

PAULA CRISTINA WALGER DE CAMARGO LIMA

ESTUDO EVOLUTIVO DOS PADRÕES DE SULFATAÇÃO DE DERMATAM SULFATO EM ASCÍDIAS

Monografia apresentada ao Curso de Oceanografia, Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do Bacharelado em Oceanografia.

Orientador: Mauro Sérgio Gonçalves Pavão

m
596.2
b 43.2e
2005
ex. 01

PONTAL DO PARANÁ
2005

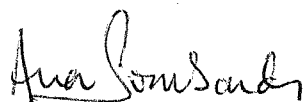
M2005 06

TERMO DE APROVAÇÃO

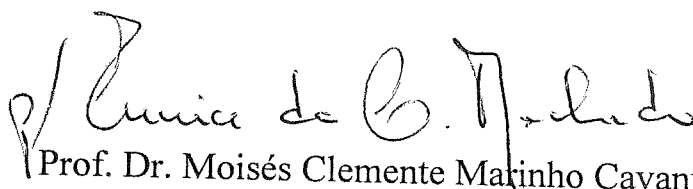
Paula Cristina Walger de Camargo Lima

**“ESTUDO EVOLUTIVO DOS PADRÕES DE SULFATAÇÃO DE
DERMATAM SULFATO EM ASCÍDIAS”.**

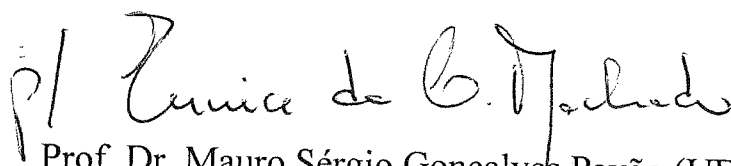
Monografia aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de
Bacharel em Oceanografia, da Universidade Federal do Paraná, pela
Comissão formada pelos professores:



Prof^a. Dr^a. Ana Tereza Lombardi



Prof. Dr. Moisés Clemente Marinho Cavante (UFRJ)



Prof. Dr. Mauro Sérgio Gonçalves Pavão (UFRJ)
Presidente

Pontal do Paraná, 10 de novembro de 2005.

“É muito importante que o homem tenha ideais. Sem eles, não se vai a parte alguma. No entanto, é irrelevante alcançá-los ou não. É apenas necessário mantê-los vivos e procurar atingi-los”

Dalai-Lama

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Laboratório de Tecido Conjuntivo da Universidade Federal do Rio de Janeiro, por ceder toda a infra-estrutura que possibilitou a elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Mauro Pavão por sua orientação, amizade, compreensão, incentivo e por acreditar em minha capacidade, me dando a oportunidade maravilhosa de trabalhar em seu laboratório.

Em especial à minha grande amiga Eliene por todo seu apoio, dedicação, disponibilidade e paciência. Afinal, o que seria de mim sem a Eli!!!

Ao Celso por me ajudar na coleta das minhas ascídias e pelos momentos de amizade e descontração.

Ao Fábio pelos conselhos e dicas das baladas cariocas.

Ao João, Rafael, Ricardo, Cíntia e Tuane por terem me ajudado com minhas adoradas colunas.

Ao pessoal do laboratório por todo auxílio, amizade e companheirismo.

Às minhas amigonas cariocas Laisa e Natália, grandes parceiras de cervejinha, praia, shows, corridas, baladas e roubadas.

Ao Pietro pelo amor, carinho e compreensão nos momentos que estive ausente.

À minha família pelo incentivo e preocupação enquanto estive no Rio.

À Helô pelos telefonemas e mensagens de apoio e carinho.

Ao meu pai e minha mãe por todo o amor e pensamentos positivos transmitidos em cada telefonema, durante os meses em que fiquei longe. Obrigada por terem cuidado do Yuca!!!

