, F., Kibriya, M. G., Parvez, F., Shaheen, I., Sarwar, G., Ahmed, A., Eunus, M., Islam, T., Pei, Z., Ahsan, H., & Chen, Y. (2020). The Association Between Smoking and Gut Microbiome in Bangladesh. *Nicotine & Tobacco Research*, 22(8), 1339–1346. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntz220>
- 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., Gujja-poma, E., Troncoso-corzo, L., Warinner, C., Ozga, A. T., & Lewis, C. M. (2015). Subsistence strategies in traditional societies distinguish gut microbiomes. *Nature Communications*, 6(6505). <https://doi.org/10.1038/ncomms7505>
- O'Keefe, S. J. D., Li, J. V., Lahti, L., Ou, J., Carbonero, F., Mohammed, K., Posma, J. M., Kinross, J., Wahl, E., Ruder, E., Vippera, K., Naidoo, V., Mtshali, L., Tims, S., Puylaert, P. G. B., Delany, J., Krasinskas, A., Benefiel, A. C., Kaseb, H. O., ... Zoetendal, E. G. (2015). Fat, fibre and cancer risk in African Americans and rural Africans. *Nature Communications*, 6(6342). <https://doi.org/10.1038/ncomms7342>
- Ott, S. J., Waetzig, G. H., Rehman, A., Moltzau-Anderson, J., Bharti, R., Grasis, J. A., Cassidy, L., Tholey, A., Fickenscher, H., Seegert, D., Rosenstiel, P., & Schreiber, S. (2017). Efficacy of Sterile Fecal Filtrate Transfer for Treating Patients With *Clostridium difficile*

- Infection. *Gastroenterology*, 152(4), 799-811.e7.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.11.010>
- Pasolli, E., Asnicar, F., Manara, S., Zolfo, M., Karcher, N., Armanini, F., Beghini, F., Manghi, P., Tett, A., Ghensi, P., Collado, M. C., Rice, B. L., DuLong, C., Morgan, X. C., Golden, C. D., Quince, C., Huttenhower, C., & Segata, N. (2019). Extensive Unexplored Human Microbiome Diversity Revealed by Over 150,000 Genomes from Metagenomes Spanning Age, Geography, and Lifestyle. *Cell*, 176(3), 649-662.e20.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.001>
- Petersen, C., Bell, R., Klag, K. A., Lee, S.-H., Soto, R., Ghazaryan, A., Buhrke, K., Ekiz, H. A., Ost, K. S., Boudina, S., O'Connell, R. M., Cox, J. E., Villanueva, C. J., Stephens, W. Z., & Round, J. L. (2019). T cell-mediated regulation of the microbiota protects against obesity. *Science*, 365(6451). <https://doi.org/10.1126/science.aat9351>
- Peterson, R. E., Kuchenbaecker, K., Walters, R. K., Chen, C.-Y., Popejoy, A. B., Periyasamy, S., Lam, M., Iyegbe, C., Strawbridge, R. J., Brick, L., Carey, C. E., Martin, A. R., Meyers, J. L., Su, J., Chen, J., Edwards, A. C., Kalungi, A., Koen, N., Majara, L., ... Duncan, L. E. (2019). Genome-wide Association Studies in Ancestrally Diverse Populations: Opportunities, Methods, Pitfalls, and Recommendations. *Cell*, 179(3), 589–603. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.051>
- Pires, E. S., Hardoim, C. C. P., Miranda, K. R., Secco, D. A., Lobo, L. A., Carvalho, D. P. de, Han, J., Borchers, C. H., Ferreira, R. B. R., Salles, J. F., Domingues, R. M. C. P., & Antunes, L. C. M. (2019). The Gut Microbiome and Metabolome of Two Riparian Communities in the Amazon. *Frontiers in Microbiology*, 10.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02003>
- Popkin, B. M. (2006). Global nutrition dynamics: The world is shifting rapidly toward a diet linked with noncommunicable diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84(2), 289–298. <https://doi.org/10.1093/ajcn/84.1.289>

- Poyet, M., Groussin, M., Gibbons, S. M., Avila-Pacheco, J., Jiang, X., Kearney, S. M., Perrotta, A. R., Berdy, B., Zhao, S., Lieberman, T. D., Swanson, P. K., Smith, M., Roesemann, S., Alexander, J. E., Rich, S. A., Livny, J., Vlamakis, H., Clish, C., Bullock, K., ... Alm, E. J. (2019). A library of human gut bacterial isolates paired with longitudinal multiomics data enables mechanistic microbiome research. *Nature Medicine*, 25(9), 1442–1452. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0559-3>
- Proctor, L., LoTempio, J., Marquitz, A., Daschner, P., Xi, D., Flores, R., Brown, L., Ranallo, R., Maruvada, P., Regan, K., Dwayne Lunsford, R., Reddy, M., Caler, L., & NIH Human Microbiome Portfolio Analysis Team. (2019). A review of 10 years of human microbiome research activities at the US National Institutes of Health, Fiscal Years 2007-2016. *Microbiome*, 7(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0620-y>
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., ... Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59–65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>
- Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., Liang, S., Zhang, W., Guan, Y., Shen, D., Peng, Y., Zhang, D., Jie, Z., Wu, W., Qin, Y., Xue, W., Li, J., Han, L., Lu, D., ... Wang, J. (2012). A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*, 490(7418), 55–60. <https://doi.org/10.1038/nature11450>
- Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Cheng, J., Duncan, A. E., Kau, A. L., Griffin, N. W., Lombard, V., Henrissat, B., Bain, J. R., Muehlbauer, M. J., Ilkayeva, O., Semenkovich, C. F., Funai, K., Hayashi, D. K., Lyle, B. J., Martini, M. C., Ursell, L. K., Clemente, J. C., ... Gordon, J. I. (2013). Gut Microbiota from Twins Discordant for Obesity Modulate Metabolism in Mice. *Science*, 341(6150). <https://doi.org/10.1126/science.1241214>

