

Michelle Guzmán de Fernandes

Microbiota associada a esponjas marinhas e de água doce: diversidade e composição da comunidade procariótica podem trazer pistas sobre a importância do microbioma na ocupação de novos habitats

Microbiota associated with marine and freshwater sponges: diversity and composition of the prokaryotic community may provide clues about the importance of the microbiome in the occupation of new habitats

São Paulo
2024

Michelle Guzmán de Fernandes

Microbiota associada a esponjas marinhas e de água doce: diversidade e composição da comunidade procariótica podem trazer pistas sobre a importância do microbioma na ocupação de novos habitats

Microbiota associated to marine and freshwater sponges: diversity and composition of the prokaryotic community may provide clues about the importance of the microbiome in the occupation of new habitats

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Fisiologia Geral.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Reis Custódio
Coorientadora: Dra. Cristiane Cassiolato Pires Hardoim

São Paulo
2024

Ficha catalográfica

Fernandes, Michelle Guzmán de

Microbiota associada a esponjas marinhas e de água doce: diversidade e composição da comunidade procariótica podem trazer pistas sobre a importância do microbioma na ocupação de novos habitats / Michelle Guzmán de Fernandes; Márcio Reis Custódio - São Paulo, 2024

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia

1. Esponjas 2. Bactérias 3. Simbiose 4. Microbiota

I. Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Márcio Reis Custódio

A little Learning is a dang'rous thing;
Drink deep, or taste not the Pierian spring:
There shallow draughts intoxicate the brain,
And drinking largely sobers us again.
Fir'd at first sight with what the Muse imparts,
In fearless youth we tempt the heights of Arts,
While from the bounded level of our mind,
Short views we take, nor see the lengths behind;
But more advanc'd, behold with strange surprise
New distant scenes of endless science rise!

Alexander Pope (1688–1744), “A Little Learning”

Agradecimentos

Gostaria de expressar minha enorme gratidão por todas as pessoas que me acompanharam durante todo esse processo de aprendizado, crescimento e amadurecimento que foi o mestrado.

Agradeço pelo apoio incondicional e incentivo que sempre tive da minha família, em especial os meus pais. À minha mãe, que desde criança me incentivou a ser curiosa e admirar a natureza. Ao meu pai, que sempre foi um grande exemplo de estudo e dedicação e que inclusive contribuiu para o meu projeto fazendo coletas. À minha irmã, com quem sei que sempre posso contar quando preciso, seja para praticar uma apresentação ou compartilhar uma ideia nova.

Ao Prof. Márcio, meu orientador, por ter me apresentado o mundo das esponjas quando cheguei no laboratório ainda no primeiro ano da graduação e por ter me recebido com um “O céu é o limite!” quando falei que queria trabalhar com esponjas de água doce. Obrigada por confiar no meu trabalho e me incentivar a mergulhar numa área tão pouco explorada sem medo.

À minha coorientadora, Dr. Cristiane por toda a colaboração sem a qual esse trabalho não teria se concretizado, pela paciência em responder às inúmeras dúvidas que surgiram no caminho via whatsapp e por todas as dicas e conversas sobre a carreira acadêmica. Agradeço também ao Dr. Enrique pela ajuda nas etapas iniciais do projeto e pela paciência em ensinar e tirar dúvidas num momento em que eu ainda estava começando numa área completamente nova para mim. Ao nosso técnico Vagner, sempre salvando quando precisava de algum reagente ou equipamento e resolvendo qualquer problema com um pouco de gambiarra e muita criatividade!

Sou muito grata aos colegas de laboratório. Mari, por estar do meu lado desde o começo, me ensinando as primeiras coisas sobre o cultivo das bactérias. Liv, por também ter me ensinado várias coisas desde que cheguei no laboratório! Gabriel, por me salvar várias vezes quando eu empacava no meio das análises no R. Ainda te devo várias cervejas! Pri e Vini, pela companhia em coletas, prévias e momentos especiais do lab. Mais que tudo, sou grata pela amizade de vocês, pelo apoio sempre, pelas risadas e conversas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, processo 88887465142/2019-00 e também com a contribuição do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processos 2016/17189-7 e 2017/10157-5.

Índice

Resumo Geral	8
<i>Abstract</i>	9
Prefácio	10
Introdução	11
1.0. Simbiose: origem histórica e estabelecimento do conceito	11
1.1. Associações entre organismos como grande motor da evolução	15
1.2. Simbiose em esponjas, os primeiros holobiontes	21
1.3. Diversidade e estrutura da microbiota de esponjas	26
1.4. Funções da microbiota no contexto do holobionte esponja	31
1.5. Ocupação dos ambientes de água doce e o papel da microbiota nesse processo	40
Discussão Geral e Conclusões	48
Referências Bibliográficas	52

Resumo Geral

A simbiose tem sido objeto de estudos interdisciplinares desde o séc. XIX. Ao longo das décadas, descobertas feitas acerca das interações entre microbiota e hospedeiro levaram a mudanças de paradigma em diversas áreas, inclusive questionando o conceito de indivíduo e trazendo o conceito de holobionte como unidade ecológica e evolutiva. O fenômeno da simbiose tem se mostrado cada vez mais uma regra entre os organismos, tendo tido influência sobre grandes passos evolutivos como o surgimento da célula eucarionte, o aparecimento da multicelularidade e a diversificação das formas de vida. Esponjas são os metazoários mais basais, conhecidos pela diversidade e complexidade de suas microbiotas associadas. A relação simbiótica desses animais com microorganismos data de mais de 500 milhões de anos, tendo surgido previamente à irradiação do grupo e seu estabelecimento em diferentes ambientes. A colonização do ambiente de água doce pelas esponjas implicou numa série de adaptações às novas condições ambientais, incluindo possíveis alterações na interação com a microbiota. Neste trabalho a microbiota de esponjas marinhas e de água doce foi analisada através de *metabarcoding* e técnicas de cultivo e isolamento de cepas, com o objetivo de observar características na estrutura e composição desses microbiomas que possam nos fornecer pistas sobre como a colonização da água doce pode ter modificado as interações hospedeiro-microbiota em esponjas. Nossos resultados indicam a existência de uma microbiota compartilhada por indivíduos dos dois ambientes. Por outro lado, foi observada também a presença de associações específicas com grupos particulares sendo mais enriquecidos em cada ambiente. Além disso, a microbiota de esponjas de água doce se mostrou mais rica e diversa do que aquela de esponjas marinhas. Nossas observações também sugerem a existência de uma redundância funcional, com grupos distintos potencialmente exercendo funções análogas em esponjas marinhas e de água doce. Os resultados obtidos indicam que durante o processo de colonização da água doce, novos simbiossomas podem ter sido recrutados do ambiente, mas que de maneira geral o papel funcional da microbiota se manteve relativamente conservado. A análise de formas de reprodução assexuada de esponjas desses dois ambientes também nos possibilitou fazer a comparação com indivíduos adultos pela primeira vez. Foi observada uma grande similaridade entre esses microbiomas, com sinais de que o modo de transmissão que mais influencia a comunidade procariótica nessas estruturas seja a transmissão vertical.

Abstract

Symbiosis has been the subject of interdisciplinary studies since the 19th century. Over the decades, discoveries about the interactions between microbiota and host have led to paradigm shifts in various areas, questioning the concept of an individual and introducing the concept of the holobiont as an ecological and evolutionary unit. The phenomenon of symbiosis has increasingly been recognized as a rule instead of an exception among organisms. There is evidence of symbiosis influencing major evolutionary steps such as the emergence of eukaryotic cells, the advent of multicellularity, and the diversification of life forms. Sponges are the most basal metazoans, known for the diversity and complexity of their associated microbiomes. The symbiotic relationship between these animals and the microorganisms dates back over 500 million years, preceding the radiation of the group and its establishment in different environments. The colonization of freshwater environments by sponges involved a series of adaptations to new environmental conditions, including possible changes in the host-microbiome interactions. In this study, the microbiota of marine and freshwater sponges was analyzed using *metabarcoding* and culture-dependent techniques, with the objective to find characteristics in the structure and composition of these microbiomes that may provide insights into how freshwater colonization may have modified host-microbiota interactions in sponges. Our results indicate the existence of a shared microbiota present in individuals from both environments. On the other hand, specific associations with particular groups were also observed, with particular groups being enriched in different environments. Furthermore, the microbiome of freshwater sponges showed higher diversity and richness indices than that of marine sponges. Our observations also suggest the existence of functional redundancy, with distinct groups potentially performing analogous functions in marine and freshwater sponges. The results obtained here indicate that new symbionts may have been recruited from the environment during freshwater colonization, although functional roles of the microbiota seem to have remained relatively conserved. The analysis of the microbiome associated to asexual reproduction in sponges from these two environments also allowed us to compare them with adult individuals for the first time. A great similarity was observed between the microbiomes of adults and offspring, indicating that vertical transmission may be the main factor influencing the structure of the prokaryotic community.

Prefácio

As esponjas (filo Porifera) são metazoários basais, com origens entre 660 e 635 milhões de anos (Zumberge *et al.*, 2018). Uma das suas características marcantes é a presença de diversos microorganismos associados, em especial bactérias, as quais podem representar aproximadamente 40% do volume de um indivíduo (Vacelet & Donaday, 1977). Esta associação é fundamental para a sobrevivência do holobionte e a presença de um sistema imune nas esponjas, semelhante ao de organismos mais derivados, indica que ambos estão intimamente interligados fisiológica e evolutivamente. Um evento importante para esse grupo ocorreu quando esponjas de origem marinha colonizaram ambientes de água doce. Essa ocupação de um novo habitat acarretou em diversas modificações fisiológicas, potencialmente também afetando a microbiota associada às esponjas. No entanto, existem poucos estudos a respeito da microbiota de esponjas de água doce brasileiras e seus aspectos evolutivos são ainda inexplorados. Desta forma, este trabalho visa analisar as relações entre a microbiota presente em esponjas de água doce e esponjas pertencentes a um grupo ancestral marinho. O objetivo é comparar a composição e estrutura das suas comunidades procarióticas de modo a compreender como a ocupação da água doce pode ter moldado as relações hospedeiro-microbiota em poríferos. O trabalho está organizado em um primeiro capítulo trazendo uma revisão a respeito da temática e o estado da arte do conhecimento, um segundo em formato de manuscrito em inglês com os resultados obtidos, concluindo com uma discussão geral do que foi observado e trazendo perspectivas futuras.

Introdução

1.0. Simbiose: origem histórica e estabelecimento do conceito

Os primeiros estudos sobre simbiose tiveram início dentro das sociedades européias de pesquisas em ciências naturais por volta do séc. XIX, num período marcado pela efervescência de grandes teorias sociopolíticas as quais se inspiravam nas leis naturais para debater questões morais, econômicas e sociais. Na verdade, estudos etimológicos indicam que a palavra simbiose teria surgido dentro do contexto de estudos sociopolíticos para mais adiante ser incorporado na biologia (Gontier, 2016).

O termo simbiose como é conhecido dentro da Ecologia foi estabelecido por De Bary em 1878, como se tratando da associação próxima entre dois organismos distintos e com origens evolutivas diferentes (Carrapiço, 2010). Essa definição surgiu a partir de alguns dos primeiros estudos feitos separando a porção vegetal e fúngica de líquens e verificando que ambos realizam um papel fundamental nessas associações. Além disso, a observação da presença de cianobactérias associadas aos tecidos da planta aquática do gênero *Azolla* também contribuíram para a construção do conceito de simbiose (Carrapiço, 2015).

Em 1885, o botânico Albert Bernard Frank descreveu a interação entre fungos e raízes de plantas, introduzindo o conceito de micorriza pela primeira vez (Sapp, 2004). Nos dias atuais, esse tipo de associação é conhecido por estar presente em praticamente todas as plantas terrestres, beneficiando o hospedeiro através do fornecimento de nutrientes essenciais como nitrogênio, enquanto o fungo simbionte recebe compostos orgânicos produzidos pelo vegetal (Wang & Qiu, 2006). Bactérias fixadoras de nitrogênio associadas às raízes de leguminosas também foram foco de investigações desenvolvidas ao longo do século XX. Essas bactérias, hoje conhecidas pertencentes ao gênero *Rhizobium* tiveram sua relevância para a agricultura reconhecida pela primeira vez por Martinus Willem Beijerinck (1888), sucessor de De Bary nos estudos de simbiose (Tang, 2013). Mais adiante, o avanço nas técnicas de microscopia permitiu a observação das células vegetais e a descoberta dos cloroplastos. Schimper (1885) observou que essas organelas eram capazes de se multiplicar de forma semelhante a bactérias (Gontier, 2016). Mais adiante, Mereschkowsky (1905) observou a semelhança entre microalgas simbiontes encontradas dentro de organismos unicelulares, como amebas, e os plastídios presentes dentro de cianobactérias, sugerindo pela primeira vez que o fenômeno de simbiose poderia ocorrer de maneira intracelular e chamando-o de endossimbiose (Archibald, 2015).

Paralelamente aos estudos botânicos, em meados de 1880 foi confirmada pela primeira vez a presença de microorganismos associados ao intestino humano saudável (Shulman *et al.*, 2007). A partir daí, outros estudos conduzidos no século XX não só descreveram uma diversidade de bactérias intestinais, mas também levaram à conclusão de que a sua presença poderia ser favorável para a saúde humana (Lu, 2020). Nessa primeira fase dos estudos da simbiose, o papel dos microorganismos era considerado secundário em relação ao seu hospedeiro, que era visto como o agente principal da interação (Carrapiço, 2010). Com o tempo, a observação e entendimento dos diversos tipos de associações entre diferentes organismos possibilitou uma mudança de paradigma, no qual a simbiose passa a ter um papel central para o sucesso do conjunto hospedeiro-simbionte tanto nos aspectos fisiológicos e ecológicos, quanto no aspecto evolutivo.

Em meados dos anos 1990, novas descobertas, como o papel de lipopolissacarídeos (LPS) secretados por bactérias intestinais para a maturação do sistema imune, levaram a microbiota humana para um outro patamar de importância nos estudos ligados à saúde (Lu, 2020). Em seu trabalho, Bocci (1992) concluiu que o LPS secretado por bactérias da flora intestinal atuam como estímulo fisiológico, desencadeando a liberação de citocinas responsáveis por manter o sistema imunológico responsivo a ameaças patológicas. Além disso, este autor também especulou que esses mesmos estímulos poderiam ter papel importante no humor e sono, sendo um dos primeiros precursores dos estudos relacionando microbiota e saúde mental.

Trabalhos recentes têm mostrado cada vez mais que a influência da microbiota vai além da sua ação local. A interação entre as comunidades microbianas residentes e seus hospedeiros envolve uma complexa comunicação imunológica, química e neuronal e tem papel fundamental não só nos órgãos colonizados por esses microorganismos. Essas interações dinâmicas são capazes de moldar e influenciar o desenvolvimento e funcionamento de outros órgãos, inclusive o sistema nervoso, através da produção de metabólitos que agem no chamado eixo microbiota-intestino-cérebro, sendo capazes de modular a atividade do sistema nervoso central (Cryan *et al.*, 2019; Di Vincenzo *et al.*, 2023).

Um estudo realizado com camundongos verificou que animais desprovidos de microbiota endógena (*germ free*) apresentavam diferenças no desenvolvimento do sistema nervoso quando comparados a animais convencionais. Análises morfológicas e de marcadores transcricionais mostraram que o sistema nervoso de camundongos *germ free* apresentava células da microglia imaturas em abundância em diversas regiões. Além disso, foi verificado que a suplementação da alimentação desses camundongos com ácidos graxos

derivados de bactérias foi capaz de restaurar a morfologia e a função da microglia (Abdel-Haq *et al.*, 2019).

Alterações na microglia também já foram associadas a estresse, alterações comportamentais e doenças neurodegenerativas, sugerindo que os efeitos mediados pela microglia podem ser um fator importante no desenvolvimento de doenças neurológicas (Morais, 2019). Por outro lado, a sinalização imunológica via citocinas circulantes também tem se provado um fator importante no desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas como ansiedade e depressão. Essas citocinas podem tanto ser produzidas por células imunes localizadas no próprio sistema nervoso, quanto serem transportadas através da barreira hematoencefálica. Alguns artigos reportam que a microbiota intestinal é capaz de modular a permeabilidade dessa barreira através da alteração da expressão de proteínas do tipo *tight-junction*, aumentando a susceptibilidade do cérebro a moléculas circulantes no sangue, incluindo àquelas produzidas por microorganismos (Braniste *et al.*, 2014; Di Vincenzo *et al.*, 2023).

Mais recentemente, questões de saúde humana que por muito tempo foram consideradas idiopáticas, ou seja, de causas desconhecidas, como doenças autoimunes, obesidade, diabetes, câncer e doenças psiquiátricas, se tornaram alvo de estudos relacionados à microbiota humana (Morais *et al.*, 2021; Ortega *et al.*, 2023;). De maneira geral, esses estudos demonstraram que essas doenças podem ser desencadeadas como consequência de processos inflamatórios aberrantes resultantes de disbiose. O estado de disbiose é caracterizado pela alteração da estrutura da microbiota, podendo envolver a perda de microorganismos benéficos, redução da diversidade e a proliferação de potenciais patógenos, e está associada à ocorrência de doenças (Junca & Medina, 2022).

A alteração da microbiota saudável para uma microbiota desbalanceada e enriquecida em cepas potencialmente nocivas para o hospedeiro pode se dar devido a uma série de fatores, como mutações ocorrendo em associação a estímulos inflamatórios, que acabam levando a perturbações no funcionamento do sistema imune (Garrett, 2015). Mas da mesma forma com que a microbiota pode sofrer modificações nocivas para o hospedeiro, estudos têm mostrado que é possível modular a comunidade bacteriana de maneira a favorecer a saúde do hospedeiro (Vincenzo *et al.*, 2023). Um exemplo desse tipo de tratamento é o transplante de microbiota. Ele consiste na transferência de comunidades microbianas complexas obtidas a partir de doadores saudáveis para indivíduos que apresentem disbiose (Wang *et al.*, 2019). Um dos tipos mais estudados de transplante de microbiota é o transplante fecal, que consiste na modulação da microbiota intestinal por meio da administração de amostras fecais, seja por

meio de cápsula ou por técnicas como a colonoscopia. Esse tipo de tratamento se mostrou altamente eficaz para combater infecções persistentes pela bactéria *Clostridium difficile*, com taxas de resolução da doença (85%-89,7%) consideravelmente maiores que aquelas obtidas a partir de tratamento convencional com antibióticos (26%) (Cammara *et al.*, 2015). Além disso, um estudo clínico realizado com crianças com transtorno do espectro autista utilizando a técnica de transplante fecal obteve resultados promissores. Tanto sintomas gastrointestinais como constipação e dor abdominal, comuns em indivíduos neste espectro, quanto sintomas comportamentais característicos do transtorno tiveram melhora após o tratamento (Kang *et al.*, 2017).

Resultados como estes não só mostram a importância de estudos acerca da influência da microbiota humana para a compreensão de aspectos importantes dessas interações, como seu papel no desenvolvimento adequado e manutenção da saúde, mas também nos mostram quão complexa e arraigada esse tipo de simbiose pode ser. De fato, a extensa observação das interações entre diferentes tipos de organismos e suas comunidades microbianas culminou na construção de uma abordagem holística na qual o conceito de simbiose se torna uma peça central: a teoria do holobionte. Essa teoria substitui o conceito de organismos como unidades autônomas e independentes por uma nova visão, na qual o conjunto hospedeiro-microbiota representa a unidade funcional em nível anatômico, fisiológico e evolutivo (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2018).

O conceito foi sendo construído desde as primeiras publicações sobre endossimbiose no início do século XX, as quais propunham a origem da célula eucariótica a partir da junção de duas linhagens de células procarióticas diferentes (revisão em Kowallik & Martin, 2021). Outras publicações defendiam ainda a diversificação das formas de vida complexas a partir da associação de formas de vida mais simples (Meyer-Abich, 1943). Entretanto, a teoria do holobionte começou a despertar mais atenção a partir da publicação dos trabalhos de Lynn Margulis (Sagan¹, 1967; Margulis, 1971; Margulis & Fester, 1991). Os argumentos principais desses trabalhos se fundamentam na simbiogênese como fonte de inovação biológica; na junção de diferentes genomas como um dos mecanismos principais da endossimbiose e na endossimbiose como processo evolutivo complementar aos processos de mutação e seleção natural estabelecidos a partir das teorias neodarwinistas (Baedke *et al.*, 2020).