Babaji, Babaji, Babaji!!!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
RESUMO.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	7
2.1. OBJETIVO GERAL.....	7
2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
4. RESULTADOS.....	11
4.1 EXTRAÇÃO DOS GAGs DAS ASCÍDIAS.....	11
4.2 PURIFICAÇÃO DOS GAGs ASCÍDIAS.....	12
4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS GAGs DAS ASCÍDIAS	14
5. DISCUSSÃO.....	17
6. CONCLUSÃO.....	19
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20

LISTA DE ABREVIações

C = carbono

CPC= cloreto de cetil piridina

CS = condroitim sulfato

DMB = 9-azul de dimetilmetileno

DS =dermatam sulfato

EDTA= ácido etilenodiaminotetraacético

FPLC= cromatografia líquida por pressão

GAGs = glicosaminoglicanos

Gal= galactose

GalNac = N-acetil-galactosamina

GlcN= glucosamina

GlcNac = N-acetil-glucosamina

GlcUA = ácido glucurônico

HCl = ácido clorídrico

HEP = heparina

HexUA = ácido hexurônico

HPLC= cromatografia líquida de alta performance

HNO₂= ácido nitroso

HP = heparam sulfato

IdUA = ácido idurônico

NaCl = cloreto de sódio

Na₂CO₃= carbonato de sódio

Pd = padrão

QS= queratam sulfato

Tris = hidroximetil-aminometano

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- PRINCIPAIS GAGs E SUAS UNIDADES DISSACARÍDICAS.....	2
FIGURA 2- DESENHO ESQUEMÁTICO MOSTRANDO A FILOGÊNIA DOS UROCORDADOS, SWALLA (2000).....	4
FIGURA 3- COMPARAÇÃO DA ESTRUTURA DE UM ADULTO E DE UMA LARVA DE ASCÍDIA, ROCHA (2001).....	5
FIGURA 4- UNIDADES DISSACARÍDICAS REPETITIVAS DO DS DE MAMÍFERO, <i>Phallusia nigra</i> , <i>Styela plicata</i> e <i>Halocynthia pyriformis</i>	6
FIGURA 5- FOTOGRAFIA DAS ESPÉCIES ESTUDADAS: <i>Ciona intestinalis</i> E <i>Herdmania momus</i> , GITTENBERGER (2002).....	7
FIGURA 6- GEL DE AGAROSE DOS POLISSACARÍDEOS TOTAIS DE <i>Ciona intestinalis</i> (A) E <i>Herdmania momus</i> (B) ANTES E DEPOIS DA INCUBAÇÃO COM ÁCIDO NITROSO E CONDROITINASE AC E AB.....	11
FIGURA 7- (A) PURIFICAÇÃO DO DS DE <i>Ciona intestinalis</i> EM COLUNA DE TROCA IÔNICA MONO Q-FPLC. (B) GEL DE AGAROSE INDICANDO O DS PURIFICADO NO PICO 3	13
FIGURA 8- (A) PURIFICAÇÃO DO DS DE <i>Herdmania momus</i> EM COLUNA DE TROCA IÔNICA MONO Q-FPLC. (B) GEL DE AGAROSE INDICANDO O DS PURIFICADO NO PICO 2.....	13
FIGURA 9- GEL DE AGAROSE COMPARANDO O DS PURIFICADO DAS ASCÍDIAS PERTENCENTES ÀS ORDENS STOLIDOBRANCHIA E PHLEBOBRANCHIA.....	14
FIGURA 10- GEL BARBITAL COMPARANDO O PESO MOLECULAR DO DS PURIFICADO DAS ASCÍDIAS E DE MAMÍFERO.....	14
FIGURA 11- ANÁLISE DOS DISSACARÍDEOS PADRÕES EM COLUNA DE TROCA IÔNICA FORTE SAX-HPLC.....	15
FIGURA 12- ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DISSACARÍDICA DO DS PURIFICADO DE <i>Ciona intestinalis</i> (A) E <i>Herdmania momus</i> (B) EM COLUNA DE TROCA IÔNICA FORTE SAX-HPLC	15