- Ridlon, J. M., Harris, S. C., Bhowmik, S., Kang, D.-J., & Hylemon, P. B. (2016). Consequences of bile salt biotransformations by intestinal bacteria. *Gut Microbes*, 7(1), 22–39. <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1127483>
- Ridlon, J. M., Kang, D. J., Hylemon, P. B., & Bajaj, J. S. (2014). Bile acids and the gut microbiome. *Current Opinion in Gastroenterology*, 30(3), 332–338. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000057>
- Rinke, C., Schwientek, P., Sczyrba, A., Ivanova, N. N., Anderson, I. J., Cheng, J.-F., Darling, A., Malfatti, S., Swan, B. K., Gies, E. A., Dodsworth, J. A., Hedlund, B. P., Tsiamis, G., Sievert, S. M., Liu, W.-T., Eisen, J. A., Hallam, S. J., Kyrpides, N. C., Stepanauskas, R., ... Woyke, T. (2013). Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature*, 499(7459), Article 7459. <https://doi.org/10.1038/nature12352>
- Ríos-covián, D., Ruas-madiedo, P., Margolles, A., Gueimonde, M., Reyes-gavilán, C. G. D. L., & Salazar, N. (2016). Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00185>
- Routy, B., Chatelier, E. L., Derosa, L., Duong, C. P. M., Alou, M. T., Daillère, R., Fluckiger, A., Messaoudene, M., Rauber, C., Roberti, M. P., Fidelle, M., Flament, C., Poirier-Colame, V., Opolon, P., Klein, C., Iribarren, K., Mondragón, L., Jacquelot, N., Qu, B., ... Zitvogel, L. (2018). Gut microbiome influences efficacy of PD-1–based immunotherapy against epithelial tumors. *Science*, 359(6371), 91–97. <https://doi.org/10.1126/science.aan3706>
- Rubel, M. A., Abbas, A., Taylor, L. J., Connell, A., Tanes, C., Bittinger, K., Ndze, V. N., Fonsah, J. Y., Ngwang, E., Essiane, A., Fokunang, C., Njamnshi, A. K., Bushman, F. D., & Tishkoff, S. A. (2020). Lifestyle and the presence of helminths is associated with gut microbiome composition in Cameroonians. *Genome Biology*, 21(1), 122. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02020-4>

- Sampson, T. R., Debelius, J. W., Thron, T., Wittung-stafshede, P., Knight, R., Mazmanian, S. K., Sampson, T. R., Debelius, J. W., Thron, T., Janssen, S., Shastri, G. G., Ilhan, Z. E., Challis, C., Schretter, C. E., Rocha, S., Gradinaru, V., & Chesselet, M. (2016). Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell*, 167, 1469–1480.
- Samuel, B. S., Hansen, E. E., Manchester, J. K., Coutinho, P. M., Henrissat, B., Fulton, R., Latreille, P., Kim, K., Wilson, R. K., & Gordon, J. I. (2007). Genomic and metabolic adaptations of *Methanobrevibacter smithii* to the human gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(25), 10643–10648. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704189104>
- Sankaranarayanan, K., Ozga, A. T., Warinner, C., Tito, R. Y., Obregon-tito, A. J., Xu, J., Gaffney, P. M., Jervis, L. L., Stephens, L., Foster, M., Tallbull, G., Spicer, P., Cecil, M., City, O., Clinical, S., Resources, T., City, O., Diabetes, I., City, O., ... City, O. (2016). Gut microbiome diversity among Cheyenne and Arapaho individuals from western Oklahoma. *Current Biology*, 25(24), 3161–3169. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.060>.Gut
- Schnorr, S. L., Candela, M., Rampelli, S., Centanni, M., Consolandi, C., Basaglia, G., Turrone, S., Biagi, E., Peano, C., Severgnini, M., Fiori, J., Gotti, R., Bellis, G. D., Luiselli, D., Brigidi, P., Mabulla, A., Marlowe, F., Henry, A. G., & Crittenden, A. N. (2014). Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. *Nature Communications*, 5(3654). <https://doi.org/10.1038/ncomms4654>
- Schnorr, S. L., Sankaranarayanan, K., Lewis, C. M., & Warinner, C. (2016). Insights into human evolution from ancient and contemporary microbiome studies. *Current Opinion in Genetics & Development*, 41, 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.07.003>
- Segal, L. N., Alekseyenko, A. V., Clemente, J. C., Kulkarni, R., Wu, B., Chen, H., Berger, K. I., Goldring, R. M., Rom, W. N., Blaser, M. J., & Weiden, M. D. (2013). Enrichment of