A partir dessas idéias principais, um novo campo de pesquisa se abriu e trabalhos acerca do tema “holobionte” se multiplicaram (Figura 1), possibilitando o surgimento de

¹ A autora Lynn Margulis publicou o artigo “*On the origin of mitosing cells*” ainda com o sobrenome “Sagan”, de seu primeiro casamento.

novas teorias que levaram o papel da simbiose mais além dentro do contexto evolutivo. Hoje existem diversos estudos que mostram evidências do papel crucial das associações simbióticas em passos evolutivos importantes para o desenvolvimento da vida até como a conhecemos hoje, como o surgimento da célula eucarionte, da multicelularidade e a diversificação das formas de vida (McFall-Ngai, 2001; Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008; López-García & Moreira, 2017).

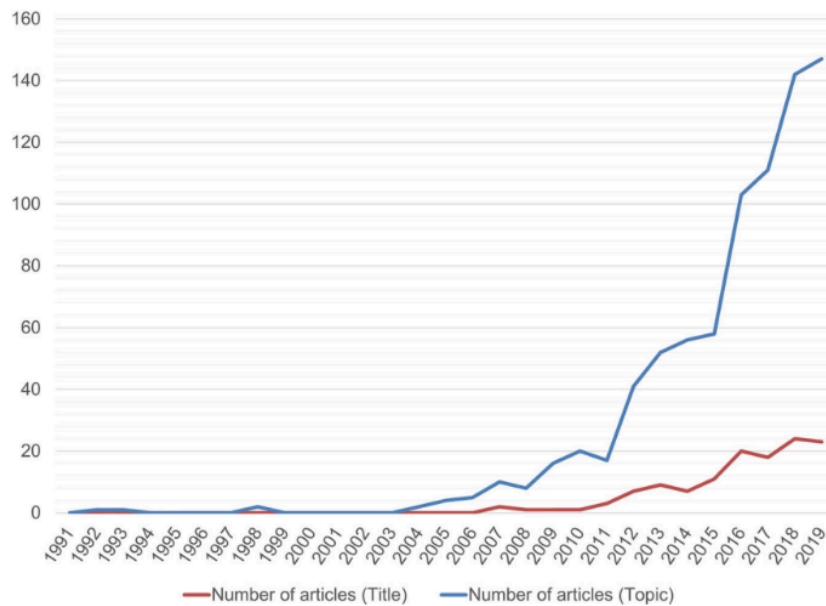


Figura 1: Número de ocorrências do termo “*holobiont*” no título ou como tópico do trabalho entre 1991 e 2019 (Baedke *et al.*, 2020)

1.1. Associações entre organismos como grande motor da evolução

Desde os primórdios da vida na Terra, na qual existiam apenas formas procarióticas, as interações entre células foram um importante direcionador da evolução. No cenário proposto pela teoria de Oparine-Haldane (Oparin, 1924; Haldane, 1929), condições físico-químicas favoráveis no oceano e atmosfera primitiva, juntamente com a ação da radiação solar, teriam favorecido a formação de moléculas orgânicas complexas. Mais adiante, a ação da radiação ultravioleta também teria favorecido o surgimento de moléculas capazes de se auto-replicar, as quais seriam predecessoras das primeiras formas de vida (Tirard, 2017). Os primeiros organismos unicelulares teriam então surgido nessa “sopa primordial” na qual compostos orgânicos complexos estavam prontamente disponíveis, fornecendo elementos essenciais para o metabolismo das primeiras formas de vida. Com a multiplicação dessas formas de vida, a gradual depleção desses compostos no ambiente levou

ao surgimento de uma pressão seletiva a qual favoreceu o surgimento de novas vias metabólicas (Fondi *et al.*, 2009). Com a diversificação do metabolismo, esses organismos passaram a secretar no ambiente subprodutos dos seus próprios metabolismos. Outros organismos, por sua vez, passaram a se favorecer do aproveitamento desses subprodutos disponíveis no ambiente.

Essa sequência de eventos está contida no modelo clássico de mutualismo baseado em subprodutos, o qual propõe a hipótese de evolução comunitária cooperativa. De acordo com esse modelo, num primeiro momento a liberação de subprodutos metabólicos no ambiente favoreceria outros organismos sem custo algum para ambos os lados. A partir daí, torna-se viável que vias redundantes mais complexas e dispendiosas sejam eliminadas, com o organismo passando a se tornar dependente daquele que fornece seus subprodutos, moldando as primeiras associações entre organismos unicelulares (Sachs & Hollowell, 2012). Esse co-aproveitamento de vias metabólicas e a perda de genes associados a funções vitais levaram a formação das primeiras comunidades complexas na forma de biofilmes. Essas estruturas são formadas a partir da associação de uma diversidade de organismos unicelulares com metabolismos variados (fotossintetizantes, heterótrofos anaeróbios e aeróbios, fermentadores e quimiolitautótrofos) organizados numa matriz extracelular (Guerrero *et al.*, 2002). Esses complexos ecossistemas funcionam de maneira altamente coordenada, com flutuações na expressão de genes ligados a diferentes tipos de metabolismo ao longo do dia e variação da composição da comunidade ao longo do gradiente de oxigênio resultante da estrutura do próprio biofilme (Guerrero & Berlanga, 2016). Um fator fundamental para o funcionamento coordenado dessas comunidades complexas é a integração mediada por mecanismos de comunicação celular. O *quorum sensing* (Figura 2) é um exemplo desses mecanismos presentes na comunicação intra e interespecífica. Se baseia na produção de moléculas sinalizadoras chamadas *autoinducers*, as quais afetam o comportamento celular apenas quando as células se encontram em altas densidades populacionais. Nessas condições, essas moléculas liberadas no ambiente atingem altas concentrações e se difundem de volta para o interior das células, podendo agir não só na sua própria auto regulação, mas também na expressão gênica de fatores importantes para o estabelecimento das interações entre células (Hooshangi & Bentley, 2008). Através desses mecanismos, células independentes são capazes de sincronizar sua expressão gênica a partir de pistas ambientais, favorecendo a formação de comunidades bacterianas complexas capazes de se intercomunicar e modular seus metabolismos apresentando um comportamento que se assemelha ao de organismos multicelulares (McFall-Ngai, 2001).

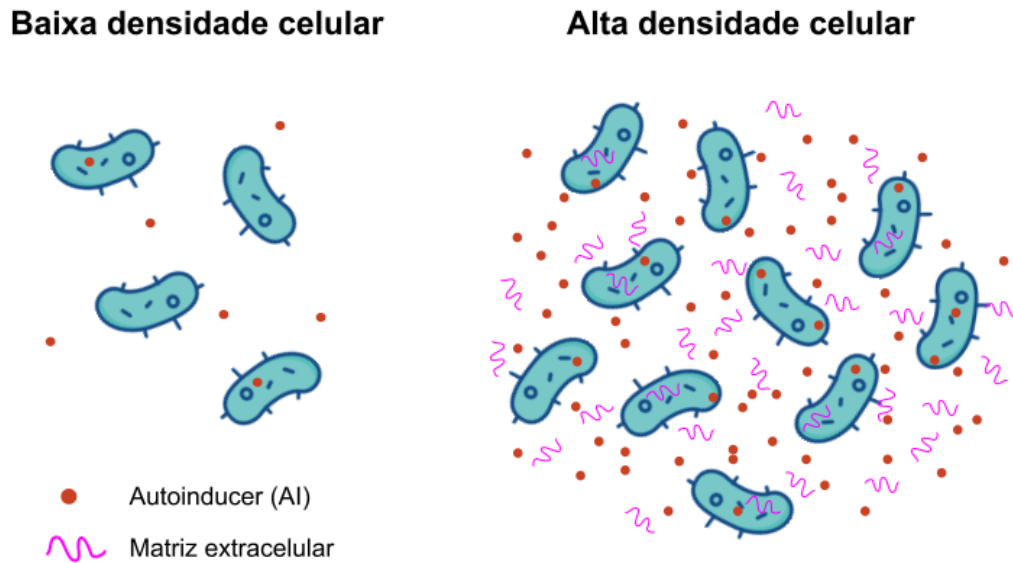


Figura 2: Mecanismos de ação do *quorum sensing*. Neste exemplo, em altas densidades celulares, o *autoinducer* desencadeia a expressão de genes ligados a produção de uma matriz extracelular.

A ocorrência dessas associações entre os organismos unicelulares favoreceu o estabelecimento de relações de interdependência cada vez mais complexas e, desta forma, as primeiras associações simbióticas. A partir de um tipo particular de simbiose, a endossimbiose, processo no qual o simbionte gradualmente perde grande parte do seu material genético e do seu maquinário celular para se tornar completamente dependente do hospedeiro, pode ter sido originada a primeira célula eucarionte (Archibald, 2015).

A teoria proposta por Margulis em seu trabalho “*On the origin of mitosing cells*” unifica teorias de simbiose e evolução, sugerindo uma hipótese para a origem da célula eucarionte: a eucariogênese por simbiogênese (Sagan, 1967). O trabalho de Margulis revisita o conceito de endossimbiose proposto no século início do séc. XX por Mereschkowsky (1905). No seu trabalho, a autora afirma que a célula eucarionte teria se formado a partir de processos endossimbióticos, tendo as mitocôndrias sido originadas a partir de alfa-proteobactérias e os cloroplastos a partir de cianobactérias (López-García *et al.*, 2017). Ao contrário do que ocorreu com trabalhos anteriores de outros autores, as idéias de Margulis ganharam grande destaque, uma vez que o avanço da microscopia eletrônica e de técnicas moleculares trouxe resultados que corroboraram com essas teorias. A revolução de sequenciamento molecular possibilitou observar que as sequências de rRNA derivadas de mitocôndrias e plastídios são mais próximas às de bactérias do que àquelas derivadas do rRNA nuclear, dando ainda mais suporte para a teoria, que se tornou um dos fundamentos da biologia moderna (Archibald, 2015).

Há evidências que mecanismos ligados à comunicação celular em associações simbióticas, como o *quorum sensing* mencionado anteriormente, também tenham tido um papel fundamental em mais um passo evolutivo importante: o surgimento da multicelularidade (McFall-Ngai, 2001). Estima-se que a organização multicelular tenha surgido em pelo menos 25 linhagens diferentes, tendo ocorrido múltiplas vezes em linhagens de bactérias, algas e fungos, mas apenas uma vez no reino animal (Bonner, 1998; Grosberg & Strathmann, 2007).

De fato, alguns organismos com fases de vida multicelulares existentes hoje se valem desses mecanismos. Este é o caso da ameba *Dictyostelium discoideum*, um exemplo de como mecanismos de comunicação celular fundamentais para o estabelecimento das primeiras associações entre diferentes organismos também podem ter sido importantes para o surgimento do comportamento multicelular. Esse protista apresenta alternância entre uma fase de vida livre unicelular e outra multicelular reprodutiva (Figura 3). Na primeira, células amebóides vagam independentemente até que o ambiente imponha desafios, como a escassez de alimento ou a diminuição da umidade do ambiente. Ao se deparar com essas condições desfavoráveis, as células independentes de *D. discoideum* passam a liberar AMP cíclico (cAMP) no ambiente. Essa molécula é capaz de induzir a migração e agregação das células próximas para a formação de uma estrutura multicelular móvel. Além disso, o cAMP também funciona como *autoinducer*, induzindo a expressão diferencial de genes de acordo com pistas ambientais e com a densidade celular atingida pelo estágio multicelular de vida (Dunn *et al.*, 2018).

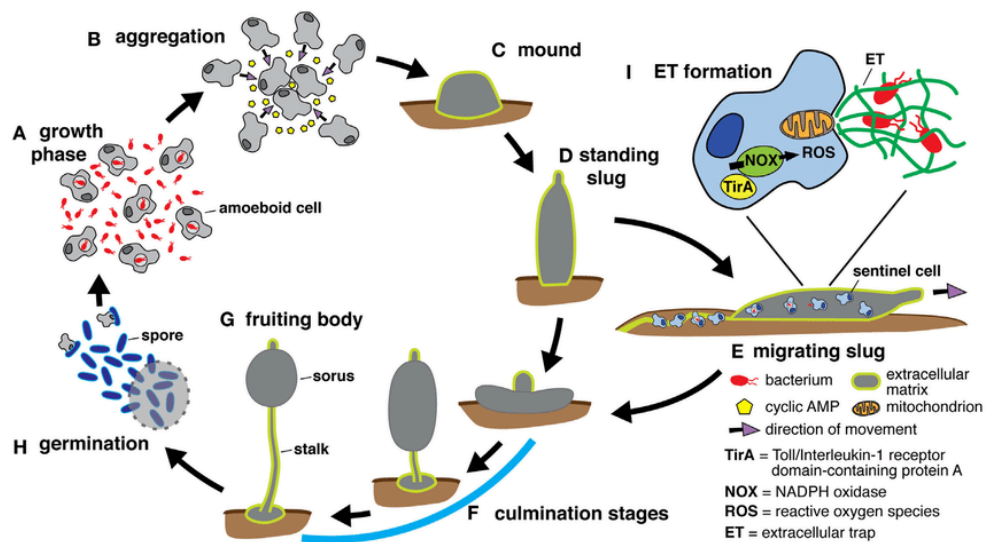


Figura 3: Ciclo de vida do *Dictyostelium discoideum* (Dunn *et al.*, 2018).

O estabelecimento da multicelularidade possibilitou novas formas de interação não só entre organismos multicelulares, mas entre o hospedeiro e seus simbioses. Os tecidos e cavidades que constituem os organismos multicelulares representam novos nichos disponíveis, com condições físico-químicas favoráveis e mais estáveis do que aquelas enfrentadas no ambiente externo (McFall-Ngai, 2001). Além disso, a possibilidade dos microorganismos associados se aproveitarem de subprodutos liberados pelo hospedeiro e vice-versa abrem caminhos para a formação de novos tipos de associações simbióticas.

Com a multiplicação das possibilidades dentro do universo de associações simbióticas, organismos com diferentes capacidades podem acabar se beneficiando mutuamente dessas interações que vão surgindo de maneira espontânea. Por outro lado, a perpetuação dessas novas relações e o estabelecimento de uma simbiose propriamente dita é determinada também por outros fatores como a perda de vias metabólicas redundantes e a seleção natural. Comparações entre os genomas de diferentes linhagens de holobiontes têm evidenciado que a perda de genes tem sido um processo evolutivo importante e contínuo (Bordenstein & Theis, 2015). Um exemplo marcante é o do aminoácido essencial triptofano. Reconstruções das vias enzimáticas para sua produção indicam existir apenas uma única origem anterior à divergência dos três grandes domínios da vida. Apesar da sua importância para o metabolismo, suas vias de produção, que requerem uma série de etapas enzimáticas complexas, acabaram sendo perdidas independentemente em diversos pontos da evolução em diferentes linhagens, incluindo todos os animais (Moran, 2007). Isso ocorre, pois processos evolutivos como mutação e eliminação de genes frequentemente favorecem a perda de vias mais complexas e mais custosas em termos energéticos quando a obtenção dos produtos dessas vias é possível a partir de fontes externas. Dessa maneira, a pressão da seleção natural sobre a manutenção dessas vias no metabolismo do hospedeiro se torna menor à medida que a relação de interdependência com os simbioses é reforçada.

A associação entre organismos representa, dessa forma, uma espécie de atalho evolutivo, no qual o hospedeiro multicelular é capaz de adquirir caracteres favoráveis num tempo evolutivo significativamente mais curto. Essas características muitas vezes levariam milhões de anos para serem obtidas a partir de mutações no genoma do próprio hospedeiro, seguidas de seleção ao longo de inúmeras gerações até o seu estabelecimento na linhagem. Por outro lado, propriedades intrínsecas dos microorganismos, como a passagem muito mais rápida de gerações e a transmissão lateral de genes permitem que vias metabólicas possam ser modificadas de maneira muito mais rápida, podendo significar um salto evolutivo no contexto do holobionte (Figura 4).

O estabelecimento de associações simbióticas permite não só a ocorrência de uma grande diversificação das formas de vida, mas também a ocupação de novos nichos. Um bom exemplo disso é a transição dos vegetais do ambiente aquático para o terrestre. Relações simbióticas como aquelas observadas em líquens e na micorriza de vegetais superiores teriam sido fundamentais para que a colonização desse novo ambiente fosse possível (Lipnicki, 2015). Esse tipo de associações favorece também o aumento da complexidade das formas de vida, possibilitando o surgimento de holobiontes com interações cada vez mais sofisticadas e altamente adaptadas para seus nichos.

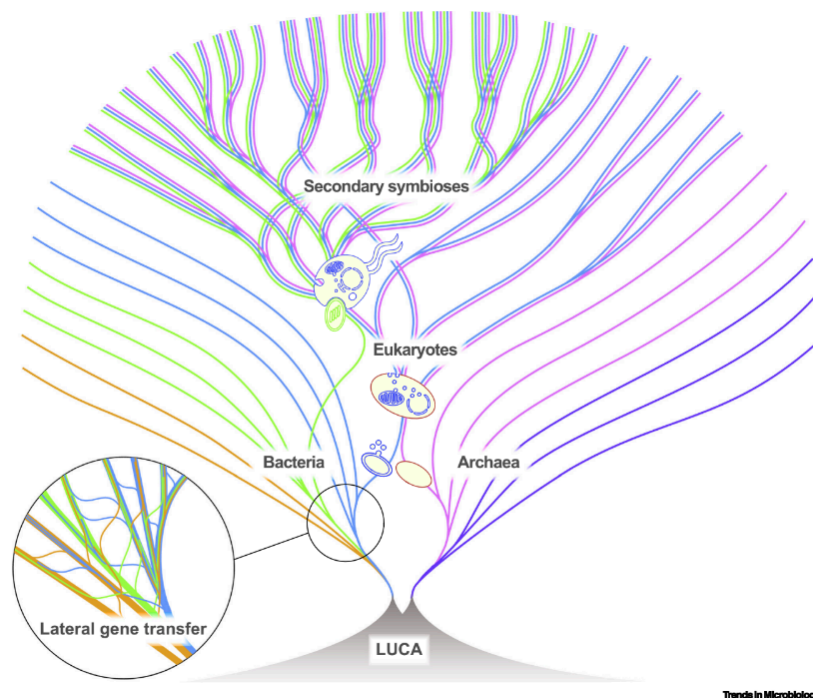


Figura 4: Esquema ilustrando a diversificação das formas de vida a partir de mecanismos ligados a associações simbióticas (Brunk & Martin, 2019).

Um exemplo clássico que ilustra bem o grau de complexidade que podem ser alcançados pelas associações simbióticas é o do cupim *Mastotermes darwinensis*. A dieta deste cupim é baseada no consumo de celulose, no entanto ele é incapaz de digerir esse polímero com o repertório de enzimas produzidas pelo seu próprio organismo. A digestão da celulose se dá, na verdade, dentro das células de ao menos seis espécies diferentes de protista parabasalídeos que habitam o intestino do cupim. Esses protistas, por sua vez, possuem seus próprios simbiontes. Uma das espécies mais estudadas é a *Mixotricha paradoxa*. Nela foram descritas seis espiroquetas do gênero *Treponema* e um bastonete do gênero *Bacteroides*, todos associados a porção externa da membrana celular de *M. paradoxa*, sendo responsáveis pela

locomoção desse protista (Konig *et al.*, 2007). Além disso, outros endossimbiontes também estão ligados a funções celulares como motilidade, respiração e digestão celular (Margulis, 1981).

Exemplos como esse evidenciam como a evolução por simbiogênese foi um fator importante em passos fundamentais para a história evolutiva da vida na Terra, atuando como ferramenta indispensável para a aquisição de novos genomas e vias metabólicas e como grande motor para a diversificação das formas de vida. Dessa forma, chegamos à conclusão que na verdade a simbiose seria um fator intrínseco a praticamente todas as formas de vida, sendo um fator importante a ser levado em conta ao estudarmos os organismos a partir dos mais diversos pontos de vista da Biologia.