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- COMPOSIÇÃO DISSACARÍDICA DO DERMATAM SULFATO DAS ASCÍDIAS E DE MAMÍFERO (%). ^{(a} PICOS PADRÕES EM ORDEM DE ELUIÇÃO, ^b PAVÃO <i>et al.</i> , 1998 E ^c PAVÃO <i>et al.</i> , 1995).....	16
---	----

RESUMO

Dermatam sulfato (DS) é membro da família de polissacarídeos lineares sulfatados, estruturalmente complexos, denominados glicosaminoglicanos. Ele é composto principalmente por $[4-\alpha\text{-L-IdoA-1}\rightarrow 3-\beta\text{-D-GalNAc-1}]_n$ e $[4-\alpha\text{-L-GlcA-1}\rightarrow 3-\beta\text{-D-GalNAc-1}]_n$ e seus derivados com grupos sulfato nas posições C-2 do L-IduA e C-4 e/ou C-6 da D-GalNAc. Dentre os tunicados, a classe Ascidiacea é a maior e mais diversa, sendo seus organismos considerados uma rica fonte de polissacarídeos sulfatados. No presente trabalho, dermatam sulfato de duas espécies de ascídias separadas evolutivamente, da ordem Stolidobranchia e Phlebobranchia, foram isolados e caracterizados. A análise dissacarídica de dermatam sulfato mostrou que na espécie mais primitiva, pertencente à ordem Stolidobranchia, *Herdmania momus*, a maioria das unidades dissacarídicas apresentam sulfatação no carbono 4 da N-acetilgalactosamina, enquanto que em espécie mais evoluída, da ordem Phlebobranchia, a *Ciona intestinalis*, grande parte dos grupos sulfatos estão posicionados no carbono 6 da N-acetilgalactosamina. Resultados similares foram verificados em estudos anteriores, realizados com outras espécies de ascídias pertencentes às mesmas ordens. Desta forma, sugere-se que o aparecimento de uma sulfotransferase específica para o carbono 6 da galactosamina, em polímeros de dermatam sulfato, surgiu mais recentemente no processo evolutivo dos glicosaminoglicanos.

Palavras chaves: glicosaminoglicanos, dermatam sulfato, ascídias.

1. INTRODUÇÃO

Glicosaminoglicanos (GAGs), são polímeros lineares formados por unidades dissacarídicas repetitivas, contendo um ácido hexurônico (ácido- α -L-Idurônico; IdUA ou ácido- β -D-glucurônico; GlcUA) e uma hexosamina (N-acetil-galactosamina; GalNac ou N-acetil-glucosamina; GlcNac). Nos GAGs sulfatados, uma ou mais hidroxilas da hexosamina e/ou ácido hexurônico estão esterificadas com sulfato (LEHNINGER, 1995). A combinação de grupos sulfatados e carboxilados dá aos GAGs uma alta densidade de cargas negativas. A interação com diferentes proteínas e enzimas, através de regiões aniônicas sulfatadas em posições específicas, é a principal responsável pela maioria das funções desempenhadas pelos glicosaminoglicanos (STRYER, 2004).

Estes polissacarídeos são amplamente distribuídos no reino animal, ocorrendo em inúmeros órgãos e tecidos. A maioria dos GAGs podem ser encontrados na superfície celular e na matriz extracelular dos organismos, estando presentes na forma de polissacarídeos livres, como o ácido hialurônico (CHAKRABATI & PARK, 1980), e ligados covalentemente a uma cadeia polipeptídica, formando os proteoglicanos (RUOSLAHTI, 1989; ORENSTAIN *et al*, 1978). Além de suas funções estruturais, os proteoglicanos e glicosaminoglicanos desempenham diferentes papéis em diversos processos, como regulação enzimática e adesão, crescimento, migração ou diferenciação celular (LYON & GALLAAGHER, 1998; SELLECK, 2000).