- lung microbiome with supraglottic taxa is associated with increased pulmonary inflammation. *Microbiome*, 1, 19. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-1-19>
- Segata, N., Haake, S. K., Mannon, P., Lemon, K. P., Waldron, L., Gevers, D., Huttenhower, C., & Izard, J. (2012). Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. *Genome Biology*, 13(6), R42. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-6-r42>
- Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biology*, 14(8), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>
- Shao, Y., Forster, S. C., Tsaliki, E., Vervier, K., Strang, A., Simpson, N., Kumar, N., Stares, M. D., Rodger, A., Brocklehurst, P., Field, N., & Lawley, T. D. (2019). Stunted microbiota and opportunistic pathogen colonization in caesarean-section birth. *Nature*, 574(7776), Article 7776. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1560-1>
- Sharma, H., Tal, R., Clark, N. A., & Segars, J. H. (2014). Microbiota and Pelvic Inflammatory Disease. *Seminars in Reproductive Medicine*, 32(1), 43–49. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1361822>
- Silva, T. C. da, Martins Neto, C., Carvalho, C. A. de, Viola, P. C. de A. F., Rodrigues, L. dos S., & Oliveira, B. L. C. A. de. (2022). Risco nutricional e cardiovascular em idosos quilombolas. *Ciência & Saúde Coletiva*, 27(1), 219–230. <https://doi.org/10.1590/1413-81232022271.30132020>
- Silva, I. P., Oliveira, J. R. S. de, Santos, B. S. dos, Fonseca, C. S. M. da, & Lima, V. L. de M. (2021). Principais fatores relacionados ao risco cardiovascular de Populações Indígenas do Brasil. *Research, Society and Development*, 10(9), e38610918254. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i9.18254>

- Silva, Y. P., Bernardi, A., & Frozza, R. L. (2020). The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Frontiers in Endocrinology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00025>
- Smith, P. M., Howitt, M. R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C. A., Bohlooly-Y, M., Glickman, J. N., & Garrett, W. S. (2013). The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science (New York, N.Y.)*, 341(6145), 569–573. <https://doi.org/10.1126/science.1241165>
- Smits, S. A., Leach, J., Sonnenburg, E. D., Gonzalez, C. G., Lichtman, J. S., Reid, G., Knight, R., Manjurano, A., Chagalucha, J., Elias, J. E., Dominguez-Bello, M. G., & Sonnenburg, J. L. (2017). Seasonal cycling in the gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers of Tanzania. *Science*, 357(6353), 802–805. <https://doi.org/10.1126/science.aan4834>
- Sonnenburg, E. D., Smits, S. A., Tikhonov, M., Higginbottom, S. K., Wingreen, N. S., & Sonnenburg, J. L. (2016). Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. *Nature*, 529(7585), 212–215. <https://doi.org/10.1038/nature16504>
- Sonnenburg, E. D., & Sonnenburg, J. L. (2019). The ancestral and industrialized gut microbiota and implications for human health. *Nature Reviews. Microbiology*, 17(6), 383–390. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0191-8>
- Sonnenburg, J. L., & Sonnenburg, E. D. (2019). Vulnerability of the industrialized microbiota. *Science*, 366(6464). <https://doi.org/10.1126/science.aaw9255>
- Souza Filho, Z. A. de, Ferreira, A. A., Santos, B. dos, Pierin, A. M. G., Souza Filho, Z. A. de, Ferreira, A. A., Santos, B. dos, & Pierin, A. M. G. (2015). Hypertension prevalence among indigenous populations in Brazil: A systematic review with meta-analysis. *Revista Da Escola de Enfermagem Da USP*, 49(6), 1012–1022. <https://doi.org/10.1590/S0080-623420150000600019>

- Sprockett, D. D., Martin, M., Costello, E. K., Burns, A., Holmes, S. P., Gurven, M., & Relman, D. A. (2019). Microbiota Assembly, Structure, and Dynamics Among Tsimane Horticulturalists of the Bolivian Amazon. *BioRxiv*, 779074. <https://doi.org/10.1101/779074>
- Sprockett, D., Fukami, T., & Relman, D. A. (2018). Role of priority effects in the early-life assembly of the gut microbiota. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.173>
- Suez, J., Korem, T., Zeevi, D., Zilberman-Schapira, G., Thaïss, C. A., Maza, O., Israeli, D., Zmora, N., Gilad, S., Weinberger, A., Kuperman, Y., Harmelin, A., Kolodkin-Gal, I., Shapiro, H., Halpern, Z., Segal, E., & Elinav, E. (2014). Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*, 514(7521), Article 7521. <https://doi.org/10.1038/nature13793>
- Tamburini, S., Shen, N., Wu, H. C., & Clemente, J. C. (2016). The microbiome in early life: Implications for health outcomes. *Nature Medicine*, 22(7), 713–722. <https://doi.org/10.1038/nm.4142>
- The Human Microbiome Project. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207–214. <https://doi.org/10.1038/nature11234>
- The Human Microbiome Project Consortium. (2012). A framework for human microbiome research. *Nature*, 486(7402), 215–221. <https://doi.org/10.1038/nature11209>
- Timmerman, H. M., Rutten, N. B. M. M., Boekhorst, J., & Saulnier, D. M. (2017). Intestinal colonisation patterns in breastfed and formula-fed infants during the first 12 weeks of life reveal sequential microbiota signatures. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08268-4>
- Tindall, A. M., Petersen, K. S., & Kris-Etherton, P. M. (2018). Dietary Patterns Affect the Gut Microbiome-The Link to Risk of Cardiometabolic Diseases. *The Journal of Nutrition*, 148(9), 1402–1407. <https://doi.org/10.1093/jn/nxy141>