Sabemos que a simbiose já estava presente desde o surgimento dos primeiros metazoários e que esta teve um papel fundamental em diversos passos evolutivos importantes para as mais diversas linhagens de organismos. O grupo ainda presente atualmente e que mais se aproxima dos animais nos quais se estabeleceram as primeiras relações simbióticas entre organismos multicelulares e microorganismos pertencem ao filo Porifera, popularmente conhecidos como esponjas. São os metazoários mais basais e além de ser o modelo mais próximo dos primeiros organismos multicelulares, são conhecidos por estabelecerem simbiose com comunidades complexas de microorganismos. Estudar essas associações pode nos dar pistas sobre como eram as primeiras formas de interação hospedeiro-microbiota durante a evolução da multicelularidade, além de possibilitar inferir como essas relações podem ter se modificado ao longo dos processos evolutivos pelos quais esses organismos passaram à medida que novas linhagens surgiram e novos ambientes foram colonizados.

1.2. Simbiose em esponjas, os primeiros holobiontes

Evidências paleontológicas e moleculares indicam os poríferos como animais mais basais entre os metazoários, com origens datando entre 660 e 635 milhões de anos (Zumberge *et al.*, 2018). Essas informações indicam que as esponjas teriam sido as formas de vida multicelulares dominantes durante um período de pelo menos 90 milhões de anos, antes da grande explosão do Cambriano, tendo sobrevivido a uma série de glaciações e grandes eventos de extinção até chegar aos dias atuais (Wang *et al.*, 2010). Atualmente o filo é composto por mais de 9600 espécies descritas (de Voogd *et al.*, 2023), as quais ocupam uma grande diversidade de ambientes. Esponjas marinhas estão distribuídas ao longo de todos os oceanos em recifes de corais, zonas abissais e sob o gelo dos oceanos polares (Figura 5)

(Simpson, 1984; Van Soest *et al.*, 2012). Além disso, existem também espécies de água doce que podem ser encontradas em lagos, rios e mesmo em corpos d'água intermitentes em desertos (Manconi & Pronzato, 2008).

O sucesso evolutivo desse grupo pode ser associado a uma estrutura corporal altamente eficiente, que possibilitou sua adaptação a diferentes habitats. Esses animais aquáticos, sésseis e filtradores, são conhecidos por sua morfologia aparentemente simples, com um arranjo corporal que se manteve altamente conservado ao longo da evolução (Boury-Esnault *et al.*, 2012). Uma esponja típica tem seu corpo formado por três porções: a pinacoderme, o mesohilo e a coanoderme (Figura 6). A pinacoderme, camada mais externa, representa a superfície de contato do animal com o ambiente. O mesohilo, camada intermediária, é formada por uma matriz extracelular onde se encontram células especializadas, fibras colágenas e/ou espículas, que podem ser calcárias, silicosas ou mesmo ausentes dependendo da espécie, numa estrutura organizada e funcional. Por último, a coanoderme é constituída por coanócitos, células flageladas agrupadas em câmaras coanocitárias na maioria das espécies, e que fazem parte de uma rede de canais, o sistema aquífero. O batimento dos flagelos dos coanócitos movimenta a água, que percorre o corpo da esponja transportando partículas e microorganismos, que são então filtrados e fagocitados pelos próprios coanócitos (Leys & Hill, 2012).

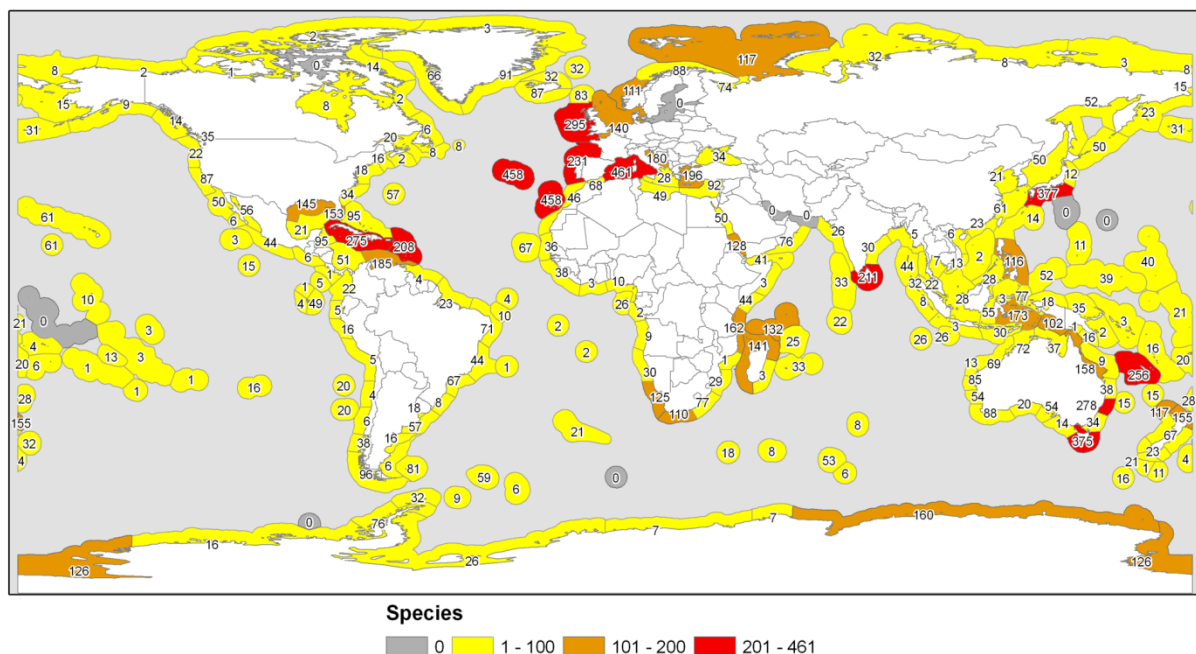


Figura 5: Distribuição das espécies descritas de esponjas marinhas ao redor do mundo (Van Soest *et al.*, 2012).

Além disso, um fator importante possibilitou não só que os poríferos enfrentassem os desafios impostos pelas modificações ambientais drásticas que ocorreram durante sua história evolutiva, mas também permitiu a ocupação de uma grande diversidade de ambientes: a associação com microorganismos. Estima-se que as primeiras destas relações tenham ocorrido no Pré-Cambriano, antes mesmo da irradiação das ordens de Porifera existentes hoje (Wilkinson, 1984). No oceano Proterozóico, a fonte de carbono orgânico mais abundante era o carbono dissolvido na coluna d'água e as concentrações de oxigênio eram baixas e instáveis. Nesse contexto, a associação das esponjas com microorganismos anaeróbios ou microaerofílicos pode ter sido fundamental para o seu sucesso evolutivo (Hoffman *et al.*, 2005). Além disso, o estabelecimento de novas relações simbióticas forneceu condições que contribuíram para que o holobionte respondesse de maneira mais rápida às mudanças ambientais, adaptando-se de maneira mais eficiente e flexível às condições ambientais que se modificaram diversas vezes ao longo da história geológica do planeta. O estudo de esponjas de diferentes ambientes tem fornecido evidências de uma série de adaptações, tanto no hospedeiro quanto nos simbiontes, que nos dão pistas de como essas relações foram moldadas ao longo da evolução do holobionte (Kulakova *et al.*, 2014; Diez-Vives, 2022; Pankey *et al.*, 2022).

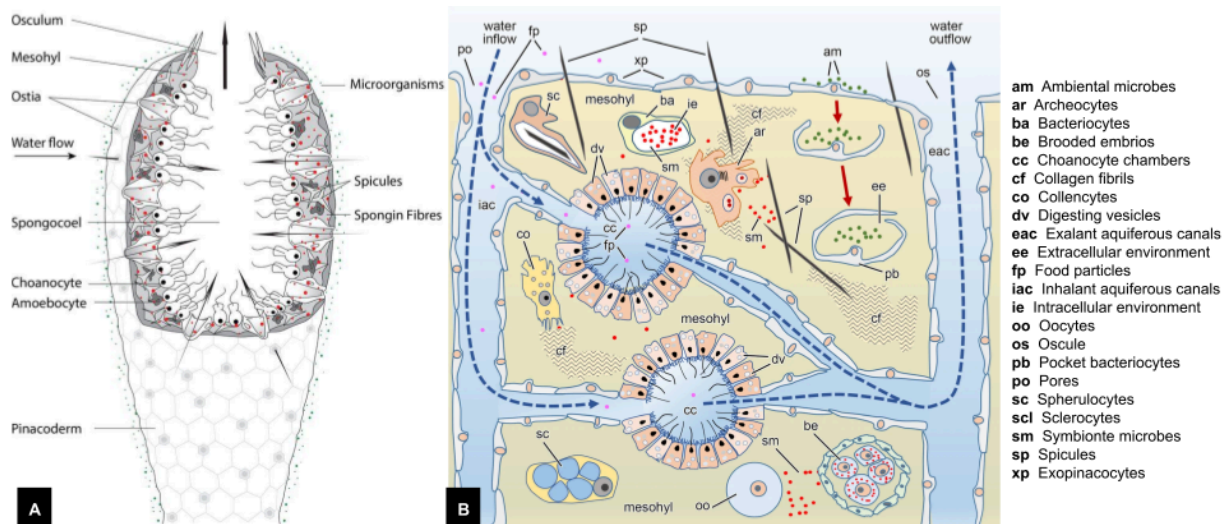


Figura 6: A - Visão geral do plano corporal básico de uma esponja asconóide (Webster *et al.*, 2016); B - esquema de corte transversal da parede do corpo de uma esponja leuconóide com detalhes da estrutura anatômica e tipos celulares (Carrier *et al.*, 2022)

Apesar de não possuírem órgãos ou sistemas definidos, esponjas apresentam uma série de mecanismos moleculares que permitem a discriminação entre próprio e não-próprio,

funcionando como o sistema imune inato de metazoários mais derivados (Custódio *et al.*, 2004). Um repertório complexo de genes permite a expressão de uma diversidade de receptores imunes como *Toll-like receptors* (TLRs) e *Nucleotide-binding domain and Leucine-rich Repeat* (NLR), os quais permitem o reconhecimento de padrões moleculares associados a microorganismos (*microbe-associated molecular patterns* - MAMPs) tanto patogênicos quanto simbioses (Wiens *et al.*, 2007; Diez-Vivez *et al.*, 2022). Os TLRs são proteínas transmembranas capazes de se ligar a uma variedade de MAMPs como lipopolissacarídeos, lipoproteínas, peptidoglicanos, etc. Os NLRs são encontrados intracelularmente no citosol e representam uma segunda linha de defesa contra potenciais patógenos que tenham evadido a digestão intracelular após a fagocitose (Yuen *et al.*, 2014). Esses mecanismos são responsáveis por responder ao grande influxo de microorganismos que entram no corpo das esponjas com a circulação constante de água pelos canais. Ao mesmo tempo, representa um desafio para os simbioses, que devem desenvolver formas de evadir o sistema imune para se estabelecer de forma estável dentro de seu hospedeiro.

Estudos metagenômicos verificaram que simbioses de esponjas possuem um repertório extenso de proteínas do tipo *eukaryotic-like proteins* (ELPs). Essas ELPs são descritas em diversos organismos patogênicos e simbioses e são capazes de modificar o comportamento de tecidos do hospedeiro, modulando interações entre proteínas eucarióticas. Essas proteínas são capazes de modificar a interação de moléculas estruturais, permitindo que microorganismos evadam o processo de digestão intracelular (Fan *et al.*, 2012; Slaby *et al.*, 2019). Os genes que codificam ELPs geralmente são expressos extracelularmente e co-transcritos juntamente com outros genes ligados a mecanismos de transporte celular, o que suporta a hipótese da sua função de comunicação entre microbiota e hospedeiro (Thomas *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2020a). Um experimento feito com esponjas isolou e expressou genes ligados a ELPs em bactérias e verificou que essas proteínas são capazes de modificar a capacidade fagocítica de amebas expostas às bactérias que carregavam aqueles genes, mostrando que esse mecanismo pode ser um importante mediador da simbiose em esponjas (Nguyen & Thomas, 2014; Reynolds & Thomas, 2016). Além disso, genes ligados a ELPs são encontrados em maior frequência no genoma de simbioses de esponjas do que em microorganismos de vida livre (Engelberts *et al.*, 2020; Diez-Vives, 2022).

Os compostos produzidos pelos simbioses também podem ter outros tipos de ação moduladora sobre a imunidade. Um trabalho feito com uma espécie de esponja de água doce amazônica isolou bactérias associadas a esse organismo e verificou que extratos obtidos a partir dessas bactérias possuem atividade antibiótica e antifúngica. Além disso, também

apresentaram atividade imunossupressora, sendo capazes de reduzir a degranulação de mastócitos de mamífero em cultura (Rozas *et al.*, 2016). Esses resultados indicam não só que esses microorganismos são capazes de modular o sistema imune da esponja, mas também que compostos produzidos por eles podem ter papel importante na competição entre microorganismos dentro do hospedeiro. Os simbioses, ao mesmo tempo que eliminam competidores do seu ambiente, podem estar também favorecendo seu hospedeiro, protegendo-o contra potenciais patógenos.

Outras adaptações também foram fundamentais para o estabelecimento de associações altamente complexas e estáveis com o hospedeiro. Vários estudos encontraram uma grande diversidade de elementos móveis no repertório genômico de simbioses de esponjas, como plasmídeos, transposons e profagos, responsáveis por mediar processos de transferência lateral de genes. Tais elementos móveis permitem o rearranjo gênico que pode originar novas vias regulatórias ou pode eventualmente levar a perda de genes com funções redundantes (Webster & Taylor, 2012), contribuindo assim para a aquisição de caracteres potencialmente favoráveis para o estabelecimento desses microorganismos dentro do hospedeiro e para a adaptação evolutiva do holobionte como um todo (Fan *et al.*, 2012; Pita *et al.*, 2018). De acordo com dados metagenômicos, alguns clusters de grupos ortólogos (*clusters of orthologous groups* - COG) associados a transposases se encontram particularmente enriquecidos em esponjas quando comparados com dados do plâncton marinho. Isso indica que o intercâmbio de genes entre os simbioses e comunidades bacterianas externas é restrito, favorecendo a transferência de genes entre simbioses e limitando a entrada de informação genética de fora do contexto do holobionte, dessa forma reforçando o estabelecimento de relações simbióticas (Thomas *et al.*, 2010).

Da mesma forma, foi observado um grande número de enzimas de restrição compartilhadas entre membros da comunidade microbiana associada. Mecanismos de restrição e modificação do DNA representam adaptações à vida dentro do hospedeiro, uma vez que permitem o intercâmbio gênico dentro da comunidade. Ao mesmo tempo, funcionam também como mecanismos de defesa contra a introdução de DNA exógeno, contribuindo na manutenção da integridade das interações hospedeiro-microbiota (Thomas *et al.*, 2010). Outra linha de defesa contra DNA exógeno são os agrupados de curtas repetições palindrômicas regularmente inter-espaçadas (*regularly interspaced short palindromic repeats* - CRISPRs). Os CRISPRs representam um sistema de defesa contra plasmídeos e principalmente infecções virais, sendo de grande importância para uma comunidade microbiana que se encontra constantemente exposta a um grande influxo de partículas virais

vindas da água filtrada pela esponja (aproximadamente 1000 partículas virais por célula por dia) (Thomas *et al.*, 2010; Webster *et al.*, 2012).

Milhões de anos de evolução moldaram uma diversidade de mecanismos que permitiram o estabelecimento dos simbioses de maneira estável dentro das esponjas hospedeiras. Ao mesmo tempo estes organismos foram sofrendo modificações no seu metabolismo, as quais favoreceram o aproveitamento de vias metabólicas de seus simbioses para as mais diversas funções fisiológicas, reforçando e tornando cada vez mais complexas essas associações.

1.3. Diversidade e estrutura da microbiota de esponjas

A microbiota associada a esponjas é composta por uma diversidade de grupos, como arqueias, bactérias, vírus, fungos e protistas (Taylor *et al.*, 2007). Entretanto, a grande maioria dos trabalhos se limita a estudar a porção procariótica dessas comunidades, sendo o viroma e o microeucarioma desses organismos ainda pouco conhecidos (Pascelli *et al.*, 2020; Nascimento-Silva *et al.*, 2022). Portanto, neste trabalho, os termos “microbioma” e “microbiota” serão utilizados para referir especificamente à comunidade procariótica.

O conjunto hospedeiro-microbiota é uma unidade complexa cujo funcionamento consiste não apenas na soma das funções executadas por cada parte isolada, mas também das interações entre eles. Uma característica fundamental desse tipo de associação é a capacidade da microbiota se manter estável e resiliente frente aos desafios enfrentados pelo holobionte, como por exemplo estresse ambiental, doenças, predação, competição, etc (Pita *et al.*, 2018). Diversos estudos realizados com diferentes espécies de esponjas usando abordagens moleculares foram fundamentais para definir as principais características do microbioma de esponjas, principalmente no que se refere a arqueias e bactérias. Algumas conclusões gerais importantes puderam ser tiradas a partir da observação de padrões nessas comunidades: (I) a microbiota associada é estável e diferente daquela presente na água do mar circundante; (II) é possível separar as esponjas em dois grupos distintos a partir da abundância de procariotos em seus tecidos; (III) existe um conjunto de filos bacterianos, formado por espécies generalistas, que é frequentemente encontrado em esponjas de diferentes grupos taxonômicos e localidades; (IV) existe também uma porção variável do microbioma estruturada e enriquecida de maneira diferente em espécies particulares de esponjas, porção esta que é formada por uma comunidade espécie-específica (Fan *et al.*, 2012; Pita *et al.*, 2018; Astudillo-García *et al.*, 2020).

Diversos trabalhos analisando a composição da microbiota de esponjas em diferentes ambientes, estações do ano ou habitats mostraram que essas comunidades são distintas daquela encontrada na água circundante. Também foi observado que essa composição possui um padrão espécie-específico e que, de forma geral, se mantém estável ao longo do gradiente ambiental (Hardoim *et al.*, 2012; Pita *et al.*, 2013; Steinert *et al.*, 2017). Por outro lado, outros estudos observaram que, apesar de altamente estável, a microbiota associada as esponjas pode sofrer alterações na sua composição resultante da disbiose desencadeada por diversos fatores como mudanças de parâmetros físico-químicos na água, exposição a poluentes, estresse do hospedeiro provocado por doenças e processos de ocupação de novos ambientes e nichos (Webster *et al.*, 2008; Freeman *et al.*, 2020; Hardoim *et al.*, 2023). Análises de *metabarcoding* de diversas espécies de regiões diferentes mostram que de maneira geral a microbiota de esponjas é dominada pelos filos bacterianos *Proteobacteria*, *Chloroflexi*, *Acidobacteria* e *Cyanobacteria*, com destaque também para o filo de arqueias *Thaumarchaeota* (Figura 7 - Thomas *et al.*, 2016; Moitinho-Silva *et al.*, 2017).

A abundância microbiana é um fator importante na estruturação da microbiota associada a esponjas. Estudos com diversas espécies diferentes de esponjas observaram que é possível separá-las em dois grupos distintos, um com alta abundância microbiana (*high microbial abundance* ou HMA) e outro com baixa abundância microbiana (*low microbial abundance* ou LMA - Hentschel *et al.*, 2003). Esponjas HMA podem apresentar uma população bacteriana de até 10^{10} microorganismos/g de esponja, enquanto que em esponjas LMA essa proporção se reduz a 10^6 microorganismos/g, próximo a densidade encontrada na água do mar, sendo em ambos os casos um traço altamente conservado a nível de gênero (Gloeckner *et al.*, 2014).

Em termos de estrutura da comunidade procariótica associada, esponjas HMA apresentam índices de riqueza e diversidade maiores em comparação às LMA, sendo que a microbiota de indivíduos LMA tende a ser dominada por algumas espécies, enquanto àquela associada a esponjas HMA apresenta abundâncias mais equilibradas. Análises utilizando *metabarcoding* também mostram que a microbiota de diferentes indivíduos HMA são mais propensos a formar clusters, um padrão que potencialmente reflete uma estrutura formada por simbiontes compartilhados e generalistas (Erwin *et al.*, 2015). A densidade e estrutura da microbiota parecem estar também diretamente relacionadas à morfologia das esponjas. Enquanto esponjas HMA são tipicamente grandes, compactas e com o sistema aquífero menos denso, as LMA costumam ser menores, mais frágeis e com o corpo altamente irrigado

(Figura 8 - Poppell *et al.*, 2014). Além disso, esponjas HMA têm taxas de filtração entre 52–94% menores do que aquelas observadas em esponjas LMA. Isso indica que essa distinção morfológica pode estar ligada a diferenças nas estratégias nutricionais, resultantes de processos evolutivos diretamente atrelados às suas simbioses (Weisz *et al.*, 2008), sendo um exemplo de como estas associações podem potencialmente afetar de maneira substancial a história evolutiva de seus hospedeiros.