Em geral, os GAGs são classificados pelos tipos de hexosamina e ácido hexurônico e pela ligação glicosídica entre eles. Outros critérios de diferenciação baseiam-se, ainda, no grau de sulfatação e na posição do grupo sulfato (CONRAD, 1998). Os principais GAGs encontrados em vertebrados são heparina (HEP), heparam sulfato (HP), condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS), queratam sulfato (QS) e ácido hialurônico (FIGURA 1).

O dermatam sulfato (DS) é um dos únicos GAGs cujo resíduo de açúcar aminado da unidade dissacarídica básica é uma N-acetil-galactosamina. Além de possuir ácido glicurônico, o DS possui também sua forma epimerizada, o ácido idurônico. Essa epimerização, que ocorre em alguns resíduos de ácido hexurônico,

explica o fato deste glicano possuir interações e funções biológicas diferentes (ROSEMBERG *et al*, 1985).

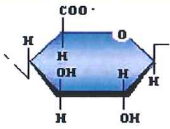
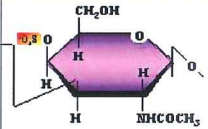
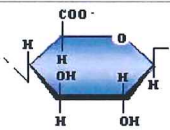
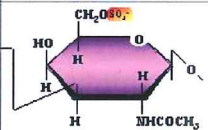
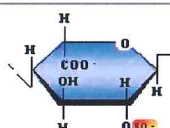
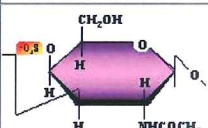
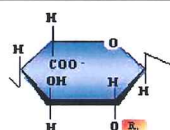
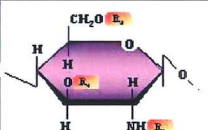
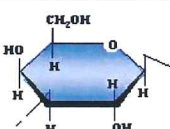
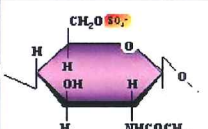
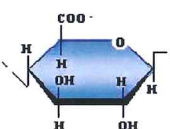
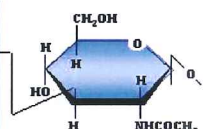
Glicosaminoglicano	Ácido Hexurônico	Hexosamina	Ligação O-glicosídica
Condroitim-4-sulfato	 Ácido Glucurônico (GlcUA)	 N-Acetil-Galactosamina (GalNAc)	GlcUA 1→3 GalNAc
Condroitim-6-sulfato	 Ácido Glucurônico (GlcUA)	 N-Acetil-Galactosamina (GalNAc)	GlcUA 1→3 GalNAc
Dermatam sulfato	 Ácido Idurônico (IdUA)	 N-Acetil-Galactosamina (GalNAc)	IdUA 1→3 GalNAc
Heparina/Heparam sulfato	 Ácido Idurônico/ Glucurônico (IdUA/GlcUA)	 Glucosamina (GlcN)	IdUA/GlcUA1→4 GlcN
Queratom sulfato	 Galactose (Gal)	 N-Acetil-Glucosamina (GlcNAc)	Gal 1→4 GlcNAc
Ácido Hialurônico	 Ácido Glucurônico (GlcUA)	 N-Acetil-Glucosamina (GlcNAc)	GlcUA/GlcUA1→4 GlcN

FIGURA 1- PRINCIPAIS GAGs E SUAS UNIDADES DISSACARÍDICAS.

O DS ocorre principalmente na matriz extracelular e, por isso, suas funções são mais restritas e específicas. Ele desempenha um importante papel na manutenção estrutural da matriz, agindo também na retenção e modulação da atividade de citocinas e fatores de crescimento (TROWBRIDGE & GALLO, 2002).

Os fatores que determinam o comprimento das cadeias deste polissacarídeo são até agora desconhecidos, sendo seu peso molecular relativo variando entre 10 a 45KDa (COMPER & LAURENT, 1978).

As unidades dissacarídicas de DS apresentam grupos sulfatos posicionados no carbono 2 do ácido idurônico e no 4 e/ou 6 da N-acetil-galactosamina. Estes padrões de sulfatação distintos se devem à ação de sulfotransferases específicas que, na biosíntese deste polissacarídeo, irão sulfatar os resíduos de IduA e GalNAc. As sulfotransferases que participam da síntese do DS são: IduA 2-O-sulfotransferase, GalNAc 4-O-sulfotransferase e GalNAc 6-O-sulfotransferase (CHENG *et al*, 1994).