- Tito, R. Y., Knights, D., Metcalf, J., Obregon-Tito, A. J., Cleeland, L., Najjar, F., Roe, B., Reinhard, K., Sobolik, K., Belknap, S., Foster, M., Spicer, P., Knight, R., & Lewis, C. M. (2012). Insights from Characterizing Extinct Human Gut Microbiomes. *PLoS ONE*, 7(12), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051146>
- Tun, H. M., Konya, T., Takaro, T. K., Brook, J. R., Chari, R., Field, C. J., Guttman, D. S., Becker, A. B., Mandhane, P. J., Turvey, S. E., Subbarao, P., Sears, M. R., Scott, J. A., Kozyrskyj, A. L., Sears, M. R., Subbarao, P., Anand, S. S., Azad, M., Becker, A. B., ... the CHILD Study Investigators. (2017). Exposure to household furry pets influences the gut microbiota of infants at 3–4 months following various birth scenarios. *Microbiome*, 5(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0254-x>
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122), Article 7122. <https://doi.org/10.1038/nature05414>
- Tyakht, A. V., Kostryukova, E. S., Popenko, A. S., Belenikin, M. S., Pavlenko, A. V., Larin, A. K., Karpova, I. Y., Selezneva, O. V., Semashko, T. A., Ospanova, E. A., Babenko, V. V., Maev, I. V., Cheremushkin, S. V., Kucheryavyy, Y. A., Shcherbakov, P. L., Grinevich, V. B., Efimov, O. I., Sas, E. I., Abdulkhakov, R. A., ... Alexeev, D. G. (2013). Human gut microbiota community structures in urban and rural populations in Russia. *Nature Communications*, 4(2469), 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms3469>
- United Nations Department of Economic and Social Affairs. (2022). *World Population Prospects 2022: Summary of Results* (UN DESA/POP/2022/TR/NO. 3.).
- Ursell, L. K., Metcalf, J. L., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2013). Defining the Human Microbiome. *Nature Reviews*, 70(Suppl 1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00493.x>.Defining
- Vangay, P., Johnson, A. J., Ward, T. L., Al-Ghalith, G. A., Shields-Cutler, R. R., Hillmann, B. M., Lucas, S. K., Beura, L. K., Thompson, E. A., Till, L. M., Batres, R., Paw, B.,

- Pergament, S. L., Saenyakul, P., Xiong, M., Kim, A. D., Kim, G., Masopust, D., Martens, E. C., ... Knights, D. (2018). US Immigration Westernizes the Human Gut Microbiome. *Cell*, 175(4), 962-972.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.029>
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huson, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., Chen, L., ... Zhu, X. (2001). The sequence of the human genome. *Science (New York, N.Y.)*, 291(5507), 1304–1351. <https://doi.org/10.1126/science.1058040>
- Villarino, N. F., LeCleir, G. R., Denny, J. E., Dearth, S. P., Harding, C. L., Sloan, S. S., Gribble, J. L., Campagna, S. R., Wilhelm, S. W., & Schmidt, N. W. (2016). Composition of the gut microbiota modulates the severity of malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(8), 2235–2240. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504887113>
- Virgin, H. W. (2014). The Virome in Mammalian Physiology and Disease. *Cell*, 157(1), 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.032>
- Vrieze, A., Van Nood, E., Holleman, F., Salojärvi, J., Kootte, R. S., Bartelsman, J. F. W. M., Dallinga-Thie, G. M., Ackermans, M. T., Serlie, M. J., Oozeer, R., Derrien, M., Druesne, A., Van Hylckama Vlieg, J. E. T., Bloks, V. W., Groen, A. K., Heilig, H. G. H. J., Zoetendal, E. G., Strees, E. S., de Vos, W. M., ... Nieuwdorp, M. (2012). Transfer of Intestinal Microbiota From Lean Donors Increases Insulin Sensitivity in Individuals With Metabolic Syndrome. *Gastroenterology*, 143(4), 913-916.e7. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.06.031>
- Wampach, L., Heintz-Buschart, A., Hogan, A., Muller, E. E. L., Narayanasamy, S., Laczny, C. C., Hugerth, L. W., Bindl, L., Bottu, J., Andersson, A. F., de Beaufort, C., & Wilmes, P. (2017). Colonization and succession within the human gut microbiome by archaea, bacteria, and microeukaryotes during the first year of life. *Frontiers in Microbiology*, 8(738). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00738>