Apesar de altamente específicas, as comunidades procarióticas associadas a esponjas possuem uma fração comum compartilhada mesmo por indivíduos separados por grandes distâncias. A similaridade entre os microbiomas de esponjas de ordens diferentes fica em torno de 60%, chegando próximo a 90% no caso de espécies filogeneticamente mais próximas, mesmo ao se comparar localidades separadas por milhares de quilômetros, como o Mar do Caribe e o Mar Vermelho (Schmitt *et al.*, 2012). A chamada microbiota core forma uma comunidade generalista e cosmopolita, presente de maneira consistente tanto ao comparar indivíduos da mesma espécie quanto de espécies diferentes (Schmitt *et al.*, 2012; Thomas *et al.*, 2016)

Essa alta similaridade entre as microbiotas associadas a diferentes esponjas foi descrita pela primeira vez por Hentschel e colaboradores (2002). Foi observado que ao analisar sequências de gene do 16S rRNA derivado de esponjas, estas se juntam formando clusters, independente do local ou espécie de origem. Essas sequências foram chamadas de específicas de esponjas (*sponge-specific* - Hentschel *et al.*, 2002). Posteriormente, este termo foi atualizado para sequências enriquecidas em esponjas (*sponge-enriched*), uma vez que também foram detectadas no plâncton, apesar de representarem uma fração mínima dessa comunidade (Moitinho-Silva *et al.*, 2014). De acordo com a definição original proposta por Hentschel e colaboradores (2002), as sequências enriquecidas em esponjas são (I) mais similares entre si do que sequências provenientes de outras fontes; (II) são derivadas de pelo menos duas espécies de esponjas ou de uma mesma espécie coletada em locais diferentes; (III) formam um grupo suportado por pelo menos três abordagens filogenéticas diferentes (Hentschel *et al.*, 2002). Os principais filos de bactérias que compõem esse grupo são *Proteobacteria* (classes *Alfa* e *Gammaproteobacteria*), *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Cyanobacteria* (Simister *et al.*, 2012).

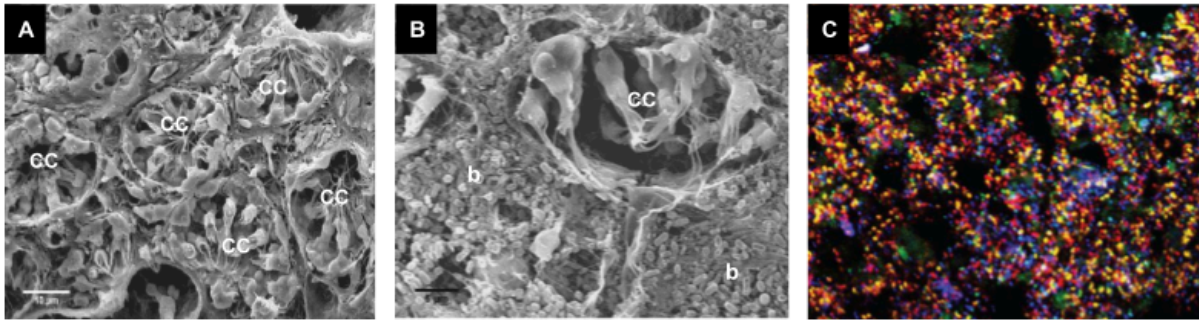


Figura 8: A - Ultraestrutura de uma esponja LMA, com destaque para a alta densidade de câmaras coanocitárias (cc) nos tecidos; B - ultraestrutura de uma esponja HMA, mostrando uma câmara coanocitária e bactérias (b) em abundância no mesoilo (Poppell *et al.*, 2014); C - Imagem de esponja HMA obtida usando técnicas de fluorescência (DOPE FISH) mostrando diferentes filamentos de bactérias em cores distintas (Webster *et al.*, 2016).

Especula-se que a transmissão horizontal seja a principal estratégia de aquisição dessa microbiota generalista, estimando-se que cerca de 55% dos táxons bacterianos associados a larvas de esponjas sejam adquiridos a partir do ambiente (Carrier *et al.*, 2022). Uma hipótese em particular afirma que possivelmente os primeiros simbiossitos de esponjas teriam coevoluído com seus hospedeiros e posteriormente se espalhado pelos oceanos. Com o passar das eras geológicas, esses microorganismos teriam encontrado e colonizado novas esponjas (Taylor *et al.*, 2007). Mesmo que rara, a presença de microorganismos considerados *sponge-enriched* no plâncton e em diferentes espécies de esponjas num gradiente ambiental amplo suporta essa hipótese (Schmitt *et al.*, 2012). Essa presença tanto no plâncton quanto em associação com uma variedade de esponjas é possível uma vez que estes organismos mantêm um genoma maior semelhante a espécies próximas com hábitos de vida livre em oposição ao genoma altamente reduzido de microorganismos estritamente simbióticos, incapazes de sobreviver fora de seus hospedeiros (Diez-vives *et al.*, 2020). Um exemplo disso é o simbiossito facultativo “*Candidatus Synechococcus feldmannii*”, capaz de viver intracelularmente dentro de bacteriócitos e também livremente no plâncton. Esse organismo, apesar de formar associações simbióticas, manteve genes ligados à produção de moléculas que favorecem a flutuação na água, ao contrário de outro membro do mesmo gênero, “*Candidatus Synechococcus spongiarum*”, que é estritamente simbiótico (Simkovsky *et al.*, 2012).

A microbiota também é formada por uma porção espécie-enriquecida que é caracterizada por ser altamente variável entre espécies, além de potencialmente estar ligada a funções chave no metabolismo do holobionte (Oliveira *et al.*, 2020a). Essa porção espécie-enriquecida pode ser passada de geração para geração através de estruturas

reprodutivas como larvas, gêmulas e brotos (Carrier *et al.*, 2022). Em média, ao comparar a microbiota de larvas e adultos, observa-se uma similaridade em torno de 45%, mostrando que a transmissão horizontal pode ter um papel importante na estruturação da microbiota em grande parte das esponjas (Carrier *et al.*, 2022). Um estudo em particular foi capaz de detectar consistentemente a presença de algumas cepas bacterianas desde os estágios larvais iniciais até adultos, três anos após o início das observações (Sharp *et al.*, 2007).

Atualmente considera-se que ambas as formas de transmissão, vertical e horizontal, têm um papel importante na estruturação da microbiota de esponjas, uma estratégia chamada de transmissão de modo misto (*mixed-mode transmission* - MMT) (Webster & Thomas, 2016; Oliveira *et al.*, 2020a; Díez-Vives *et al.*, 2022). Apesar de algumas evidências, ainda permanece incerto se simbioses transmitidos horizontalmente poderiam ser considerados estritamente generalistas dentro da estrutura do microbioma, assim como ainda não foi confirmado que aqueles transmitidos verticalmente sejam estritamente especialistas (Schmitt *et al.*, 2012; Díez-Vives *et al.*, 2022). A proporção na qual cada modo de transmissão contribui para a formação da microbiota varia amplamente entre espécies. Algumas esponjas transmitem uma fração considerável do seu microbioma para sua progênie, como observado em *Ianthella basta*, em que 94% da comunidade microbiana é compartilhada por adultos e larvas (Engelberts *et al.*, 2022). Nos adultos dessa esponja, uma arqueia (classe *Taumarqueota*) e duas bactérias (classes *Gamaproteobacteria* e *Alfaproteobacteria*) dominam a microbiota, com abundância >90%. Um padrão semelhante foi observado nas larvas da espécie. Além de terem sua presença confirmada por meio de microscopia eletrônica de transmissão, essas mesmas três cepas compõem mais de 80% da microbiota nos estágios larvais. Outras espécies dependem unicamente da aquisição de microorganismos a partir do ambiente para formar sua microbiota, como no caso de *Petrosia ficiformis* (Maldonado & Riesgo, 2009). Tanto os gametas quanto as larvas dessa espécie são completamente desprovidos de microorganismos, o que indica que os simbioses são unicamente obtidos a partir de transferência horizontal, possivelmente com a contribuição de um sistema imune altamente ajustado.

1.4. Funções da microbiota no contexto do holobionte esponja

Uma grande diversidade de microorganismos faz parte da microbiota de esponjas, conferindo uma variabilidade taxonômica e funcional significativa ao holobionte. Por outro lado, também é observado um certo grau de estabilidade ao comparar a estrutura funcional de

diferentes microbiotas. Isso pode estar associado a uma convergência de funções-chave que são amplamente observadas independente do ambiente ou nicho ocupado pelo holobionte (Fan *et al.*, 2012; Thomas *et al.*, 2016; Carrier *et al.*, 2022). As chamadas funções core podem ter papel fundamental para a adaptação da microbiota ao seu hospedeiro, compreendendo vias que favorecem tanto o simbiote quanto o hospedeiro. De maneira geral, essas incluem a mediação de ciclos biogeoquímicos; produção de metabólitos secundários ou síntese de vitaminas essenciais (Pita *et al.*, 2018; Slaby *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2020a). Além disso, reconstruções metabólicas feitas a partir do metagenoma de *Ircinia ramosa* mostram que vias ligadas a essas funções core são extensivamente redundantes em diferentes táxons que compõem a sua microbiota, conferindo redundância funcional ao holobionte (Engelberts *et al.*, 2020).

Uma ilustração da importância dessas relações pode ser observada na vitamina B₁₂, cujas vias de produção ainda não foram descritas no metabolismo de nenhum eucarioto até hoje, sendo majoritariamente suprida por meio da alimentação. No entanto, diversos estudos observaram a presença de proteínas ligadas à biossíntese de vitaminas do complexo B em diferentes microorganismos associados as esponjas, incluindo bactérias e arqueias (Thomas *et al.*, 2010; Fan *et al.*, 2012; Lackner *et al.*, 2017; Pita *et al.*, 2018; Engelberts *et al.*, 2020). Esses resultados indicam que, ao contrário da maioria dos animais, esponjas obtêm a vitamina B₁₂ necessária para seu metabolismo a partir da sua microbiota, ao invés de depender da sua alimentação para suprir a demanda.

A ciclagem de elementos fundamentais como carbono (C), nitrogênio (N), fósforo (P) ou enxofre (S) em esponjas também está frequentemente associada a microorganismos simbiotes, seja na obtenção desses elementos a partir do ambiente para seu aproveitamento no metabolismo do holobionte ou na reciclagem de produtos excretados pelo hospedeiro (Taylor *et al.*, 2007; Fan *et al.*, 2012, Webster & Thomas, 2016; Pita *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019; Engelberts *et al.*, 2020). Apesar de parte do C necessário ser obtido na forma de matéria orgânica particulada (detritos e microorganismos), o C dissolvido na água, majoritariamente subproduto da fotossíntese de microalgas e cianobactérias presentes no plâncton, tem se mostrado como principal fonte do C especialmente em esponjas HMA. Isso é um reflexo da presença de uma microbiota abundante, que pode ter um papel fundamental na assimilação do C dissolvido filtrado pelo hospedeiro (De Goeij *et al.*, 2008; Campana *et al.*, 2021). Um exemplo dramático dessa estratégia é o de *Xestospongia muta*, que depende quase exclusivamente de C orgânico dissolvido, representando cerca de 96% do C total obtido pela esponja (Hoer *et al.*, 2018). A assimilação de C dissolvido também tem um papel

ecológico importante, visto que através do chamado *sponge loop*, esse C vindo de fontes primárias é assimilado pela esponja e posteriormente devolvido ao ambiente na forma de detritos. Dessa forma, o C antes dissolvido na coluna d'água passa a estar disponível para a comunidade bentônica (Rix *et al.*, 2018).

A fotossíntese também pode ser uma forma de obtenção de C a partir de fontes inorgânicas (CO₂). Nessa estratégia, cianobactérias ou zooxantelas simbiotes têm papel central na obtenção do C utilizado pelo holobionte, sendo em alguns casos responsáveis por suprir mais de 50% da necessidade energética do hospedeiro (Taylor *et al.*, 2007). Em ambientes oligotróficos como o mar profundo, a microbiota também pode ser fundamental para a assimilação de C. Nesses ambientes a disponibilidade de C orgânico tanto dissolvido quanto na forma de partículas é limitada, tornando a associação com microorganismos quimioautotróficos ou mixotróficos capazes de fixar C inorgânico fundamental para a obtenção de energia (Van Duyl *et al.*, 2008).

A ciclagem de N entre o ambiente, a esponja hospedeira e os microorganismos simbiotes está intimamente interconectada e envolve vias aeróbias (nitrificação, envolvendo processos de oxidação de amônia e de nitrito, e fixação de N) e anaeróbias (desnitrificação e oxidação anaeróbia de amônia - Figura 9). A presença de regiões com menor difusão de oxigênio está diretamente relacionada com a circulação de água através do corpo da esponja, podendo haver completa anóxia dos tecidos quando o bombeamento de água pelos canais cessa completamente (Fan *et al.*, 2012; Pita *et al.*, 2018). Entretanto, vias anaeróbias também podem ocorrer intracelularmente em cianobactérias no interior de compartimentos chamados heterocistos, capazes de limitar o influxo de O₂ (Fiore *et al.*, 2010).

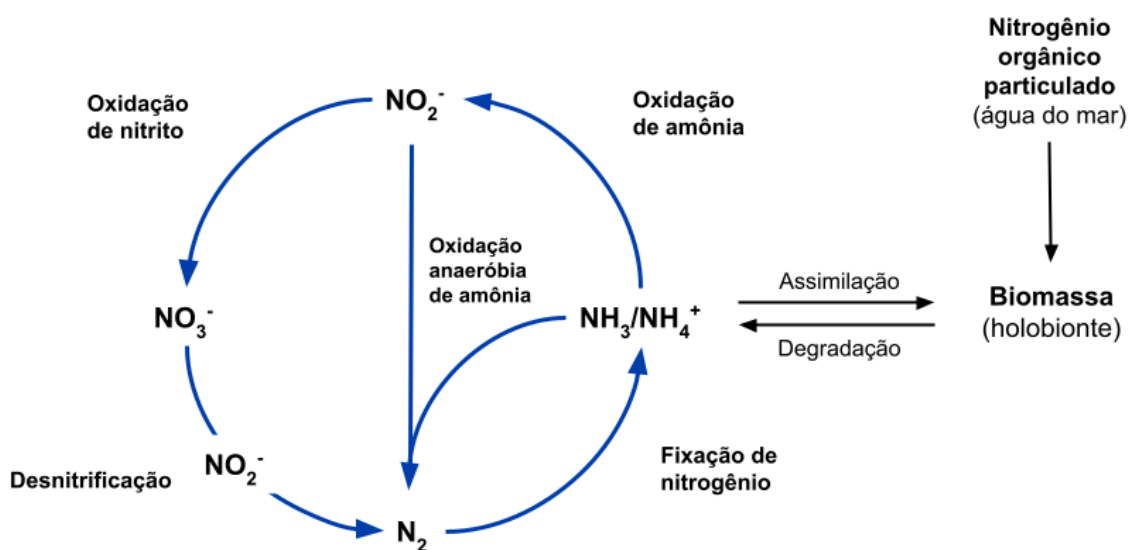


Figura 9: Ciclo do nitrogênio em esponjas (adaptado de Taylor *et al.*, 2007).

Análises integradas feitas com diversas espécies de esponjas mostraram que diferentes conjuntos de microorganismos utilizam enzimas distintas para executar funções equivalentes de fixação de N, oxidação de amônia e desnitrificação (Fan *et al.*, 2012). Em alguns casos, em ambientes oligotróficos em que os níveis de N disponíveis no ambiente são baixos, cianobactérias simbiotes contribuem fixando nitrogênio inorgânico presente na forma de N₂ dissolvido na água (Wilkinson *et al.*, 1999). Por outro lado, a amônia excretada pelas esponjas pode se tornar tóxica, especialmente em períodos em que o fluxo de água pelos canais está reduzido. Nesse contexto, microorganismos contribuem para a metabolização dessa amônia em compostos menos tóxicos, através do processo de nitrificação (Pita *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019). Esse processo, seja completo ou incompleto, é praticamente onipresente em esponjas, independente do ambiente em que se encontram, da temperatura ou da sua densidade bacteriana (Zhang *et al.*, 2019; Engelberts *et al.*, 2020), sendo os diferentes passos predominantemente realizados por bactérias do filo *Proteobacteria* (*Beta* e *Gamaproteobacteria*) e arqueias do filo *Thaumarchaeota* (Bayer *et al.*, 2008).

De acordo com a literatura, esponjas atuam tanto como fonte quanto como sumidouro de P. No ambiente aquático, o P encontra-se em três formas principais: dissolvido na forma de fosfato inorgânico, na forma de fósforo particulado ou dissolvido na forma de fósforo orgânico, sendo a última dominante (Maldonado *et al.*, 2012). Um estudo realizado com três espécies do Mar Mediterrâneo quantificou as taxas de excreção de fosfato, observando valores entre 20% e 60%. Esses resultados indicam que nesses casos, P não é um nutriente limitante, sendo suficientemente obtido pelas esponjas através da filtração e o excesso liberado de volta para o ambiente. Isso sugere também que essas esponjas podem ter um papel importante na ciclagem de P no contexto de sua comunidade (Ribes *et al.*, 2007). Um outro estudo se aprofundou no papel da microbiota na ciclagem de P e observou que bactérias simbiotes isoladas a partir de *Dendrilla nigra* são capazes de solubilizar fosfato inorgânico, tornando-o biodisponível para o holobionte (Sabarathnam *et al.*, 2010). Por outro lado, um trabalho realizado com esponjas de recifes no Caribe verificou taxas de sequestro de fosfato entre 20% e 40%. Foi proposto que esse fosfato sequestrado seria possivelmente metabolizado por cianobactérias simbiotes e armazenado na forma de grânulos observados no tecido da esponja, para posteriormente ser degradado pela enzima polifosfato quinase produzida por outros membros da microbiota e utilizada pelo holobionte (Zhang *et al.*, 2015). A ciclagem de P em esponjas ainda é um assunto pouco explorado, em comparação aos ciclos de C e N. Mais estudos são necessários para compreender melhor tanto o papel ecológico das

esponjas nesse ciclo biogeoquímico quanto como as associações com microorganismos que se inserem dentro desse contexto.

Tanto a oxidação quanto a redução de S foram amplamente observadas em diferentes esponjas, quase sempre associadas ao metabolismo de bactérias. Assim como algumas vias do ciclo do N, a metabolização de S envolve reações que só ocorrem na ausência de oxigênio. Dessa forma, é comum que essas bactérias especializadas ocorram em zonas anóxicas do corpo da esponja (Zhang *et al.*, 2019). Um estudo desenvolvido por Hoffman e colaboradores (2005) analisou o perfil de oxigênio nos tecidos de *Geodia barretti* em conjunto com a quantificação das taxas de redução de S e imagens de microscopia com técnicas de fluorescência que permitiram a visualização de bactérias nos tecidos da esponja. Observou-se um gradiente de oxigênio decrescente a partir da superfície da esponja em direção à porção mais interna dos tecidos. Foi verificado também que bactérias pertencentes a um cluster tipicamente associado à metabolização de S apresentam uma distribuição correlacionada à oxigenação dos tecidos, estando mais presentes nas porções mais internas e ausentes próximo à superfície. A mesma correlação foi observada ao quantificar a taxa de redução de S, com valores crescentes em direção aos tecidos mais internos. As regiões de anóxia, além de propiciar a ciclagem de S, podem também representar zonas em que o crescimento de bactérias é promovido a partir do aproveitamento de subprodutos do metabolismo em condições de baixa disponibilidade de oxigênio. A redução de S promovida por bactérias nesses tecidos pode ter um efeito de detoxificação, protegendo o hospedeiro contra o acúmulo de sulfito (Hoffman *et al.*, 2005). Em conjunto com evidências de outros trabalhos, os resultados obtidos indicaram também que ácidos carboxílicos produzidos pelas bactérias simbiotes poderiam possivelmente ser aproveitados pela esponja para a síntese de seus próprios ácidos carboxílicos (Kohring *et al.*, 1994; Hoffman *et al.*, 2005).