O dermatam sulfato extraído da pele de suínos, por exemplo, é composto, na sua maioria, por N-acetil-galactosamina 4-O-sulfatada e ácido-L-idurônico (FIGURA 4). Alguns resíduos de ácido-L-idurônico (~ 7%) são 2-O-sulfatados e algumas unidades de N-acetil-galactosamina 6-O-sulfatadas (~ 5%) ou 4,6-O-sulfatadas (PAVÃO *et al*, 1998).

O Laboratório do Tecido Conjuntivo da Universidade Federal do Rio de Janeiro está envolvido no estudo da estrutura e função de glicosaminoglicanos sulfatados extraídos de invertebrados marinhos, principalmente de ascídias, uma rica fonte dessas moléculas.

Ascídias são organismos marinhos sésseis de ampla distribuição, encontrados desde grandes profundidades até águas rasas, imersos em sedimento mole ou incrustados em diferentes tipos de substratos consolidados (RODRIGUES *et al*, 1997).

Dos vários grupos que compõem as comunidades marinhas incrustantes, as ascídias, segundo YAMAGUCHI (1975), constituem um dos mais importantes.

Os indivíduos da classe Ascidiacea ocorrem em formas solitárias, também denominadas de ascídias simples, que podem aparecer em distribuição agregada, e em formas coloniais ou compostas, geralmente incrustantes (ROCHA, 1988).

Externamente, as ascídias são revestidas por uma túnica, que envolve completamente o indivíduo, no caso de espécies solitárias, ou podem formar uma cobertura comum em espécies coloniais (RODRIGUES *et al*, 1997).

Os organismos da classe Ascidiacea pertencem ao Filo dos Cordados, subfilo dos Urocordados, ou Tunicados, formando um elo entre invertebrados e vertebrados (FIGURA 2). A classificação deste grupo como Cordados provém da presença de notocorda, tubo neural e fendas branquiais na fase larval, características que regredem no indivíduo adulto, permanecendo somente as fendas branquiais (BARNES, 1980) (FIGURA 3).