- Wang, J., Gao, Y., & Zhao, F. (2016). Phage-bacteria interaction network in human oral microbiome. *Environmental Microbiology*, 18(7), 2143–2158. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12923>
- Wang, J., & Jia, H. (2016). Metagenome-wide association studies: Fine-mining the microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 14(8), 508–522. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.83>
- Wang, J., Thingholm, L. B., Skiecevičienė, J., Rausch, P., Kummén, M., Hov, J. R., Degenhardt, F., Heinsen, F.-A., Rühlemann, M. C., Szymczak, S., Holm, K., Esko, T., Sun, J., Pricop-Jeckstadt, M., Al-Dury, S., Bohov, P., Bethune, J., Sommer, F., Ellinghaus, D., ... Franke, A. (2016). Genome-wide association analysis identifies variation in vitamin D receptor and other host factors influencing the gut microbiota. *Nature Genetics*, 48(11), 1396–1406. <https://doi.org/10.1038/ng.3695>
- Wang, Z., Klipfell, E., Bennett, B. J., Koeth, R., Levison, B. S., Dugar, B., Feldstein, A. E., Britt, E. B., Fu, X., Chung, Y. M., Wu, Y., Schauer, P., Smith, J. D., Allayee, H., Tang, W. H. W., Didonato, J. A., Lusi, A. J., & Hazen, S. L. (2011). Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*, 472(7341), 57–65. <https://doi.org/10.1038/nature09922>
- Warinner, C., Speller, C., Collins, M. J., & Lewis, C. M. (2015). Ancient human microbiomes. *Journal of Human Evolution*, 0, 125–136. <https://doi.org/10.1016/j.jhevol.2014.10.016>
- Wei, M., Huang, F., Zhao, L., Zhang, Y., Yang, W., Wang, S., Li, M., Han, X., Ge, K., Qu, C., Rajani, C., Xie, G., Zheng, X., Zhao, A., Bian, Z., & Jia, W. (2020). A dysregulated bile acid-gut microbiota axis contributes to obesity susceptibility. *EBioMedicine*, 55, 102766. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102766>
- Welch, J. R., Ferreira, A. A., Santos, R. V., Gugelmin, S. A., Werneck, G., & Coimbra, C. E. A. (2009). Nutrition Transition, Socioeconomic Differentiation, and Gender Among

- Adult Xavante Indians, Brazilian Amazon. *Human Ecology*, 37(1), 13–26.
<https://doi.org/10.1007/s10745-009-9216-7>
- Winglee, K., Howard, A. G., Sha, W., Gharaibeh, R. Z., Liu, J., Jin, D., Fodor, A. A., & Gordon-Larsen, P. (2017). Recent urbanization in China is correlated with a Westernized microbiome encoding increased virulence and antibiotic resistance genes. *Microbiome*, 5(1), 121. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0338-7>
- Wisniewski, P. J., Dowden, R. A., & Campbell, S. C. (2019). Role of Dietary Lipids in Modulating Inflammation through the Gut Microbiota. *Nutrients*, 11(1).
<https://doi.org/10.3390/nu11010117>
- Yang, T.-W., Lee, W.-H., Tu, S.-J., Huang, W.-C., Chen, H.-M., Sun, T.-H., Tsai, M.-C., Wang, C.-C., Chen, H.-Y., Huang, C.-C., Shiu, B.-H., Yang, T.-L., Huang, H.-T., Chou, Y.-P., Chou, C.-H., Huang, Y.-R., Sun, Y.-R., Liang, C., Lin, F.-M., ... Lin, C.-C. (2019). Enterotype-based Analysis of Gut Microbiota along the Conventional Adenoma-Carcinoma Colorectal Cancer Pathway. *Scientific Reports*, 9(1), 10923.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-45588-z>
- Yatsunenko, T., Rey, F., Manary, M., Trehan, I., Dominguez-Bello, M., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Robert, N., Kuczynski, J., Caporaso, J. G., Lozupone, C. A., & Lauber, C. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486(7402), 222–227. <https://doi.org/10.1038/nature11053>. Human
- Zhang, J., Guo, Z., Lim, A. A. Q., Zheng, Y., Koh, E. Y., Ho, D., Qiao, J., Huo, D., Hou, Q., Huang, W., Wang, L., Javzandulam, C., Narangerel, C., Jirimutu, Menghebilige, Lee, Y.-K., & Zhang, H. (2014). Mongolians core gut microbiota and its correlation with seasonal dietary changes. *Scientific Reports*, 4. <https://doi.org/10.1038/srep05001>
- Zhang, L., Liu, Y., Zheng, H. J., & Zhang, C. P. (2020). The Oral Microbiota May Have Influence on Oral Cancer. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00476>