A microbiota associada também pode ter um papel defensivo importante nas interações entre esponjas e outros organismos bentônicos. Essa ação se deve à produção de metabólitos secundários com efeitos citotóxicos, neurotóxicos, alelopáticos, antivirais, antifúngicos, antimicrobianos, antiprotozoários entre outros (Taylor *et al.*, 2007; Hardoim & Costa, 2014; Santos-Gandelman *et al.*, 2014a; Indraningrat *et al.*, 2016; Carroll *et al.*, 2019). Experimentos feitos com *Erylus formosus* mostraram que compostos presentes na superfície da esponja atuam não só como uma defesa química contra predação, mas também são capazes de inibir o crescimento e estabelecimento de algas e invertebrados epibiontes (Kubanek *et al.*, 2002).

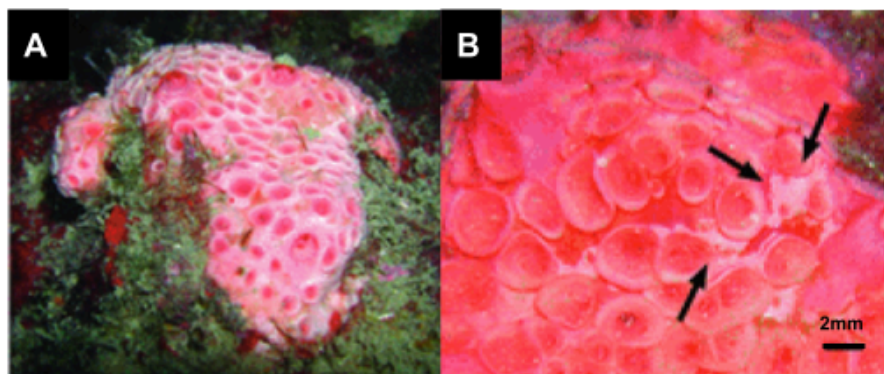


Figura 10: Esponja *Hemimycale columella* (A) e áreas esbranquiçadas no tecido da esponja (setas) devido ao acúmulo de calcibactérias (B) (Uriz *et al.*, 2012).

Especula-se que a enzima fosfolipase A2, produzida por bactérias do gênero *Streptomyces* associadas a algumas esponjas, esteja ligada a esses mecanismos de defesa. Essa enzima está presente também no veneno de abelhas e serpentes e é conhecida pelos seus efeitos neuro e miotóxicos (Santos-Gandelman *et al.*, 2014a). Algumas espécies do gênero *Mycale* apresentam bactérias endossimbiontes chamadas calcibactérias (Figura 10), capazes de produzir um envoltório calcítico na forma de esférulas de até 100 nm (Uriz *et al.*, 2012). Ensaio feito com esférulas calcíticas obtidas a partir de *Hemimycale columella* mostraram que a aplicação desse material no alimento de ouriços-do-mar foi capaz de dissuadir o consumo do alimento (Garate *et al.*, 2015). Esses resultados, juntamente com a observação da presença dessas bactérias em grandes densidades na porção mais externa da esponja indicam que este simbionte possa ter um papel importante na proteção da esponja contra predação.

Metabólitos secundários obtidos a partir de esponjas são o foco de estudos desde meados do século XX (Lee *et al.*, 2001) e, além da sua importância no contexto do holobionte, possuem potenciais aplicações biotecnológicas. Uma diversidade de novos compostos de diferentes classes (terpenóides, alcalóides, peptídeos, policetídeos, etc) são descritos a cada ano, sendo a produção deles majoritariamente atribuída à microbiota em vez da esponja hospedeira (Taylor *et al.*, 2007; Carroll *et al.*, 2019). A atividade biológica desses compostos inclui ação antibiótica, antifúngica, antiparasitária, antitumoral, imunossupressora, inseticida, entre outras (Lee *et al.*, 2001; Santos-Gandelman *et al.*, 2014a; Rozas *et al.*, 2016). Muitos desses metabólitos secundários têm grande potencial biomédico e farmacêutico e já existem hoje no mercado medicamentos que tem como princípio ativo compostos sintéticos desenvolvidos a partir de moléculas produzidas por bactérias associadas a esponjas, como é o caso do Vidarabine (Vira-A[®]) (Amelia *et al.*, 2022). Esse medicamento antiviral foi desenvolvido a partir de “espongonucleosídeos” com propriedades inibitórias da síntese viral

produzidos por bactérias do gênero *Vibrio* associadas a esponja *Tectitethya crypta* (Bertin *et al.*, 2015)

Bactérias associadas a esponjas produzem também uma variedade de enzimas diferentes com potencial biotecnológico também para aplicação industrial. Estudos feitos com diversas espécies de esponjas detectaram a presença de enzimas como celulases, proteases, amilases e lipases além de inibidores enzimáticos que apresentam potencial para biocatalização de processos na indústria química, alimentícia, têxtil, farmacêutica, cosmética, entre outras (Mohapatra *et al.*, 2003; Andriyono *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2020b; Amelia *et al.*, 2022). A maior parte dos trabalhos existentes têm foco na atividade de hidrolases (73%), principalmente hidrolases glicosídicas com capacidade de degradação de polissacarídeos (Oliveira *et al.*, 2020b).

Um exemplo é o estudo feito por Han e colaboradores (2008), no qual uma cepa do gênero *Streptomyces* isolada da esponja *Craniella australiensis* se mostrou capaz de produzir quitinase. A enzima foi purificada e caracterizada e seus parâmetros ideais foram estabelecidos, mostrando resultados promissores de aplicação industrial. No contexto metabólico do holobionte, essas enzimas potencialmente estão relacionadas com o processamento de matéria orgânica, de maneira que moléculas complexas que não poderiam ser absorvidas pela esponja são transformadas em compostos mais simples, tornando-se disponíveis para serem aproveitados como fonte de nutrientes pelo hospedeiro (Santos-Gandelman *et al.*, 2014a).

Algumas cepas isoladas a partir de esponjas também se mostraram eficientes na biorremediação de contaminantes na água, sendo capazes de mineralizar ou metabolizar poluentes e transformá-los em compostos menos tóxicos (Santos-Gandelman *et al.*, 2014a). A taxa de filtração de esponjas pode chegar a mais de 1,3 m³/h (Leys *et al.*, 2011) e sua capacidade de retenção de partículas é de até 99%, tornando-as bioacumuladoras de quaisquer poluentes que possam estar presentes na água do mar (Krikech *et al.*, 2022). Consequentemente a sua microbiota está constantemente exposta, fazendo com que haja uma pressão seletiva favorecendo microorganismos resistentes a esses compostos tóxicos.

Um trabalho feito com esponjas marinhas da costa sudeste do Brasil isolou 21 cepas de bactérias resistentes a altas concentrações de mercúrio (Santos-Gandelman *et al.*, 2014b), 15 das quais apresentaram atividade redutora de mercúrio vinculada a presença de genes codificantes de mercúrio redutase (*merA*). Nas seis cepas restantes, foi verificada a produção de biossurfactantes potencialmente ligados à detoxificação de mercúrio por meio de sequestramento. Os resultados indicam que essas bactérias possuem um potencial de

aplicação no tratamento de resíduos tóxicos provenientes da indústria ou na recuperação de ambientes contaminados. Outro estudo isolou quatro cepas bacterianas (*Ruegeria atlantica*, *Oceanicaulis stylophorae*, *Pseudovibrio ascidiaceicola* e *Mameliella phaeodactyli*) a partir da esponja *Hymeniacidon perlevis*, capazes de degradar o pesticida Lindano (Loredana *et al.*, 2017). Esse organoclorado é amplamente utilizado na agricultura e tende a ser bioacumulado tanto em ambientes terrestres quanto aquáticos, apresentando toxicidade aguda e acarretando também efeitos crônicos aos organismos (Kumar & Pannu, 2018). Desta forma, além da sua aplicação biotecnológica, esses microorganismos podem ter um papel crucial de detoxificação para o holobionte, evitando os efeitos deletérios da acumulação de compostos tóxicos.

A saúde e funcionamento coeso do holobionte dependem de um fino equilíbrio dinâmico nas interações hospedeiro-microbiota. Perturbações no ambiente em que as esponjas se encontram podem levar ao estresse e conseqüentemente afetar o equilíbrio da microbiota associada. Alguns estudos demonstraram que existe um grau de resiliência que permite ao holobionte se manter estável diante de mudanças ambientais de menor grau (Figura 11) (Pita *et al.*, 2018). Um exemplo disso é a recuperação dos simbiossintetizantes em *Xestospongia muta* após eventos de branqueamento (López-Legentil *et al.*, 2008). A quantificação da expressão do gene da proteína de estresse térmico *hsp70*, permitiu observar que os níveis de estresse nos indivíduos expostos a temperaturas poucos graus acima do controle foram significativamente mais altos e afetaram a capacidade da esponja recuperar seus simbiossintetizantes, levando a um processo de branqueamento fatal. Por outro lado, esponjas branqueadas mantidas na temperatura controle foram capazes de recuperar seus simbiossintetizantes, retornando ao estado de estabilidade do holobionte.

Quando os mecanismos de resistência e resiliência falham em manter o estado de homeostase diante dos efeitos de perturbações ambientais, o estado de desequilíbrio pode levar a disbiose e doença (Figura 11). A disbiose é caracterizada por uma disrupção na diversidade da microbiota associada, comumente ocorrendo uma modificação na composição da comunidade microbiana. Nestes casos, ocorre uma diminuição da porção *sponge-enriched* tipicamente simbiótica, o aumento de microorganismos oportunistas mais próximos daqueles de vida livre e o estabelecimento de potenciais patógenos (Webster *et al.*, 2012; Pita *et al.*, 2018; Posadas *et al.*, 2022).

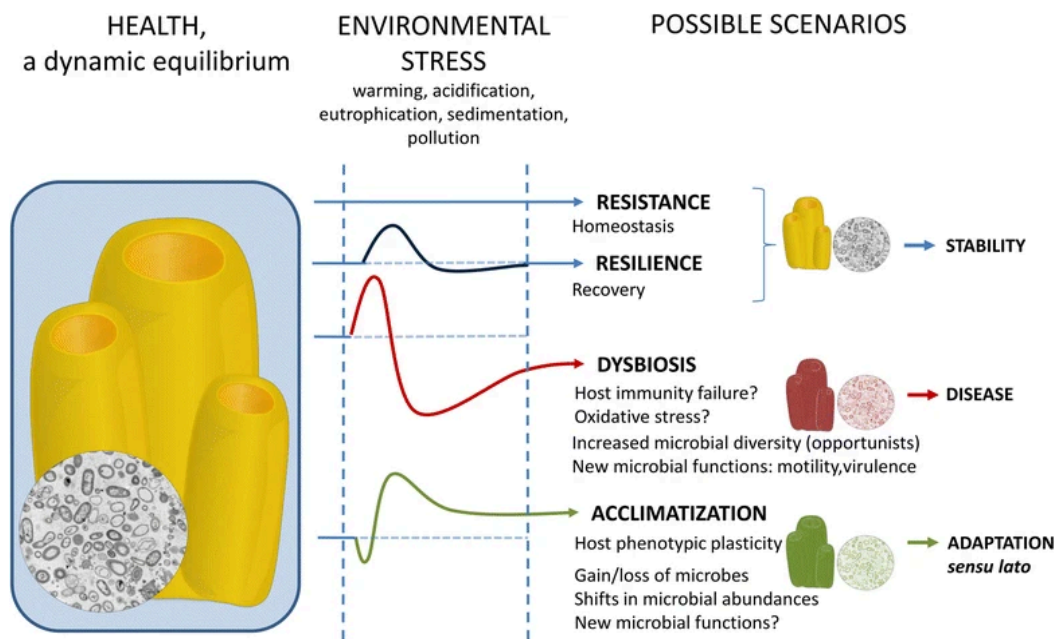


Figura 11: Potenciais respostas do holobionte frente a fatores de estresse ambiental (Pita *et al.*, 2018)

Experimentos submetendo diferentes esponjas a temperaturas e pHs alterados, de acordo com previsões de um cenário de aquecimento global, mostraram que a resposta a fatores estressores pode variar amplamente entre espécies. Essas diferentes respostas estão ligadas tanto a diferenças na complexidade da microbiota quanto às reações imunes dos hospedeiros frente às condições de estresse (Ribes *et al.*, 2016). Nesse estudo, indivíduos de *Neopetrosia compacta* se mantiveram saudáveis após a exposição a altas temperaturas e pH ácido, enquanto os de *Leucetta chagosensis* mostram sinais claros de necrose em seus tecidos quando expostos a altas temperaturas. Análises da microbiota mostraram que *N. compacta* apresentou uma comunidade complexa e funcionalidade predita redundante, enquanto a de *L. chagosensis* foi caracterizada por uma baixa diversidade taxonômica e baixa redundância funcional predita. Além disso, a resposta imune observada também foi diferente entre as duas espécies, com *N. compacta* mantendo a expressão dos efetores imunes estável sob as condições de estresse simuladas e *L. chagosensis* demonstrando uma disrupção na expressão de genes ligados a mecanismos inflamatórios, antimicrobianos e apoptóticos. A junção de uma microbiota mais suscetível e um desequilíbrio nas respostas imunológicas frente a condições de estresse acaba facilitando a passagem de um estado temporário de disbiose para um estado de doença nos indivíduos de *L. chagosensis*. Enquanto isso, uma maior complexidade e redundância funcional permitem ao holobionte resistir aos fatores de estresse e manter-se mais estável, como observado no caso de *N. compacta* (Ribes *et al.*, 2016; Posadas *et al.*, 2022). Podemos então concluir que a manutenção da homeostase no

holobionte depende de fatores tanto intrínsecos à comunidade simbiote quanto fisiológicos do hospedeiro funcionando de maneira coordenada.

Por outro lado, as perturbações ambientais que afetam o holobionte podem também resultar em processos de aclimatização e eventualmente de adaptação, agindo como pressão seletiva. A resposta adaptativa diante de alterações ambientais pode estar relacionada à plasticidade fenotípica do hospedeiro, mas também ser mediada pela microbiota associada. O estabelecimento de novas características no holobionte a partir da microbiota pode se dar através de alterações na sua composição, pela incorporação de novos simbiontes ou da aquisição de novos caracteres obtidos por transferência lateral de genes. A passagem de gerações em microorganismos é muito mais rápida do que a observada em metazoários, o que permite o estabelecimento de mutações favoráveis ao holobionte num tempo evolutivo muito mais curto (Webster *et al.*, 2016; Pita *et al.*, 2018). Um trabalho feito com três esponjas do Mar Mediterrâneo mostrou que diferentes espécies presentes num mesmo ambiente podem apresentar diferentes capacidades de resistir a mudanças ambientais geradoras de estresse (Ribes *et al.*, 2016). Foi observado que esponjas que sofreram uma reorganização da microbiota foram capazes de manter seu crescimento mesmo em condições desfavoráveis, enquanto a espécie na qual não foi observada essa reorganização teve seu crescimento completamente paralisado. Esses resultados indicam que a flexibilidade da microbiota pode ter um papel importante no processo de aclimatização.

Além do mais, uma microbiota adaptada, moldada a partir de novas condições as quais o holobionte está exposto, pode se estabelecer e ser transmitida verticalmente para as gerações seguintes. Dessa forma, por meio da seleção natural, novas características adquiridas inicialmente como forma de aclimatização podem se tornar comuns a toda uma população, levando à adaptação do holobionte (Webster *et al.*, 2016; Pita *et al.*, 2018). Esse tipo de processo pode ter sido fundamental para que as esponjas se adaptassem à grande variedade de ambientes onde são encontradas hoje em dia, sendo crucial para o sucesso evolutivo do filo Porifera. Isto talvez possa ser observado na ocupação de habitats com características bem diferentes, como foi o caso da ocupação de ambientes de água doce a partir de estoques de esponjas marinhas.

1.5. Ocupação dos ambientes de água doce e o papel da microbiota nesse processo

Especula-se que as primeiras associações entre esponjas e microorganismos tenham se dado com diferentes clados de organismos de vida livre, de forma menos seletiva e mais

aleatória daquelas observadas hoje em dia (Taylor *et al.*, 2007). À medida que essas associações foram evoluindo e se tornando mais complexas, a microbiota foi adquirindo funções que permitem não só sua existência de forma estável dentro do hospedeiro, mas também ocorre uma pressão seletiva no sentido de selecionar microorganismos que favoreçam o holobionte como um todo (Fan *et al.* 2012). Ao mesmo tempo, à medida que as esponjas foram se estabelecendo em diferentes ambientes, surgiram também associações extremamente específicas, moldadas pelas condições ambientais particulares as quais o holobionte estivesse exposto. Trabalhos feitos analisando a diversidade e o perfil funcional da microbiota de diferentes esponjas mostraram que a comunidade de microorganismos simbióticos pode ter um papel fundamental para a adaptação desses holobiontes a ecossistemas com condições particulares como o mar profundo, o ambiente antártico e os de água doce (Kenny *et al.*, 2019; Moreno-Pino *et al.*, 2020; Busch *et al.*, 2022).

Atualmente as esponjas de água doce, ou dulciaquícolas, correspondem a pouco mais de 10% da diversidade de espécies do filo Porifera (de Voogd *et al.*, 2023). Podem ser encontradas ao longo de todos os continentes, exceto a Antártica, em uma diversidade de habitats como rios, lagos, cavernas inundadas, corpos d'água intermitentes, entre outros (Manconi & Pronzato, 2007). Sua origem ainda é discutida e, apesar de haver registros de possíveis fósseis de esponjas de água doce do período Ediacarano, os registros geológicos mais antigos confirmados até hoje datam do Carbonífero, entre 359 milhões e 299 milhões de anos (Schindler *et al.*, 2008; Pronzato *et al.*, 2017).

De acordo com a teoria mais aceita, possivelmente o processo de soerguimento de cadeias montanhosas ocorrido entre os períodos Carbonífero e Permiano teria culminado na formação do supercontinente Pangea. Isto resultou no isolamento de porções do ambiente marinho que posteriormente se tornaram corpos de água doce. Como consequência, a fauna isolada nesses ambientes, incluindo possíveis ancestrais das esponjas de água doce, teve que se adaptar para sobreviver às novas condições impostas pelo ambiente (Schindler *et al.*, 2008). Acredita-se que representantes da ordem Haplosclerida, que tipicamente habitam zonas rasas e de entre-marés, tenham divergido e originado as primeiras esponjas de água doce. Neste evento, a presença de estruturas de reprodução resistentes chamadas gêmulas (Figura 12) pode ter tido um papel importante para o seu sucesso nesse novo ambiente (Manconi & Pronzato, 2007; Manconi & Pronzato, 2008).

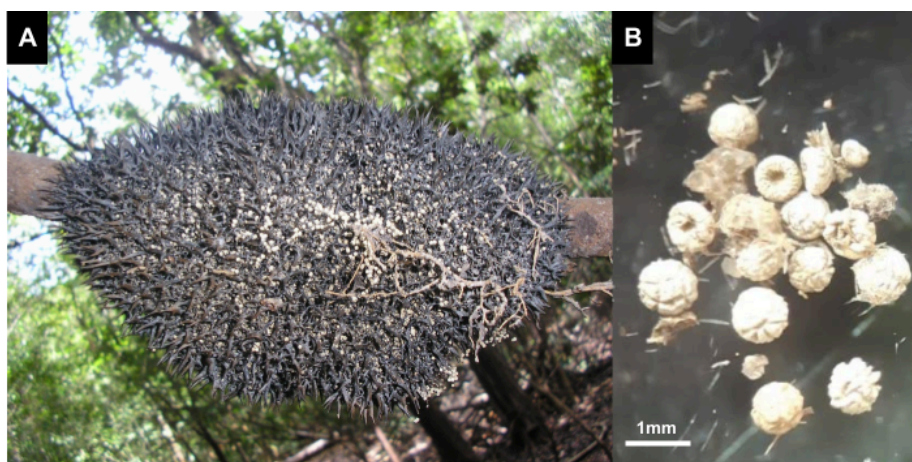


Figura 12: Corpo seco de uma esponja de água doce *Drulia brownii* com gêmulas (A). Gêmulas retiradas da esponja vistas sob a lupa (B).