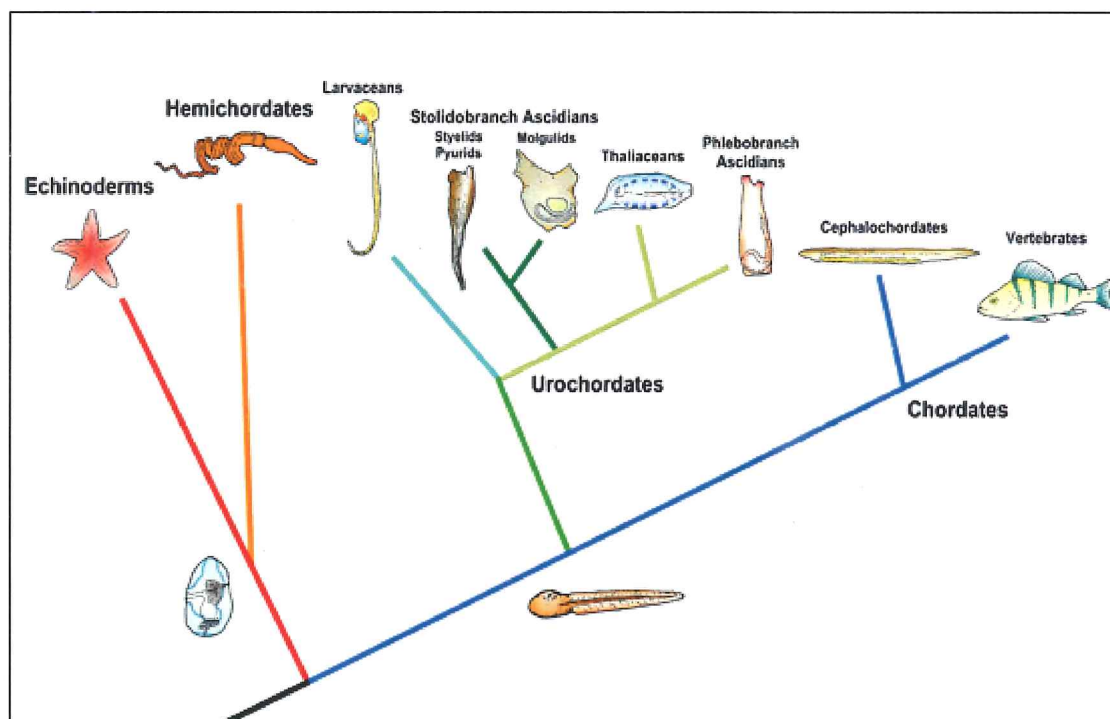


FIGURA 2- DESENHO ESQUEMÁTICO MOSTRANDO A FILOGÊIA DOS UROCORDADOS, SWALLA (2000).

Segundo LAHILLE (1886), esta classe pode ser taxonomicamente dividida em três ordens: Aplousobranchia, Phlebobranchia e Stolidobranchia. A ordem Aplousobranchia, considerada a mais primitiva, é composta por organismos coloniais, os quais possuem corpo subdividido em tórax e abdome, estômago e órgãos reprodutores nunca situados no tórax e cesta branquial apresentando vasos transversais, sem vasos longitudinais ou pregas. A ordem Stolidobranchia engloba espécies tanto coloniais como solitárias, com indivíduos apresentando cesta branquial com pregas, tentáculos simples ou ramificados e gônadas com posições

variadas, nos dois lados do corpo. As espécies da ordem Phlebobranchia, filogeneticamente a mais evoluída, são solitárias, apresentando vasos longitudinais dentro da faringe, cesta branquial sem pregas, tentáculos simples e gônadas situadas dentro da alça intestinal.

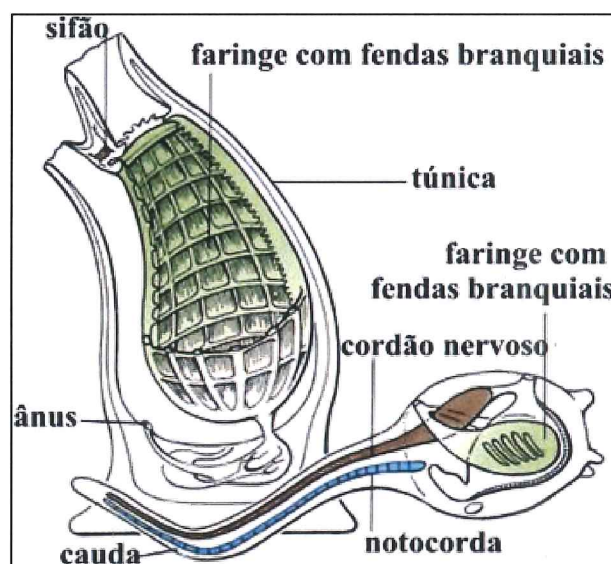


FIGURA 3. COMPARAÇÃO DA ESTRUTURA DE UM ADULTO E DE UMA LARVA DE ASCÍDIA, ROCHA (2001).

A colonialidade dentro dos Urocordados é uma das características que vêm sendo utilizada na tentativa de se explicar a posição filogenética das três ordens citadas à cima. Como apenas a ordem mais evoluída, Phlebobranchia, é exclusivamente composta por espécies solitárias, espera-se que os ancestrais coloniais dos Tunicados tenham recebido um tipo de celulose sintetase de um simbiote, desenvolvendo um estilo de vida solitário (MATTHYSSE et al., 2004). Desta forma, as espécies coloniais estariam filogeneticamente mais próximas dos ancestrais dos Cordados do que espécies solitárias (SWALLA, 2004).