- Zhang, X., Shen, D., Fang, Z., Jie, Z., Qiu, X., Zhang, C., Chen, Y., & Ji, L. (2013). Human Gut Microbiota Changes Reveal the Progression of Glucose Intolerance. *PLOS ONE*, 8(8), e71108. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071108>
- Zhao, S., Lieberman, T. D., Poyet, M., Kauffman, K. M., Gibbons, S. M., Groussin, M., Xavier, R. J., & Alm, E. J. (2019). Adaptive Evolution within Gut Microbiomes of Healthy People. *Cell Host & Microbe*. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.03.007>
- Zhou, W., Sailani, M. R., Contrepois, K., Zhou, Y., Ahadi, S., Leopold, S. R., Zhang, M. J., Rao, V., Avina, M., Mishra, T., Johnson, J., Lee-McMullen, B., Chen, S., Metwally, A. A., Tran, T. D. B., Nguyen, H., Zhou, X., Albright, B., Hong, B.-Y., ... Snyder, M. (2019). Longitudinal multi-omics of host–microbe dynamics in prediabetes. *Nature*, 569(7758), 663–671. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1236-x>
- Zmora, N., Suez, J., & Elinav, E. (2019). You are what you eat: Diet, health and the gut microbiota. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 16(1), 35–56. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0061-2>

9. ANEXOS

9.1. Doutorado Sanduíche



9.2. Artigos publicados no período

Schaan et al. *BMC Evolutionary Biology* (2020) 20:15
<https://doi.org/10.1186/s12867-020-1579-9>

BMC Evolutionary Biology

RESEARCH ARTICLE

Open Access

New insights on intercontinental origins of paternal lineages in Northeast Brazil



Ana Paula Schaan¹, Leonor Cusmão⁴, Juliana Jannuzzi², Antonio Modesto³, Marcos Amador¹, Diego Marques¹, Silva Helena Rapenhorst¹, Raquel Moncenogro¹, Thayson Lopes⁵, Franco Keiko Yoshida⁶, Giovanni Pinto⁵, Sidney Santos¹, Lorena Costa⁵, Vivan Silveira² and Andrea Ribeiro-dos-Santos^{1,2*} 

Abstract

Background: The current Brazilian population is the product of centuries of admixture between intercontinental founding groups. Although previous results have revealed a heterogeneous distribution of mitochondrial lineages in the Northeast region, the most targeted by foreign settlers during the sixteenth century, little is known about the paternal ancestry of this particular population. Considering historical records have documented a series of territorial invasions in the Northeast by various European populations, we aimed to characterize the male lineages found in Brazilian individuals in order to discover to what extent these migrations have influenced the present-day gene pool. Our approach consisted of employing four hierarchical multiplex assays for the investigation of 45 unique event polymorphisms in the non-recombining portion of the Y-chromosome of 280 unrelated men from several Northeast Brazilian states.

Results: Primary multiplex results allowed the identification of six major haplogroups, four of which were screened for downstream SNPs and enabled the observation of 19 additional lineages. Results reveal a majority of Western European haplogroups, among which R1b-S116⁺ was the most common (63.9%), corroborating historical records of colonizations by Iberian populations. Nonetheless, *F_{ST}* genetic distances show similarities between Northeast Brazil and several other European populations, indicating multiple origins of settlers. Regarding Native American ancestry, our findings confirm a strong sexual bias against such haplogroups, which represented only 2.5% of individuals, highly contrasting previous results for maternal lineages. Furthermore, we document the presence of several Middle Eastern and African haplogroups, supporting a complex historical formation of this population and highlighting its uniqueness among other Brazilian regions.

Conclusions: We performed a comprehensive analysis of the major Y-chromosome lineages that form the most dynamic migratory region from the Brazilian colonial period. This evidence suggests that the ongoing entry of European, Middle Eastern, and African males in the Brazilian Northeast, since at least 500 years, was significantly responsible for the present-day genetic architecture of this population.

Keywords: Y-SNPs, Population genetics, Genetic ancestry, Asymmetric colonization, Admixed population

Background

Present-day Brazilians are the result of centuries of admixture between three main ethnic groups, namely Native

Americans, Europeans and Africans (1). As the first colonizers of the American continent, Amerindians arrived via Bering Strait and reached Brazilian territory during the late Pleistocene (2). Later, the European component of the Brazilian colonization had an important impact on the composition of the current-day populations.

Besides Portuguese settlers, other European groups also invaded or populated the country, such as Spanish, Dutch, French, English, Italian, German, Middle-Eastern and Japanese populations. Most of these settlements

* Correspondence: aschaan@lccp.ufrpe.br

¹Ana Paula Schaan and Leonor Cusmão contributed equally to this work. ²Human and Medical Genetics Laboratory, Federal University of Pernambuco, Augusto Coutinho, Colégio Universitário Prof. José Silveira Neto, Jaraguá, Recife, PE 50740-900, Brazil
³Institute for Oncology Research, Federal University of Rio de Janeiro, PA 63075-005, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



Review

A Cell's Fate: An Overview of the Molecular Biology and Genetics of Apoptosis

Giovanna C. Cavalcante ¹, Ana Paula Schaan ¹, Gleyce Fonseca Cabral ¹,
Mayara Natália Santana-da-Silva ¹, Pablo Pinto ^{1,2}, Amanda T. Vidal ^{1,2} and
Ândrea Ribeiro-dos-Santos ^{1,2,*}

¹ Laboratório de Genética Humana e Médica, Universidade Federal do Pará, Belém 66075-110, PA, Brazil