Existe uma lacuna no registro fóssil entre o período Carbonífero e o Jurássico, em que até hoje não foram registrados fósseis de esponjas de água doce (Pronzato *et al.*, 2017). Uma primeira hipótese é que isso seria resultado do processo de aridização que se deu durante esse período e que teria reduzido o número de ambientes aquáticos no supercontinente. Outra possibilidade é que esses organismos teriam sucumbido a eventos de extinção em massa e posteriormente um novo processo de recolonização da água doce teria ocorrido durante o Jurássico (Schindler *et al.*, 2008). Atualmente a hipótese mais aceita é a de que as esponjas de água doce teriam surgido em um único evento que teria originado os organismos hoje pertencentes à ordem Spongillida. Esse grupo abriga todas as cerca de 250 espécies de água doce conhecidas atualmente e também as espécies fósseis. Um fator de destaque nesse grupo é a formação de gêmulas, característica possivelmente ancestral ainda conservada também em algumas espécies marinhas de seu grupo irmão, a ordem Haplosclerida (Manconi & Pronzato, 2007).

A colonização do ambiente de água doce demandou que as esponjas passassem por um processo de modificação tanto da sua fisiologia quanto da sua microbiota. Enquanto a água do mar apresenta uma concentração iônica relativamente próxima daquela dos fluidos corporais da maioria dos invertebrados marinhos, na água doce estas são muito mais baixas, fazendo com que a regulação osmótica e a perda de íons para o ambiente sejam desafios para a adaptação à vida nesses ambientes (Lee & Bell, 1999). Um estudo feito com três espécies de esponjas do Lago Baikal, na Rússia, encontrou modificações em uma diversidade de genes em resposta a essas condições ambientais. Genes fundamentais para a homeostase e funcionalidade celular, principalmente codificantes de proteínas transportadoras

transmembranas, apresentaram sinais de pressão evolutiva atuante em ao menos um sítio de sua estrutura (Kenny *et al.*, 2019). Além disso, foi observado um grande número de genes duplicados na filogenia dessas esponjas. Essa duplicação permite a ocorrência de mutações e modificações na regulação de genes antigos, permitindo a emergência de novas funções a partir deles.

Além disso, a colonização de novos ambientes também representa a ocupação de novos nichos, podendo levar a alterações no modo de vida dos organismos. Um exemplo é o das esponjas endêmicas do Lago Baikal. Este lago é o mais antigo (25 a 30 milhões de anos) e o mais profundo (1637m) lago existente na Terra e é conhecido por apresentar parâmetros ambientais únicos. Além de ser extremamente oligotrófico, suas águas têm altas taxas de oxigenação (>80% de saturação) e são extremamente cristalinas, com visibilidade de cerca de 40 m. A combinação de uma baixa disponibilidade de nutrientes na coluna d'água com a transparência da água que permite que a luz alcance dezenas de metros de profundidade favoreceu o estabelecimento da simbiose com microorganismos fotossintetizantes, claramente observada pela coloração dessas esponjas (Figura 13). Dessa forma, ocorre a modificação do modo de vida a partir de um ancestral possivelmente dependente da filtração para a obtenção de nutrientes, para um cenário no qual estes são preponderantemente obtidos a partir dos seus fotossimbiontes (Wilkinson, 1980; Annekova *et al.*, 2011; Chernogor *et al.*, 2013).

A microbiota das esponjas endêmicas desse lago mostrou-se predominantemente composta por microalgas dos filos Chlorophyta e Dinoflagellata. Análises mais detalhadas atribuíram as sequências dos dinoflagelados ao gênero *Gyrodinium*, formando um grupo monofilético irmão à espécie de vida livre *Gyrodinium helveticum*. Além disso, as sequências do filo Chlorophyta foram atribuídas ao gênero *Choricystis*, grupo irmão da espécie *Choricystis minor*, conhecida por suas associações simbióticas com outras esponjas de água doce (Kenny *et al.*, 2019). Esses resultados sugerem que esses grupos de microorganismos poderiam ter colonizado esse ambiente simultaneamente com seus hospedeiros (Annekova *et al.*, 2011; Kenny *et al.*, 2019).

Mais além, análises da comunidade procariótica associada a essas esponjas também mostraram que sua microbiota forma clusters endêmicos, incluindo apenas sequências provenientes do Lago Baikal e sem nenhuma atribuição a fotossimbiontes típicos de esponjas marinhas, como os do gênero *Synechococcus*. Essa proximidade entre as sequências de simbiontes com o bacterioplâncton local indica que a adaptação às condições ecológicas únicas a que essas esponjas estão expostas poderia ter resultado também no desenvolvimento

de novas relações de simbiose com microorganismos presentes nesse ambiente (Kulakova *et al.*, 2014).

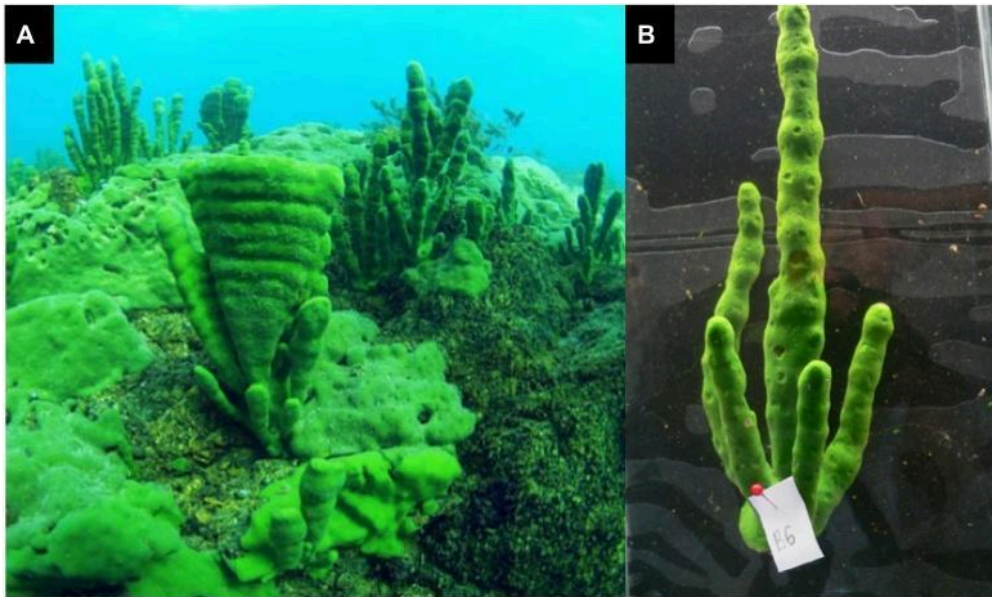


Figura 13: Fundo do Lago Baikal densamente ocupado por esponjas da família Lubomirskiidae (A - Annekova *et al.*, 2011). Exemplar de *Lubomirskia baikalensis* (B - Kenny *et al.*, 2019)

Situações similares são também encontradas em outras espécies no mundo. A espécie *Ephydatia muelleri* é descrita como cosmopolita, podendo ser encontrada em lagos e rios no Hemisfério Norte, além de ser considerada um modelo para o estudo de esponjas dulciaquícolas (e.g. Kenny *et al.*, 2020; Sudgen *et al.*, 2022). Um trabalho realizado com populações dessa espécie no Canadá observou que há uma consistência na composição da microbiota de indivíduos da mesma espécie mesmo ao comparar amostras de regiões geograficamente isoladas (Sudgen *et al.*, 2022). Esses resultados suportam a existência de uma microbiota conservada em esponjas, de forma semelhante àquela compartilhada por esponjas marinhas. Por outro lado, também foi possível detectar assinaturas específicas associadas a cada local de coleta, sendo que essas diferenças na microbiota não estão correlacionadas com a composição do plâncton desses locais. Isso indica que diferentes parâmetros ambientais podem moldar a comunidade simbiote dessas esponjas de forma a se adaptarem a condições específicas de cada habitat.

Análises funcionais também detectaram assinaturas características de associações bem estabelecidas, análogas às encontradas em esponjas marinhas, com genes ligados à preservação do genoma bacteriano, à modulação da resposta imune do hospedeiro e à produção de vitamina B₁₂ (Thomas *et al.*, 2010; Webster *et al.*, 2012; Sugden *et al.*, 2022).

Foram observadas também características únicas no perfil funcional dessas esponjas ligadas ao ambiente de água doce. A presença de genes codificantes de enzimas capazes de digerir carboidratos complexos e derivados da celulose indicam que parte da microbiota associada a *E. muelleri* aproveita esses compostos, que compõem grande parte da matéria orgânica dissolvida na água de rios e lagos. Além do mais, funções ligadas ao metabolismo de nitrogênio estão presentes nestas esponjas de maneira bem diferente daquela encontrada em esponjas marinhas. No ambiente marinho, predominam funções ligadas a nitrificação e oxidação de amônia, enquanto que nessa esponja a fixação de nitrogênio e redução de nitrato a amônia estão mais presentes. A natureza oligotrófica dos ambientes de água doce, em comparação com o meio marinho, pode ter favorecido o desenvolvimento de vias de produção e aproveitamento de amônia como forma de reciclagem de compostos nitrogenados, já que estes não se encontram tão prontamente disponíveis nesses ambientes (Sugden *et al.*, 2022).

Os resultados dos estudos aqui citados em conjunto com diversos outros trabalhos mostram que a estrutura da microbiota de esponjas de água doce pode apresentar características que são herança de uma origem única a partir de ancestrais marinhos. De fato, assim como em esponjas marinhas, a comunidade procariótica associada às poucas espécies de água doce já investigadas também é majoritariamente composta por *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* e *Actinobacteria* (Costa *et al.*, 2013; Gladkikh *et al.*, 2014; Sugden *et al.*, 2022). Além disso, foi observada uma grande similaridade entre sequências pertencentes a *Proteobacteria* e *Chlamydiae*, recuperadas a partir de diferentes espécies, possivelmente indicando que a microbiota estabelecida num primeiro momento da história evolutiva do grupo pode ter acompanhado esses organismos no processo de expansão de seus habitats (Costa *et al.*, 2013).

Apesar do conhecimento atual acerca da evolução das esponjas de água doce e suas associações microbianas ainda ser muito limitado, estudos como os citados nos trazem indicativos de que essas esponjas foram capazes de recrutar simbiontes novos à medida em que novos ambientes foram colonizados, estabelecendo relações complexas que foram passadas ao longo das gerações. As informações compiladas a partir desses estudos também permitem que comecem a ser delineados clusters filogenéticos específicos de esponjas de água doce e assinaturas específicas das relações hospedeiro-microbiota associadas a este ambiente. Entretanto, a imensa maioria da fauna de esponjas de água doce permanece ainda pouco explorada, sobretudo em continentes como a Ásia, a África e a própria América do Sul (Lo Giudice & Rizzo, 2023).

O Brasil é o país com a maior diversidade de esponjas de água doce no mundo (Kalinovsk *et al.*, 2016), atualmente contando com 60 espécies aceitas (tabela complementar 1), o que corresponde a cerca de 22% do total (270) (de Voogd *et al.*, 2023). A fauna brasileira de esponjas de água doce é composta por espécies das famílias Potamolepidae, Spongillidae e Metaniidae (tabela complementar 1), conhecidas pela sua ampla distribuição ao redor do globo. Potamolepidae está presente nas regiões Neotropical, Afrotropical e em Ilhas Oceânicas do Pacífico, enquanto Spongillidae e Metaniidae apresentam uma distribuição ao longo das regiões Neotropical, Afrotropical, Oriental, Australiana e Neártica (Manconi & Pronzato, 2008). Essas distribuições geográficas podem ser reflexo das origens ancestrais do grupo e do processo de colonização que se deu antes da separação dos continentes.

Por outro lado, ao analisar essa fauna, observa-se um alto nível de endemismo, com quase metade das espécies tendo sua distribuição restrita unicamente ao território brasileiro, sendo menos de 6% encontradas em outros continentes além da América do Sul (Pinheiro, 2007). Esse fenômeno pode ser consequência do baixo fluxo gênico entre populações que reflete a descontinuidade dos habitats de água doce. Dessa forma, a pressão evolutiva exercida por condições ambientais locais possivelmente tende a levar ao estabelecimento de características ecofenotípicas particulares. Estas consequentemente podem favorecer a diferenciação de populações e eventualmente levar a processos de especiação. Da mesma maneira que as esponjas, a sua microbiota associada também está sujeita às mesmas pressões ambientais, levando a formação de comunidades particularmente adaptadas à água doce e também a habitats específicos.

De fato, o processo de colonização de água doce ocorreu a partir de populações de esponjas marinhas que já possuíam uma microbiota estabelecida (Wilkinson, 1984). A partir daí, podemos elaborar algumas hipóteses de como a entrada e adaptação ao ambiente de água doce pode ter moldado a microbiota dessas esponjas. A primeira delas é que a microbiota associada às esponjas as acompanhou durante o processo de colonização e pouco se alterou ao longo desse processo. Uma segunda hipótese seria que durante este evento, a microbiota teria sido total ou parcialmente substituída por novas cepas adquiridas do ambiente recém colonizado, capazes de realizar papéis funcionais análogos àquelas perdidas anteriormente. Por último, que ao longo do processo de colonização da água doce a microbiota associada teria se mantido conservada, mas a relação funcional com a esponja hospedeira teria se modificado em reflexo ao novo ambiente colonizado.

Atualmente, pouco se sabe sobre a microbiota associada às esponjas de água doce da América do Sul e a maioria dos trabalhos existentes nessa área se dedica a estudar a porção cultivável do microbioma, com o objetivo de acessar o seu potencial biotecnológico (Rozas *et al.*, 2016; da Costa *et al.*, 2019). A composição e estrutura da microbiota associada à extensa maioria dessas esponjas, assim como as suas relações com aquela observada em outros grupos de porífera ainda é pouco conhecida. Sendo assim, o presente trabalho tem o objetivo de preencher essa lacuna, fazendo a caracterização da microbiota de duas espécies de esponjas de água doce (*Metania reticulata* e *Heteromeyenia cristalina*) e três espécies marinhas (*Amphimedon viridis*, *Haliclona melana* e *Cinachyrella alloclada*). Comparando os dados obtidos, espera-se obter informações que auxiliem a compreender como a microbiota pode refletir as relações filogenéticas e evolutivas do grupo. Além disso, foi feita também a comparação entre a microbiota de adultos e brotos de *C. alloclada* e entre adultos e gêmulas de *He. cristalina*. O objetivo foi observar se há consistência entre a microbiota nos adultos e nas estruturas de reprodução assexuada e verificar como vias de transmissão vertical e horizontal podem estar influenciando a estrutura do microbioma dessas esponjas. Compreender como a microbiota é estruturada em habitats distintos é importante para entender como o ambiente pode influenciar o microbioma e como essas estratégias podem ter influenciado a história evolutiva dessas associações.

Discussão geral e conclusão

Estudos entre diversos organismos e sua microbiota associada têm mostrado cada vez mais como esse tipo de relação simbiótica tem papel fundamental em diversos aspectos incluindo a história evolutiva dos organismos. Em esponjas, a relação com a microbiota envolve uma série de interações complexas entre o metabolismo dos microorganismos associados e o hospedeiro. Muitas destas foram estabelecidas em milhões de anos de processos seletivos exercidos não só pelo ambiente, mas também pelas próprias esponjas. Como resultado disso, podemos observar a existência de uma microbiota enriquecida em esponjas que está presente em espécies diferentes distribuídas ao longo dos oceanos. Ao mesmo tempo, porções da microbiota podem estar associadas de forma particular ou exclusiva a grupos restritos ou mesmo a espécies. Essa microbiota específica é composta por uma seleção de microorganismos que contribuem para o sucesso do holobionte no seu habitat e nicho em particular. A aquisição de novos simbioses, capazes de aumentar o sucesso evolutivo de uma linhagem de organismos, funciona como uma espécie de atalho evolutivo. Nesse contexto, o surgimento de novas associações a partir de cepas de vida livre presente nos ambientes pode ter sido uma estratégia fundamental para que os poríferos ocupassem com sucesso diferentes ecossistemas aquáticos, incluindo a água doce.

Neste trabalho, foi feita a caracterização da microbiota de duas espécies de esponjas dulçaquícolas (*He. cristalina* e *M. reticulata*) pela primeira vez. Além de contribuir com a expansão do conhecimento acerca das comunidades procarióticas associadas a esse grupo, os dados coletados permitiram fazer comparações com espécies marinhas filogeneticamente próximas, levando a potenciais pistas sobre como o processo de ocupação da água doce pode ter modificado o microbioma desses animais. A microbiota de esponjas de água doce se mostrou mais diversa e rica do que aquela de esponjas marinhas, corroborando com outros estudos comparativos entre os dois grupos. Grupos de microorganismos previamente descritos no microbioma de outras esponjas de água doce foram também detectados nessas esponjas, com destaque para o filo *Campylobacteria*, observado em altas abundâncias em esponjas pela primeira vez. Além disso, foi observada a presença de táxons bacterianos possuidores de vias metabólicas que podem indicar possíveis papéis funcionais no contexto do holobionte, como ciclagem de nitrogênio e a utilização de compostos derivados da lignina como substrato. Na literatura existem trabalhos demonstrando que genes expressos pela microbiota associada a esponjas de água doce podem ser associados a funções análogas

àquelas expressas pelo microbioma de esponjas marinhas. Genes característicos de simbioses ligados a mediação das relações hospedeiro-microbiota também foram detectados tanto no repertório da microbiota de esponjas marinhas quanto de água doce, reforçando a presença de uma redundância funcional entre esponjas desses diferentes ambientes. Além disso, funções típicas de simbioses de esponjas marinhas como a detoxificação e reaproveitamento de excretas nitrogenadas e produção de vitamina B₁₂ também estão presentes em esponjas de água doce.

Duas das espécies marinhas aqui estudadas, *Ha. melana* e *A. viridis*, pertencentes à ordem Haplosclerida, também tiveram seus microbiomas descritos pela primeira vez. Assim como outros membros dos gêneros *Haliclona* e *Amphimedon*, a microbiota dessas esponjas é dominada por poucas cepas. Essa é uma característica comum em esponjas classificadas como LMA, que pode estar relacionada a aspectos morfológicos e a capacidade filtradora de espécies classificadas neste grupo. Algumas das ASVs mais enriquecidas em ambas as espécies mostraram-se próximas a sequências identificadas previamente no microbioma de outros membros desses mesmos gêneros, inclusive de oceanos diferentes. Isso indica que essas associações são altamente específicas, também sugerindo a presença de transmissão horizontal de simbioses.

As observações feitas a partir do metabarcoding de *C. alloclada* corroboram com outros registros na literatura. Uma característica marcante foi a abundância de arqueias do filo *Thermoproteota*. Esse grupo, também encontrado em outras esponjas de águas rasas e em espécies carnívoras, está principalmente ligado a funções de detoxificação de excretas nitrogenadas. A presença de microorganismos capazes de ciclar compostos nitrogenados e evitar seu acúmulo nos tecidos do hospedeiro é bastante comum em diferentes táxons dentro de Porifera.

Comparações entre adultos e suas estruturas de reprodução assexuada evidenciaram altas taxas de similaridade entre seus microbiomas, principalmente ao compararmos esses dados aos obtidos a partir de estudos comparativos entre adultos e larvas de espécies marinhas. Isso pode ser resultado da morfogênese desse tipo de estrutura a partir de células do tecido adulto, favorecendo a passagem de uma porção maior do microbioma já estabelecido na esponja mãe.

A esponja de água doce *He. cristalina* apresentou a maior proporção de ASVs compartilhadas com suas gêmulas, compondo 97,73% do microbioma dessas estruturas. Apesar de não haver diferença significativa entre os índices de riqueza e diversidade, bactérias do grupo *Methylococcaceae* se mostraram mais enriquecidas em gêmulas. Essa

diferença pode ser resultado do enriquecimento diferencial de uma cepa com um papel funcional importante para esse holobionte, visto que o aproveitamento do metano produzido no ambiente de água doce poderia ser uma estratégia interessante nesse ambiente. Ao enriquecer cepas particulares, a passagem e manutenção desses microorganismos ao longo da passagem de gerações poderia ser assegurada.