Dermatans sulfatos de três espécies de ascídias foram isolados pelo Laboratório de Tecido Conjuntivo-UFRJ: *Styela plicata*, *Halocynthia pyriformis* e *Phallusia nigra* (anteriormente classificado com *Ascidia nigra*). PAVÃO et al (1995) e PAVÃO et al (1998) demonstraram por análise estrutural que eles diferem do dermatam sulfato de mamíferos no grau e posição de sulfatação.

Dermatans sulfatos das ascídias *S. plicata* e *H. pyriformis*, espécies da ordem Stolidobranchia, possuem ~80% das unidades dissacarídicas compostas por resíduos de ácido idurônico 2-O-sulfatado e N-acetil galactosamina 4-O-sulfatada

(PAVÃO, 1998) (FIGURA 4). Por outro lado, no dermatam da *Phallusia nigra*, espécie da ordem Phlebobranchia, 76% dos dissacarídeos são formados por resíduos de ácido idurônico 2-O-sulfatado, mas neste caso, apresentando N-acetil-galactosamina 6-O-sulfatada (PAVÃO *et al*, 1995) (FIGURA 4).

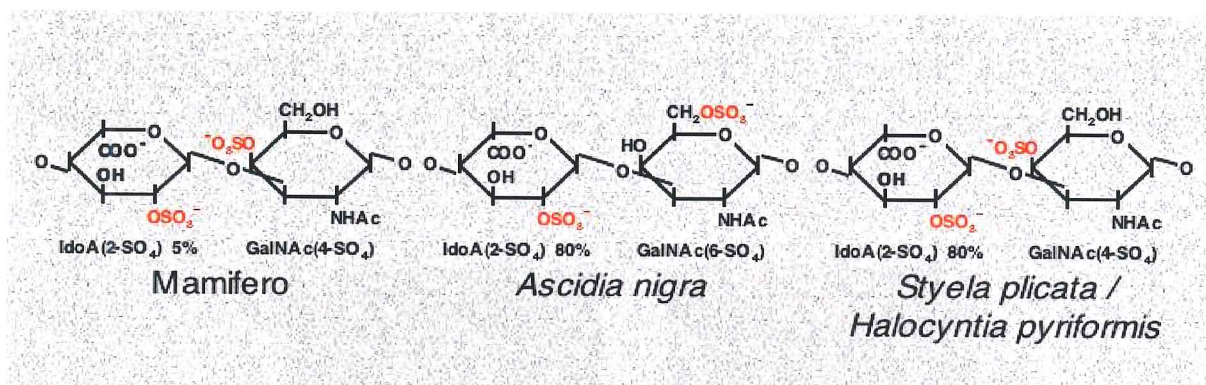


FIGURA 4- UNIDADES DISSACARÍDICAS REPETITIVAS DO DS DE MAMÍFERO, *Phallusia nigra*, *Styela plicata* e *Halocynthia pyriformis*.

Os resultados das análises dissacarídicas do dermatam sulfato de ascídias mostraram que estes cordados primitivos possuem moléculas com alto teor de ácido-L-idurônico 2-O-sulfatado. Porém, houve uma diferença na posição de sulfatação da N-acetil-galactosamina, entre as espécies estudadas. Foi observado que espécies mais primitivas, pertencentes à ordem Stolidobranchia, *S. plicata* e *H. pyriformis*, apresentam sulfatação no carbono 4 da galactosamina, enquanto que uma espécie mais evoluída, da ordem Phlebobranchia, *P. nigra*, apresenta sulfatação no carbono 6 da galactosamina. Sendo assim, o aparecimento de uma sulfotransferase específica para o carbono 6 da galactosamina em polímeros de dermatam sulfato, pode ter surgido mais recentemente no processo de evolução dos urocordados.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Estender as análises de polímeros de dermatam sulfato para outras espécies de ascídias da ordem Phlebobranchia e Stolidobranchia, verificando diferenças nos padrões de sulfatação dessas moléculas entre as espécies primitivas e mais evoluídas. Para isto, foram analisadas as espécies *Ciona intestinalis*, da ordem Phlebobranchia, e a *Herdmania momus*, da Stolidobranchia (FIGURA 5).