² Núcleo de Pesquisas em Oncologia, Universidade Federal do Pará, Belém 66073-005, PA, Brazil

* Correspondence: akelyufpa@gmail.com; Tel.: +55-913-201-7843

Received: 3 July 2019; Accepted: 17 July 2019; Published: 24 August 2019



Abstract: Apoptosis is one of the main types of regulated cell death, a complex process that can be triggered by external or internal stimuli, which activate the extrinsic or the intrinsic pathway, respectively. Among various factors involved in apoptosis, several genes and their interactive networks are crucial regulators of the outcomes of each apoptotic phase. Furthermore, mitochondria are key players in determining the way by which cells will react to internal stress stimuli, thus being the main contributor of the intrinsic pathway, in addition to providing energy for the whole process. Other factors that have been reported as important players of this intricate molecular network are miRNAs, which regulate the genes involved in the apoptotic process. Imbalance in any of these mechanisms can lead to the development of several illnesses, hence, an overall understanding of these processes is essential for the comprehension of such situations. Although apoptosis has been widely studied, the current literature lacks an updated and more general overview on this subject. Therefore, here, we review and discuss the mechanisms of apoptosis, highlighting the roles of genes, miRNAs, and mitochondria involved in this type of cell death.

Keywords: regulated cell death; apoptosis; mitochondria; miRNAs; genetics

1. Introduction

The mechanisms underlying cell death and survival have a great impact on maintaining cellular balance, such that their deregulation may lead to the development of various diseases, such as multiple types of cancer and neurodegenerative disorders [1,2]. The classifications about cell death modalities depend mainly on morphological and structural details of individual tissues and cells [3]. Among the different types of cell death, apoptosis stands out as one of the most widely studied in the past years. Still, only a few articles provide a general and descriptive overview of apoptosis.

Apoptosis is a normal mechanism that can occur at any stage of the individual's development or upon cell damage, and is marked by the following characteristics: Protein cleavage (occurring mainly by the activation of cysteine proteases known as caspases), nuclear DNA breakdown, and apoptotic cell recognition by phagocytic cells [4]. These processes are responses to internal (intrinsic or mitochondrial) or external (extrinsic pathway or death receptors, DR) stimuli to the cell, converging in the final stage, known as the apoptotic execution phase (Figure 1).

There are many intricate aspects to both apoptotic pathways and the numerous molecules involved in their mechanisms. The study of the apoptotic pathway has shown to be a great approach in the search for new anticancer therapy, since promising compounds that trigger apoptosis are often non-toxic to healthy cells [5].



Review

Nuclear and Mitochondrial Genome, Epigenome and Gut Microbiome: Emerging Molecular Biomarkers for Parkinson's Disease

Gleyce Fonseca Cabral ¹, Ana Paula Schaan ¹, Giovanna C. Cavalcante ¹, Camille Sena-dos-Santos ¹, Tatiane Piedade de Souza ¹, Natacha M. Souza Port's ², Jhully Azevedo dos Santos Pinheiro ¹, Ândrea Ribeiro-dos-Santos ^{1,3,4,*} and Amanda F. Vidal ^{1,4,5,*}



Citation: Fonseca Cabral, G.; Schaan, A.P.; Cavalcante, G.C.; Sena-dos-Santos, C.; de Souza, T.P.; Souza Port's, N.M.; dos Santos Pinheiro, J.A.; Ribeiro-dos-Santos, Â.; Vidal, A.F. Nuclear and Mitochondrial Genome, Epigenome and Gut Microbiome: Emerging Molecular Biomarkers for Parkinson's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9839. <https://doi.org/10.3390/ijms22189839>

Academic Editors: Marcello Ciacchio and Luisa Agnello

Received: 2 June 2021
Accepted: 28 June 2021
Published: 11 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Laboratório de Genética Humana e Médica, Universidade Federal do Pará, R. Augusto Correa, Belém 66075-110, Brazil; cabralffg@gmail.com (G.F.C.); apschaan@gmail.com (A.P.S.); giovannacavalcante@gmail.com (G.C.C.); camillebiologia@gmail.com (C.S.-d.-S.); tati_souza14@outlook.com (T.P.d.S.); jhully.asp@gmail.com (J.A.d.S.P.)
 - ² Laboratório de Neurofarmacologia Molecular, Universidade de São Paulo, São Paulo 05508-000, Brazil; natachamports@gmail.com
 - ³ Núcleo de Pesquisas em Oncologia, Universidade Federal do Pará—R. dos Mundurucus, Belém 66073-000, Brazil
 - ⁴ Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Pará, R. Augusto Correa, Belém 66075-110, Brazil
 - ⁵ ITVDS—Instituto Tecnológico Vale Desenvolvimento Sustentável—R. Boaventura da Silva, Belém 66055-090, Brazil
- * Correspondence: akelyufpa@gmail.com (Â.R.-d.-S.); amandaferreiravidal@gmail.com (A.F.V.); Tel.: +55-(91)-3201-7843 (Â.R.-d.-S.)