Apesar de compartilharem uma porção considerável de seu microbioma com adultos, os brotos de *C. alloclada* apresentaram índices de diversidade e riqueza significativamente mais altos. Esses resultados indicam que meios de transmissão horizontal podem ter maior influência na composição do microbioma dessas estruturas em comparação com as gêmulas de esponjas de água doce. Além disso, diferenças no ciclo de vida dessas duas espécies também podem influenciar o quanto suas microbiotas podem ser variáveis. Enquanto brotos apresentam um papel central de reprodução assexuada e dispersão, gêmulas possuem uma função principal de resistência, uma vez que a maior parte delas permanecem fixadas ao esqueleto e o recoloniza após eventos desfavoráveis que resultam na morte dos tecidos da esponja mãe. Dessa forma, uma microbiota mais variável e flexível poderia favorecer o estabelecimento dos brotos de *C. alloclada* em locais com condições ambientais e desafios diferentes daqueles do local de origem, enquanto a manutenção de uma microbiota mais estável garantiria que a nova esponja formada a partir das gêmulas estaria adaptada ao ambiente habitado previamente pela esponja mãe.

De maneira geral, observamos que modos de transmissão vertical e horizontal estão presentes em formas de reprodução assexuada e sexuada e nos ambientes marinhos e de água doce. No entanto, o grau no qual esses modos influenciam na formação do microbioma parece variar de acordo com fatores específicos, como a história de vida das espécies e as características morfogênicas específicas de cada tipo de estrutura.

Ao comparar a comunidade procariótica associada a esponjas marinhas e dulçaquícolas, filos como *Proteobacteria* e *Actinobacteria* se mostraram enriquecidos em todas as espécies. A microbiota compartilhada consistiu de 100 ASVs das quais 16 foram consideradas parte do *core*. Estudos comparativos realizados com espécies marinhas ao redor do globo mostraram a existência de grupos de microorganismos compartilhados possivelmente transmitidos horizontalmente entre diferentes espécies. Nossas observações indicam que o conceito de microbiota compartilhada observado em espécies marinhas potencialmente pode ser expandido também para a água doce.

A análise da porção enriquecida do microbioma de cada ambiente também nos possibilitou observar indicativos de redundância funcional nesses organismos. Foi observada

a presença de microorganismos, nas esponjas de água doce, com vias metabólicas semelhantes às de simbiontes de esponjas marinhas, relacionadas à ciclagem de nitrogênio e aproveitamento de carbono dissolvido. Apesar da semelhança funcional, essas bactérias pertencem a grupos taxonômicos distintos daqueles organismos associados às esponjas marinhas, sendo mais próximos a grupos de vida livre presentes no ambiente aquático dulçaquícola. Essas observações indicam que o processo de colonização de novos ambientes implicou na modificação das relações de simbiose. Apesar dos papéis funcionais associados aos simbiontes terem se mantido estáveis ao longo do histórico evolutivo do grupo, a colonização dos ambientes de água doce favoreceu o estabelecimento de novas associações com grupos de microorganismos disponíveis no ambiente recentemente colonizado capazes de suprir as demandas metabólicas das esponjas hospedeiras.

Os resultados dos isolamentos bacterianos estão de acordo com outros resultados observados na literatura. Todas as cepas isoladas pertencem ao filo *Firmicutes*, sendo a maior parte delas pertencentes ao gênero *Bacillus* e apenas três cepas pertencentes a *Lysinibacillus*. Bactérias desses dois gêneros já foram isoladas de outras espécies de esponjas, sendo considerado um grupo bastante promissor em relação à produção de compostos de interesse biotecnológico. A baixa diversidade de grupos encontrados pode ser resultante da metodologia utilizada, favorecendo o crescimento de cepas que melhor se adaptam às condições de cultivo e não refletindo de maneira fiel a diversidade do microbioma das esponjas de origem.

Os dados resultantes da utilização tanto de técnicas dependentes quanto independentes de cultura nos possibilitaram observar particularidades do microbioma associado a esponjas de dois ambientes muito distintos. Essas comparações nos fornecem pistas sobre como alguns padrões globais presentes na microbiota de esponjas marinhas podem se estender também ao ambiente de água doce ao mesmo tempo que surgem indicativos de como o ambiente pode ter moldado as relações simbióticas em cada ambiente de maneira distinta.

Desde seu surgimento, os estudos acerca das relações simbióticas têm mudado paradigmas em diversas áreas da biologia. Este trabalho representa um pequeno passo em direção a compreensão dessas complexas interações entre organismos. Através do estudo das associações entre microorganismos e animais do filo Porifera, podemos obter *insights* sobre como essas comunidades são moldadas a partir de interações complexas entre fatores ambientais, relações ecológicas e processos evolutivos. Os resultados aqui obtidos não só enriquecem o conhecimento acerca de espécies pouco estudadas, mas também chamam a

atenção para o potencial ainda pouquíssimo compreendido e explorado dessa fauna, além de abrir caminhos e sinalizar pontos de interesse para estudos futuros na área.

Referências Bibliográficas

- Abdel-Haq, R., Schlachetzki, J. C., Glass, C. K., & Mazmanian, S. K. (2019). Microbiome–microglia connections via the gut–brain axis. *Journal of Experimental Medicine*, 216(1), 41-59.
- Allchurch, A., Mehrotra, R., Carmody, H., Monchanin, C., & Scott, C. M. (2022). Competition and epibiosis by the sponge *Pseudoceratina purpurea* (Carter, 1880) on scleractinian corals at a tourism hotspot in the Gulf of Thailand. *Regional Studies in Marine Science*, 49, 102131.
- Amelia, T. S. M., Suaberon, F. A. C., Vad, J., Fahmi, A. D. M., Saludes, J. P., & Bhubalan, K. (2022). Recent advances of marine sponge-associated microorganisms as a source of commercially viable natural products. *Marine Biotechnology*, 24(3), 492-512.
- Andriyono, S., Jalasena, B., Tjahtjaningsih, W., & Pramono, H. (2015). Characterisation of symbiotic bacteria isolated from sponge *Haliclona* sp. *Exploration and Conservation of Biodiversity*, 110.
- Annenkova, N. V., Lavrov, D. V., & Belikov, S. I. (2011). Dinoflagellates associated with freshwater sponges from the ancient Lake Baikal. *Protist*, 162(2), 222-236.
- Archibald, J. M. (2015). Endosymbiosis and eukaryotic cell evolution. *Current Biology*, 25(19), R911-R921.
- Astudillo-García, C., Bell, J. J., Montoya, J. M., Moitinho-Silva, L., Thomas, T., Webster, N. S., & Taylor, M. W. (2020). Assessing the strength and sensitivity of the core microbiota approach on a highly diverse sponge reef. *Environmental Microbiology*, 22(9), 3985-3999.
- Baedke, J., Fábregas-Tejeda, A., & Nieves Delgado, A. (2020). The holobiont concept before Margulis. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 334(3), 149-155.
- Bayer, K., Schmitt, S., & Hentschel, U. (2008). Physiology, phylogeny and in situ evidence for bacterial and archaeal nitrifiers in the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Environmental microbiology*, 10(11), 2942-2955.
- De Bary, H. A. (1878). Über Symbiose, *Tageblatt 51 Versamml. Deutscher Naturforscher und Aerzte*.
- De Bary, A. (1879). Die erscheinung der symbiose: Vortrag gehalten auf der versammlung deutscher naturforscher und aerzte zu cassel. Trübner.
- Bertin, M. J., Schwartz, S. L., Lee, J., Korobeynikov, A., Dorrestein, P. C., Gerwick, L., & Gerwick, W. H. (2015). Spongocin production by a *Vibrio harveyi* strain associated with the sponge *Tectitethya crypta*. *Journal of natural products*, 78(3), 493-499.
- Björk, J. R., Díez-Vives, C., Astudillo-García, C., Archie, E. A., & Montoya, J. M. (2019). Vertical transmission of sponge microbiota is inconsistent and unfaithful. *Nature Ecology & Evolution*, 3(8), 1172-1183.

- Bocci, V. (1992). The neglected organ: bacterial flora has a crucial immunostimulatory role. *Perspectives in Biology and Medicine*, 35(2), 251-260.
- Bonner, J. T. (1998). The origins of multicellularity. *Integrative Biology: Issues, News, and Reviews: Published in Association with The Society for Integrative and Comparative Biology*, 1(1), 27-36.
- Bordenstein, S. R., & Theis, K. R. (2015). Host biology in light of the microbiome: ten principles of holobionts and hologenomes. *PLoS biology*, 13(8), e1002226.
- Boury-Esnault N., Dohrmann M., Voogd N. J., Santodomingo N., Van Soest R. W. M., Vanhoorne B., Erpenbeck D., Vacelet J., Kelly M., Hooper J. N. A. (2012) Global Diversity of Sponges (Porifera). *PLoS One* 7:e35105.
- Braniste, V., Al-Asmakh, M., Kowal, C., Anuar, F., Abbaspour, A., Tóth, M., ... & Pettersson, S. (2014). The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Science translational medicine*, 6(263), 263ra158-263ra158.
- Brunk, C. F., & Martin, W. F. (2019). Archaeal histone contributions to the origin of eukaryotes. *Trends in Microbiology*, 27(8), 703-714.
- Busch, K., Slaby, B. M., Bach, W., Boetius, A., Clefsen, I., Colaço, A., ... & Hentschel, U. (2022). Biodiversity, environmental drivers, and sustainability of the global deep-sea sponge microbiome. *nature communications*, 13(1), 5160.
- Cammarota, G., Masucci, L., Ianiro, G., Bibbo, S., Dinoi, G., Costamagna, G., ... & Gasbarrini, A. (2015). Randomised clinical trial: faecal microbiota transplantation by colonoscopy vs. vancomycin for the treatment of recurrent *Clostridium difficile* infection. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 41(9), 835-843.
- Campana, S., Hudspith, M., Lankes, D., De Kluijver, A., Demey, C., Schoorl, J., ... & Goeij, J. M. (2021). Processing of naturally sourced macroalgal-and coral-dissolved organic matter (DOM) by high and low microbial abundance encrusting sponges. *Frontiers in Marine Science*, 8, 452.
- Carrapiço, F. (2015). Can we understand evolution without symbiogenesis? Reticulate evolution: Symbiogenesis, lateral gene transfer, hybridization and infectious heredity, 81-105.
- Carrapiço, F. (2010). How symbiogenic is evolution?. *Theory in Biosciences*, 129, 135-139.
- Carrier, T. J., Maldonado, M., Schmittmann, L., Pita, L., Bosch, T. C., & Hentschel, U. (2022). Symbiont transmission in marine sponges: reproduction, development, and metamorphosis. *BMC biology*, 20(1), 100.
- Carroll, A. R., Copp, B. R., Davis, R. A., Keyzers, R. A., & Prinsep, M. R. (2019). Marine natural products. *Natural product reports*, 36(1), 122-173.
- Chernogor, L., Denikina, N., Kondratov, I., Solovarov, I., Khanaev, I., Belikov, S., & Ehrlich, H. (2013). Isolation and identification of the microalgal symbiont from primmorphs of the endemic freshwater sponge *Lubomirskia baicalensis* (Lubomirskiidae, Porifera). *European journal of phycology*, 48(4), 497-508.

- Costa, R., Keller-Costa, T., Gomes, N. C., da Rocha, U. N., van Overbeek, L., & van Elsas, J. D. (2013). Evidence for selective bacterial community structuring in the freshwater sponge *Ephydatia fluviatilis*. *Microbial ecology*, 65, 232-244.
- da Costa, M. H. P., Burbano, R. M. R., dos Reis, H. S., & da Rocha, C. A. M. (2019). Evaluation of the cytotoxicity of extracts of the freshwater sponge *Drulia cristata* (Porifera: Metaniidae) from the Tapajós River. *Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)*, 9(4), 13-15.
- Cryan, J. F., O'Riordan, K. J., Cowan, C. S., Sandhu, K. V., Bastiaanssen, T. F., Boehme, M., ... & Dinan, T. G. (2019). The microbiota-gut-brain axis. *Physiological reviews*.
- Custódio, M. R., Hajdu, E., & Muricy, G. (2004). Cellular dynamics of in vitro allogeneic reactions of *Hymeniacidon heliophila* (Demospongiae: Halichondrida). *Marine Biology*, 144, 999-1010.
- Díez-Vives, C., Koutsouveli, V., Conejero, M., & Riesgo, A. (2022). Global patterns in symbiont selection and transmission strategies in sponges. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10, 1015592.
- Di Vincenzo, F., Del Gaudio, A., Petito, V., Lopetuso, L. R., & Scaldaferrì, F. (2023). Gut microbiota, intestinal permeability, and systemic inflammation: a narrative review. *Internal and Emergency Medicine*, 1-19.
- Dunn, J. D., Bosmani, C., Barisch, C., Raykov, L., Lefrançois, L. H., Cardenal-Muñoz, E., ... & Soldati, T. (2018). Eat prey, live: *Dictyostelium discoideum* as a model for cell-autonomous defenses. *Frontiers in immunology*, 8, 1906.
- Engelberts, J. P., Robbins, S. J., de Goeij, J. M., Aranda, M., Bell, S. C., & Webster, N. S. (2020). Characterization of a sponge microbiome using an integrative genome-centric approach. *The ISME Journal*, 14(5), 1100-1110.
- Engelberts, J. P., Abdul Wahab, M. A., Maldonado, M., Rix, L., Marangon, E., Robbins, S. J., ... & Webster, N. S. (2022). Microbes from Mum: symbiont transmission in the tropical reef sponge *Ianthella basta*. *ISME Communications*, 2(1), 90.
- Fan, L., Reynolds, D., Liu, M., Stark, M., Kjelleberg, S., Webster, N. S., & Thomas, T. (2012). Functional equivalence and evolutionary convergence in complex communities of microbial sponge symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(27), E1878-E1887.
- Fiore, C. L., Jarett, J. K., Olson, N. D., & Lesser, M. P. (2010). Nitrogen fixation and nitrogen transformations in marine symbioses. *Trends in microbiology*, 18(10), 455-463.
- Fondi, M., Emiliani, G., & Fani, R. (2009). Origin and evolution of operons and metabolic pathways. *Research in Microbiology*, 160(7), 502-512.
- Freeman, C. J., Easson, C. G., Matterson, K. O., Thacker, R. W., Baker, D. M., & Paul, V. J. (2020). Microbial symbionts and ecological divergence of Caribbean sponges: a new perspective on an ancient association. *The ISME Journal*, 14(6), 1571-1583.
- Garrett, W. S. (2015). Cancer and the microbiota. *Science*, 348(6230), 80-86.

- Garate, L., Blanquer, A., & Uriz, M. J. (2015). Calcareous spherules produced by intracellular symbiotic bacteria protect the sponge *Hemimycale columella* from predation better than secondary metabolites. *Marine Ecology Progress Series*, 523, 81-92.
- Gladkikh, A. S., Kalyuzhnaya, O. V., Belykh, O. I., Ahn, T. S., & Parfenova, V. V. (2014). Analysis of bacterial communities of two Lake Baikal endemic sponge species. *Microbiology*, 83, 787-797.
- Gloeckner, V., Wehrl, M., Moitinho-Silva, L., Gernert, C., Schupp, P., Pawlik, J. R., ... & Hentschel, U. (2014). The HMA-LMA dichotomy revisited: an electron microscopical survey of 56 sponge species. *The Biological Bulletin*, 227(1), 78-88.
- de Goeij, J. M., Moodley, L., Houtekamer, M., Carballeira, N. M., & Van Duyl, F. C. (2008). Tracing ¹³C-enriched dissolved and particulate organic carbon in the bacteria-containing coral reef sponge *Halisarca caerulea*: Evidence for DOM-feeding. *Limnology and Oceanography*, 53(4), 1376-1386.
- Gontier, N. (2016). Symbiosis, history of. In: Kliman, RL (ed) *Encyclopedia of Evolutionary Biology* (272-281).
- Grosberg, R. K., & Strathmann, R. R. (2007). The evolution of multicellularity: a minor major transition?. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 621-654.
- Guerrero, R., Piqueras, M., & Berlanga, M. (2002). Microbial mats and the search for minimal ecosystems. *International Microbiology*, 5, 177-188.
- Guerrero, R., & Berlanga, M. (2016). From the cell to the ecosystem: the physiological evolution of symbiosis. *Evolutionary Biology*, 43, 543-552.
- Han, Y., Li, Z., Miao, X., & Zhang, F. (2008). Statistical optimization of medium components to improve the chitinase activity of *Streptomyces* sp. Da11 associated with the South China Sea sponge *Craniella australiensis*. *Process Biochemistry*, 43(10), 1088-1093.
- Han, Y., & Perner, M. (2015). The globally widespread genus *Sulfurimonas*: versatile energy metabolisms and adaptations to redox clines. *Frontiers in microbiology*, 6, 989.
- Haldane, J. B. S. (1929). The origin of life. *Rationalist Annual*, 148, 3-10.
- Hardoim, C. C., Hardoim, P. R., Lôbo-Hajdu, G., Custódio, M. R., & Thomas, T. (2023). The microbiome of the sponge *Aplysina caissara* in two sites with different levels of anthropogenic impact. *FEMS Microbiology Letters*, 370, fnad064.
- Hentschel, U., Fieseler, L., Wehrl, M., Gernert, C., Steinert, M., Hacker, J., & Horn, M. (2003). Microbial diversity of marine sponges. *Sponges (Porifera)*, 59-88.
- Hoer, D. R., Gibson, P. J., Tommerdahl, J. P., Lindquist, N. L., & Martens, C. S. (2018). Consumption of dissolved organic carbon by Caribbean reef sponges. *Limnology and Oceanography*, 63(1), 337-351.
- Hoffmann, F., Larsen, O., Thiel, V., Rapp, H. T., Pape, T., Michaelis, W., & Reitner, J. (2005). An anaerobic world in sponges. *Geomicrobiology Journal*, 22(1-2), 1-10.

- Hooshangi, S., & Bentley, W. E. (2008). From unicellular properties to multicellular behavior: bacteria quorum sensing circuitry and applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(6), 550-555.
- Hu, B., Elinav, E., Huber, S., Strowig, T., Hao, L., Hafemann, A., ... & Flavell, R. A. (2013). Microbiota-induced activation of epithelial IL-6 signaling links inflammasome-driven inflammation with transmissible cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(24), 9862-9867.
- Indraningrat, A. A. G., Smidt, H., & Sipkema, D. (2016). Bioprospecting sponge-associated microbes for antimicrobial compounds. *Marine drugs*, 14(5), 87.
- Junca, H., Pieper, D. H., & Medina, E. (2022). The emerging potential of microbiome transplantation on human health interventions. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 20, 615-627.
- Kalinovsk, E. C. Z., Parolin, M., & Souza Filho, E. E. (2016). Esponjas de água doce na América do Sul: O estado da arte da produção científica no Brasil. *Terrae didática*, 12(1), 4-18.
- Kanakkanthara, A., Northcote, P. T., & Miller, J. H. (2016). Peloruside A: A lead non-taxoid-site microtubule-stabilizing agent with potential activity against cancer, neurodegeneration, and autoimmune disease. *Natural product reports*, 33(4), 549-561.
- Kang, D. W., Adams, J. B., Gregory, A. C., Borody, T., Chittick, L., Fasano, A., ... & Krajmalnik-Brown, R. (2017). Microbiota transfer therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study. *Microbiome*, 5(1), 1-16.
- Kenny, N. J., Plese, B., Riesgo, A., & Itskovich, V. B. (2019). Symbiosis, selection, and novelty: freshwater adaptation in the unique sponges of Lake Baikal. *Molecular Biology and Evolution*, 36(11), 2462-2480.
- Kenny, N. J., Francis, W. R., Rivera-Vicéns, R. E., Juravel, K., de Mendoza, A., Diez-Vives, C., ... & Leys, S. P. (2020). Tracing animal genomic evolution with the chromosomal-level assembly of the freshwater sponge *Ephydatia muelleri*. *Nature communications*, 11(1), 3676.
- Krikech, I., Jafarabadi, A. R., Leermakers, M., Le Penneç, G., Cappello, T., & Ezziyyani, M. (2022). Insights into bioaccumulation and bioconcentration of potentially toxic elements in marine sponges from the Northwestern Mediterranean coast of Morocco. *Marine Pollution Bulletin*, 180, 113770.
- Kohring, L. L., Ringelberg, D. B., Devereux, R., Stahl, D. A., Mittelman, M. W., & White, D. C. (1994). Comparison of phylogenetic relationships based on phospholipid fatty acid profiles and ribosomal RNA sequence similarities among dissimilatory sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 119(3), 303-308.
- Konig, H., Frohlich, J., Li, L., Wenzel, M., Droge, S., Breunig, A., ... & Brugerolle, G. (2007). The flagellates of the Australian termite *Mastotermes darwiniensis*: Identification of their symbiotic bacteria and cellulases. *SYMBIOSIS-REHOVOT*, 44(1/3), 51.