Abstract: Background: Parkinson's disease (PD) is currently the second most common neurodegenerative disorder, burdening about 10 million elderly individuals worldwide. The multifactorial nature of PD poses a difficult obstacle for understanding the mechanisms involved in its onset and progression. Currently, diagnosis depends on the appearance of clinical signs, some of which are shared among various neurologic disorders, hindering early diagnosis. There are no effective tools to prevent PD onset, detect the disease in early stages or accurately report the risk of disease progression. Hence, there is an increasing demand for biomarkers that may identify disease onset and progression, as treatment-based medicine may not be the best approach for PD. Over the last few decades, the search for molecular markers to predict susceptibility, aid in accurate diagnosis and evaluate the progress of PD have intensified, but strategies aimed to improve individualized patient care have not yet been established. Conclusions: Genomic variation, regulation by epigenomic mechanisms, as well as the influence of the host gut microbiome seem to have a crucial role in the onset and progress of PD, thus are considered potential biomarkers. As such, the human nuclear and mitochondrial genome, epigenome, and the host gut microbiome might be the key elements to the rise of personalized medicine for PD patients.

Keywords: Parkinson's disease; neurodegeneration; genetics; non-coding RNAs; microbiome; mitochondria; epigenetics; biomarkers; precision medicine

1. Introduction

As life expectancy rises as a result of technological advances, humanity faces an increased burden of aging diseases, such as cancer, diabetes, cardiovascular and neurodegenerative disorders. Degenerative diseases affecting the nervous system are recognized as major causes of death and disabilities among the elderly population worldwide [1]. However, the molecular mechanisms engaged in the onset and progression of neurodegenerative diseases remain elusive. A complete understanding of the molecular biology of neurodegeneration will benefit the search for biomarkers to be employed in strategies for



Amazonia Seasons Have an Influence in the Composition of Bacterial Gut Microbiota of Mangrove Oysters (*Crassostrea gasar*)

Marcos Vinicius Reis Conceição^{1,2}, Sávio Souza Costa^{1,2}, Ana Paula Schaan³,
Ândrea Kely Campos Ribeiro-dos-Santos³, Artur Silva^{1,2}, Diego Assis das Graças^{1,2},
Maria Paula Cruz Schneider^{1,2} and Rafael Azevedo Baraúna^{1,2*}

¹ Laboratory of Genomics and Bioinformatics, Center of Genomics and Systems Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, Belém, Brazil, ² Laboratory of Biological Engineering, Guamá Science and Technology Park, Belém, Brazil, ³ Laboratory of Medical and Human Genetics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, Belém, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Andrés Moya,
University of Valencia, Spain

Reviewed by:

Daniel Martinez,
Imperial College London,
United Kingdom
Daniel A. Medina,
San Sebastián University, Chile

*Correspondence:

Rafael Azevedo Baraúna
rbarauna@ufpa.br

Specialty section:

This article was submitted to
Evolutionary and Genomic
Microbiology,
a section of the journal
Frontiers in Genetics

Received: 03 September 2020

Accepted: 17 December 2020

Published: 12 February 2021

Citation:

Conceição MVR, Costa SS,
Schaan AP, Ribeiro-dos-Santos ÁKC,
Silva A, das Graças DA,
Schneider MPC and Baraúna RA
(2021) Amazonia Seasons Have an
Influence in the Composition of
Bacterial Gut Microbiota of Mangrove
Oysters (*Crassostrea gasar*).
Front. Genet. 11:602608.
doi: 10.3389/fgene.2020.602608

The mangrove oysters (*Crassostrea gasar*) are molluscs native to the Amazonia region and their exploration and farming has increased considerably in recent years. These animals are farmed on beds built in the rivers of the Amazonia estuaries and, therefore, the composition of their microbiome should be directly influenced by environmental conditions. Our work aimed to evaluate the changes in bacterial composition of oyster's microbiota at two different seasons (rainy and dry). For this purpose, we amplified and sequenced the V3-V4 regions of the 16S rRNA gene. Sequencing was performed on the Illumina MiSeq platform. According to the rarefaction curve, the sampling effort was sufficient to describe the bacterial diversity in the samples. Alpha-diversity indexes showed that the bacterial microbiota of oysters is richer during the rainy season. This richness is possibly associated with the diversity at lower taxonomic levels, since the relative abundance of bacterial phyla in the two seasons remained relatively constant. The main phyla found include Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, and Proteobacteria. Similar results were found for the species *Crassostrea gigas*, *Crassostrea sikamea*, and *Crassostrea corteziensis*. Beta-diversity analysis showed that the bacterial composition of oyster's gut microbiota was quite different in the two seasons. Our data demonstrate the close relationship between the environment and the microbiome of these molluscs, reinforcing the need for conservation and sustainable management of estuaries in the Amazonia.

Keywords: mangrove oyster, oyster, oyster microbiota, Amazonia, *Crassostrea gasar*

INTRODUCTION

The phylum Mollusca is one of the largest and most important in the animal kingdom. From the six classes that make up the phylum, we can highlight the Bivalvia class, composed of about 7,500 species of soft-bodied animals protected by a shell, which acts as a skeleton for the connection of muscles and protects against predators (Gosling, 2003; Dame, 2011). Oysters are molluscs belonging to the *Ostreidae* family found in various marine and estuarine environments around the globe (Dame, 2011).