- Kowallik, K. V., & Martin, W. F. (2021). The origin of symbiogenesis: An annotated English translation of Mereschkowsky's 1910 paper on the theory of two plasma lineages. *Biosystems*, 199, 104281.
- Kubanek, J., Whalen, K. E., Engel, S., Kelly, S. R., Henkel, T. P., Fenical, W., & Pawlik, J. R. (2002). Multiple defensive roles for triterpene glycosides from two Caribbean sponges. *Oecologia*, 131, 125-136.
- Kulakova, N. V., Denikina, N. N., & Belikov, S. I. (2014). Diversity of bacterial photosymbionts in Lubomirskiidae sponges from Lake Baikal. *International Journal of Biodiversity*, 2014, 152097.
- Kumar, D., & Pannu, R. (2018). Perspectives of lindane (γ -hexachlorocyclohexane) biodegradation from the environment: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1), 1-18.
- Lackner, G., Peters, E. E., Helfrich, E. J., & Piel, J. (2017). Insights into the lifestyle of uncultured bacterial natural product factories associated with marine sponges. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(3), E347-E356.
- Lee, C. E., & Bell, M. A. (1999). Causes and consequences of recent freshwater invasions by saltwater animals. *Trends in Ecology & Evolution*, 14(7), 284-288.
- Lee, Y. K., Lee, J. H., & Lee, H. K. (2001). Microbial symbiosis in marine sponges. *Journal of Microbiology*, 39(4), 254-264.
- Leys, S. P., Yahel, G., Reidenbach, M. A., Tunnicliffe, V., Shavit, U., & Reiswig, H. M. (2011). The sponge pump: the role of current induced flow in the design of the sponge body plan. *PloS one*, 6(12), e27787.
- Leys, S. P., & Hill, A. (2012). The physiology and molecular biology of sponge tissues. *Advances in marine biology*, 62, 1-56.
- Lipnicki, L. I. (2015). The role of symbiosis in the transition of some eukaryotes from aquatic to terrestrial environments. *Symbiosis*, 65, 39-53.
- López-García, P., Eme, L., & Moreira, D. (2017). Symbiosis in eukaryotic evolution. *Journal of theoretical biology*, 434, 20-33.
- López-Legentil, S., Song, B., McMurray, S. E., & Pawlik, J. R. (2008). Bleaching and stress in coral reef ecosystems: hsp70 expression by the giant barrel sponge *Xestospongia muta*. *Molecular Ecology*, 17(7), 1840-1849.
- Love, G. D., Grosjean, E., Stalvies, C., Fike, D. A., Grotzinger, J. P., Bradley, A. S., ... & Summons, R. E. (2009). Fossil steroids record the appearance of Demospongiae during the Cryogenian period. *Nature*, 457(7230), 718-721.
- Lu, Z. (2020). Microbiota research: From history to advances. In *E3S Web of Conferences* (Vol. 145, p. 01014). EDP Sciences.
- Maldonado, M., & Riesgo, A. (2009). Gametogenesis, embryogenesis, and larval features of the oviparous sponge *Petrosia ficiformis* (Haplosclerida, Demospongiae). *Marine Biology*, 156, 2181-2197.

- Maldonado, M., Ribes, M., & van Duyl, F. C. (2012). Nutrient fluxes through sponges: biology, budgets, and ecological implications. *Advances in marine biology*, 62, 113-182.
- Manconi, R., & Pronzato, R. (2007). Gemmules as a key structure for the adaptive radiation of freshwater sponges: a morphofunctional and biogeographical study. *Porifera research: biodiversity, innovation and sustainability*. Museu Nacional, Rio de Janeiro, 61-77.
- Manconi R, Pronzato R (2008) Global diversity of sponges (Porifera: Spongillina) in freshwater. *Hydrobiologia* 595:27–33.
- Margulis, L. (1970). *Origin of eukaryotic cells*. Yale: Yale University Press.
- Margulis, L., & Fester, R. (Eds.). (1991). *Symbiosis as a source of evolutionary innovation: speciation and morphogenesis*. MIT press.
- Mazmanian, S. K., Round, J. L., & Kasper, D. L. (2008). A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature*, 453(7195), 620-625.
- Meyer-Abich, A. (1943). I. Das typologische Grundgesetz und seine Folgerungen für Phylogenie und Entwicklungsphysiologie. *Acta Biotheoretica*, 7(1-2), 1-80.
- McFall-Ngai, M. J. (2001). Identifying ‘prime suspects’: symbioses and the evolution of multicellularity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 129(4), 711-723.
- Mohapatra, B. R., Bapuji, M., & Sree, A. J. A. B. (2003). Production of industrial enzymes (amylase, carboxymethylcellulase and protease) by bacteria isolated from marine sedentary organisms. *Acta Biotechnologica*, 23(1), 75-84.
- Moitinho-Silva, L., Bayer, K., Cannistraci, C. V., Giles, E. C., Ryu, T., Seridi, L., ... & Hentschel, U. (2014). Specificity and transcriptional activity of microbiota associated with low and high microbial abundance sponges from the Red Sea. *Molecular ecology*, 23(6), 1348-1363.
- Moitinho-Silva, L., Nielsen, S., Amir, A., Gonzalez, A., Ackermann, G. L., Cerrano, C., ... & Thomas, T. (2017). The sponge microbiome project. *Gigascience*, 6(10), gix077.
- Morais, L. H., Schreiber IV, H. L., & Mazmanian, S. K. (2021). The gut microbiota–brain axis in behaviour and brain disorders. *Nature Reviews Microbiology*, 19(4), 241-255.
- Moran, N. A. (2007). Symbiosis as an adaptive process and source of phenotypic complexity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(suppl_1), 8627-8633.
- Moreno-Pino, M., Cristi, A., Gillooly, J. F., & Trefault, N. (2020). Characterizing the microbiomes of Antarctic sponges: a functional metagenomic approach. *Scientific reports*, 10(1), 645.
- Nguyen, M. T., Liu, M., & Thomas, T. (2014). Ankyrin-repeat proteins from sponge symbionts modulate amoebal phagocytosis. *Molecular Ecology*, 23(6), 1635-1645.

- Oliveira, B. F. R., Freitas-Silva, J., Sánchez-Robinet, C., & Laport, M. S. (2020a). Transmission of the sponge microbiome: moving towards a unified model. *Environmental Microbiology Reports*, 12(6), 619-638.
- Oliveira, B. F. R., Carr, C. M., Dobson, A. D., & Laport, M. S. (2020b). Harnessing the sponge microbiome for industrial biocatalysts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(19), 8131-8154.
- Oparin, A. I. (1924). Proiskhozhdenie zhizny (The origin of life, Ann. Synge. Trans.) In: Bernal JD (ed) The origin of life. Weidenfeld and Nicholson, London.
- Ortega, M. A., Álvarez-Mon, M. A., García-Montero, C., Fraile-Martínez, Ó., Monserrat, J., Martínez-Rozas, L., ... & Lahera, G. (2023). Microbiota–gut–brain axis mechanisms in the complex network of bipolar disorders: potential clinical implications and translational opportunities. *Molecular Psychiatry*, 1-29.
- Pankey, M., Plachetzki, D. C., Macartney, K. J., Gastaldi, M., Slattery, M., Gochfeld, D. J., & Lesser, M. P. (2022). Cophylogeny and convergence shape holobiont evolution in sponge–microbe symbioses. *Nature Ecology & Evolution*, 6(6), 750-762.
- Pinheiro, U. S. (2007). Contribuições a Taxonomia e Biogeografia das Esponjas de Águas Continentais (Doctoral dissertation, Universidade Federal do Rio de Janeiro).
- Pita, L., Turon, X., López-Legentil, S., & Erwin, P. M. (2013). Host rules: spatial stability of bacterial communities associated with marine sponges (*Ircinia* spp.) in the Western Mediterranean Sea. *FEMS microbiology ecology*, 86(2), 268-276.
- Pita, L., Rix, L., Slaby, B. M., Franke, A., & Hentschel, U. (2018). The sponge holobiont in a changing ocean: from microbes to ecosystems. *Microbiome*, 6(1), 1-18.
- Poppell, E., Weisz, J., Spicer, L., Massaro, A., Hill, A., & Hill, M. (2014). Sponge heterotrophic capacity and bacterial community structure in high- and low-microbial abundance sponges. *Marine Ecology*, 35(4), 414-424.
- Posadas, N., Baquiran, J. I. P., Nada, M. A. L., Kelly, M., & Conaco, C. (2022). Microbiome diversity and host immune functions influence survivorship of sponge holobionts under future ocean conditions. *The ISME Journal*, 16(1), 58-67.
- Pronzato, R., Pisera, A., & Manconi, R. (2017). Fossil freshwater sponges: taxonomy, geographic distribution, and critical review. *Acta Palaeontologica Polonica*, 62(3), 468-495.
- Reitner, J., & Wörheide, G. (2002). Non-lithistid fossil Demospongiae—origins of their palaeobiodiversity and highlights in history of preservation. *Systema Porifera: A guide to the classification of sponges*, 52-68.
- Reynolds, D., & Thomas, T. (2016). Evolution and function of eukaryotic-like proteins from sponge symbionts. *Molecular ecology*, 25(20), 5242-5253.
- Ribes, M., Jiménez, E., Yahel, G., López-Sendino, P., Diez, B., Massana, R., ... & Coma, R. (2012). Functional convergence of microbes associated with temperate marine sponges. *Environmental microbiology*, 14(5), 1224-1239.

- Ribes, M., Calvo, E., Movilla, J., Logares, R., Coma, R., & Pelejero, C. (2016). Restructuring of the sponge microbiome favors tolerance to ocean acidification. *Environmental Microbiology Reports*, 8(4), 536-544.
- Rix, L., de Goeij, J. M., van Oevelen, D., Struck, U., Al-Horani, F. A., Wild, C., & Naumann, M. S. (2018). Reef sponges facilitate the transfer of coral-derived organic matter to their associated fauna via the sponge loop. *Marine Ecology Progress Series*, 589, 85-96.
- Rozas, E. E., Mendes, M. A., Nascimento, C. A., Rodrigues, J. C., Albano, R. M., & Custódio, M. R. (2016). Reduction of RBL-2H3 cells degranulation by nitroaromatic compounds from a *Bacillus* strain associated to the Amazonian sponge *Metania reticulata*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 96(2), 567-572.
- Sabarathnam, B., Manilal, A., Sujith, S., Kiran, G. S., Selvin, J., Thomas, A., & Ravji, R. (2010). Role of sponge associated actinomycetes in the marine phosphorous biogeochemical cycles. *American-Eurasian journal of agriculture and environmental sciences*, 8, 253-256.
- Sachs, J. L., & Hollowell, A. C. (2012). The origins of cooperative bacterial communities. *MBio*, 3(3), 10-1128.
- Saia, F. T., Souza, T. S., Duarte, R. T. D., Pozzi, E., Fonseca, D., & Foresti, E. (2016). Microbial community in a pilot-scale bioreactor promoting anaerobic digestion and sulfur-driven denitrification for domestic sewage treatment. *Bioprocess and biosystems engineering*, 39, 341-352.
- Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *Journal of theoretical biology*, 14(3), 225-IN6.
- Santos-Gandelman, J., Giambiagi-deMarval, M., MR Oelemann, W., & S Laport, M. (2014a). Biotechnological potential of sponge-associated bacteria. *Current pharmaceutical biotechnology*, 15(2), 143-155.
- Santos-Gandelman, J. F., Giambiagi-deMarval, M., Muricy, G., Barkay, T., & Laport, M. S. (2014b). Mercury and methylmercury detoxification potential by sponge-associated bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106, 585-590.
- Sapp, J. (2004). The dynamics of symbiosis: an historical overview. *Canadian Journal of Botany*, 82(8), 1046-1056.
- Schindler, T., Wuttke, M., & Poschmann, M. (2008). Oldest record of freshwater sponges (Porifera: Spongillina)—spiculite finds in the Permo-Carboniferous of Europe. *Paläontologische Zeitschrift*, 82, 373-384.
- Schmitt, S., Tsai, P., Bell, J., Fromont, J., Ilan, M., Lindquist, N., ... & Taylor, M. W. (2012). Assessing the complex sponge microbiota: core, variable and species-specific bacterial communities in marine sponges. *The ISME Journal*, 6(3), 564-576.
- Schuster A, Vargas S, Knapp IS, Pomponi SA, Toonen RJ, Erpenbeck D, Wörheide G (2018) Divergence times in demosponges (Porifera): First insights from new mitogenomes and the inclusion of fossils in a birth-death clock model. *BMC Evol. Biol.* 18:1–11.

- Sharp, K. H., Eam, B., Faulkner, D. J., & Haygood, M. G. (2007). Vertical transmission of diverse microbes in the tropical sponge *Corticium* sp. *Applied and environmental microbiology*, 73(2), 622-629.
- Shulman, S. T., Friedmann, H. C., & Sims, R. H. (2007). Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician?. *Clinical infectious diseases*, 45(8), 1025-1029.
- Simister, R. L., Deines, P., Botté, E. S., Webster, N. S., & Taylor, M. W. (2012). Sponge-specific clusters revisited: a comprehensive phylogeny of sponge-associated microorganisms. *Environmental Microbiology*, 14(2), 517-524.
- Simkovsky, R., Daniels, E. F., Tang, K., Huynh, S. C., Golden, S. S., & Brahmsha, B. (2012). Impairment of O-antigen production confers resistance to grazing in a model amoeba–cyanobacterium predator–prey system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(41), 16678-16683.
- Simpson T. L., Fell P. E. (1974) Dormancy among the Porifera: Gemmule Formation and Germination in Fresh-Water and Marine Sponges. *Transactions of the American Microscopical Society*, Vol . 93 , No . 4 , Symposium : Perspectives. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 93:544–577.
- Slaby, B. M., Franke, A., Rix, L., Pita, L., Bayer, K., Jahn, M. T., & Hentschel, U. (2019). Marine sponge holobionts in health and disease. *Symbiotic microbiomes of coral reefs sponges and corals*, 81-104.
- Steinert, G., Rohde, S., Janussen, D., Blaurock, C., & Schupp, P. J. (2017). Host-specific assembly of sponge-associated prokaryotes at high taxonomic ranks. *Scientific reports*, 7(1), 2542.
- Sugden, S., Holert, J., Cardenas, E., Mohn, W. W., & Stein, L. Y. (2022). Microbiome of the freshwater sponge *Ephydatia muelleri* shares compositional and functional similarities with those of marine sponges. *The ISME Journal*, 16(11), 2503-2512.
- Tang, C. (2013). Biography of Professor Martinus Willem Beijerinck. *Journal of Applied Virology*, 2(3), 4-5.
- Thomas, T., Rusch, D., DeMaere, M. Z., Yung, P. Y., Lewis, M., Halpern, A., ... & Kjelleberg, S. (2010). Functional genomic signatures of sponge bacteria reveal unique and shared features of symbiosis. *The ISME journal*, 4(12), 1557-1567.
- Thomas, T., Moitinho-Silva, L., Lurgi, M., Björk, J. R., Easson, C., Astudillo-García, C., ... & Webster, N. S. (2016). Diversity, structure and convergent evolution of the global sponge microbiome. *Nature communications*, 7(1), 11870.
- Tirard, S. (2017). JBS Haldane and the origin of life. *Journal of genetics*, 96(5), 735-739.
- Uriz, M. J., Agell, G., Blanquer, A., Turon, X., & Casamayor, E. O. (2012). Endosymbiotic calcifying bacteria: a new cue to the origin of calcification in metazoa?. *Evolution*, 66(10), 2993-2999.
- Van Soest, R. W., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Dohrmann, M., Erpenbeck, D., De Voogd, N. J., ... & Hooper, J. N. (2012). Global diversity of sponges (Porifera). *PLoS one*, 7(4), e35105.

- Van Duyl, F. C., Hegeman, J., Hoogstraten, A., & Maier, C. (2008). Dissolved carbon fixation by sponge–microbe consortia of deep water coral mounds in the northeastern Atlantic Ocean. *Marine Ecology Progress Series*, 358, 137-150.
- Vogel, S. (1977). Current-induced flow through living sponges in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(5), 2069-2071.
- de Voogd, N.J.; Alvarez, B.; Boury-Esnault, N.; Cárdenas, P.; Díaz, M.-C.; Dohrmann, M.; Downey, R.; Goodwin, C.; Hajdu, E.; Hooper, J.N.A.; Kelly, M.; Klautau, M.; Lim, S.C.; Manconi, R.; Morrow, C.; Pinheiro, U.; Pisera, A.B.; Ríos, P.; Rützler, K.; Schönberg, C.; Turner, T.; Vacelet, J.; van Soest, R.W.M.; Xavier, J. (2023). World Porifera Database. Accessed at <https://www.marinespecies.org/porifera> on 2023-10-17. doi:10.14284/359
- Wang, B., & Qiu, Y. L. (2006). Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*, 16, 299-363.
- Wang, X., Hu, S., Gan, L., Wiens, M., & Müller, W. E. (2010). Sponges (Porifera) as living metazoan witnesses from the Neoproterozoic: biomineralization and the concept of their evolutionary success. *Terra Nova*, 22(1), 1-11.
- Wang, J. W., Kuo, C. H., Kuo, F. C., Wang, Y. K., Hsu, W. H., Yu, F. J., ... & Wu, D. C. (2019). Fecal microbiota transplantation: Review and update. *Journal of the Formosan Medical Association*, 118, S23-S31.
- Webster, N. S., Cobb, R. E., & Negri, A. P. (2008). Temperature thresholds for bacterial symbiosis with a sponge. *The ISME journal*, 2(8), 830-842.
- Webster, N. S., & Taylor, M. W. (2012). Marine sponges and their microbial symbionts: love and other relationships. *Environmental microbiology*, 14(2), 335-346.
- Webster, N. S., & Thomas, T. (2016). The sponge hologenome. *MBio*, 7(2), 10-1128.
- Weisz, J. B., Lindquist, N., & Martens, C. S. (2008). Do associated microbial abundances impact marine demosponge pumping rates and tissue densities?. *Oecologia*, 155, 367-376.
- Wiens, M., Korzhev, M., Perović-Ottstadt, S., Luthringer, B., Brandt, D., Klein, S., & Müller, W. E. (2007). Toll-like receptors are part of the innate immune defense system of sponges (Demospongiae: Porifera). *Molecular Biology and Evolution*, 24(3), 792-804.
- Wilkinson, C. R. (1980). Nutrient translocation from green algal symbionts to the freshwater sponge *Ephydatia fluviatilis*. *Hydrobiologia*, 75, 241-250.
- Wilkinson, C. R. (1984). Immunological evidence for the Precambrian origin of bacterial symbioses in marine sponges. *Proceedings of the Royal society of London. Series B. Biological sciences*, 220(1221), 509-518.
- Wilkinson, C. R., Summons, R. E., & Evans, E. (1999). Nitrogen fixation in symbiotic marine sponges: ecological significance and difficulties in detection. *Memoirs of the Queensland Museum*, 44(1-2), 667-673.

- Yuen, B., Bayes, J. M., & Degnan, S. M. (2014). The characterization of sponge NLRs provides insight into the origin and evolution of this innate immune gene family in animals. *Molecular Biology and Evolution*, 31(1), 106-120.
- Zhang, F., Blasiak, L. C., Karolin, J. O., Powell, R. J., Geddes, C. D., & Hill, R. T. (2015). Phosphorus sequestration in the form of polyphosphate by microbial symbionts in marine sponges. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(14), 4381-4386.
- Zhang, F., Jonas, L., Lin, H., & Hill, R. T. (2019). Microbially mediated nutrient cycles in marine sponges. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(11), fiz155.
- Zilber-Rosenberg, I., & Rosenberg, E. (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS microbiology reviews*, 32(5), 723-735.