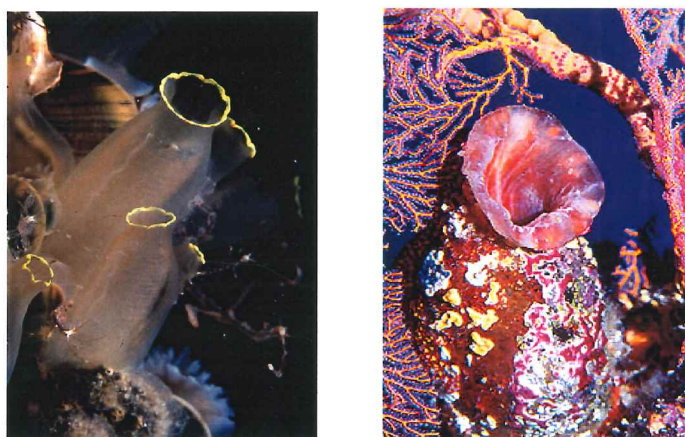


FIGURA 5- FOTOGRAFIA DAS ESPÉCIES ESTUDADAS: *Ciona intestinalis* E *Herdmania momus*, GITTENBERGER (2002).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair glicosaminoglicanos sulfatados das ascídias *Ciona intestinalis* e *Herdmania momus* no estágio adulto;
- Purificar o dermatam sulfato dessas ascídias;
- Caracterizar estruturalmente o dermatam sulfato presente nas ascídias.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta dos animais - As ascídias da espécie *Herdmania momus* foram coletadas por mergulho livre em Angra dos Reis, Rio de Janeiro. Ainda em campo, as vísceras foram isoladas das túnicas através de um corte transversal feito no corpo de cada indivíduo. O material foi acondicionado em acetona e transportado ao laboratório em baixa temperatura. A espécie *Ciona intestinalis* foi obtida do Marine Biological em Massachussets, Estados Unidos, e enviadas para a Washington University – Saint Louis, Estados Unidos, onde as vísceras foram removidas pela Dra. Cristina Vicente e enviadas, já desidratadas, ao laboratório no Brasil.

Preparo das vísceras - Para purificação do DS, os lipídios presentes nos tecidos foram eliminados através de precipitação em acetona a 4°C, por 12 horas. O material desidratado foi levado à estufa a 60°C obtendo-se o pó cetônico.

Extração dos GAGs das ascídias - As vísceras secas foram submetidas à digestão proteolítica com papaína, em tampão 0,1M de acetato de sódio (pH 5,5, contendo 5mM de EDTA e 5mM de cisteína) incubadas a 60°C, por 24 horas. Visando uma pré-purificação dos polissacarídeos sulfatados, o material foi precipitado com CPC 0,5% e diferentes concentrações de etanol absoluto (50%, 75% e 100%), utilizando a mesma metodologia descrita em VIEIRA *et al* (1991), para outros tecidos. Os “pellets” desta precipitação foram secos em estufa a 60°C e diluídos em cerca de 500µl de água destilada. Os polissacarídeos totais extraídos das ascídias foram visualizados por eletroforese em gel de agarose.

Purificação do dermatam sulfato – Os polissacarídeos totais de cada ascídia foram aplicados a uma coluna de troca iônica Mono Q-FPLC (HR 5/5) (Amersham Pharmacia Biotech), equilibrada em tampão Tris-HCl 0,1M (pH 8), contendo EDTA 5mM. Os glicanos foram eluídos com um gradiente linear (0-2,0M) de NaCl, em um fluxo de 1ml/min. Frações de 0,5ml foram coletadas e analisadas com relação a sua propriedade metacromática (absorbância a 525nm), usando 1,9-azul de dimetilmetileno (DMB). As frações contendo material

metacromático foram agrupadas em picos, dialisadas contra água destilada e liofilizadas. Em seguida, os polissacarídeos presentes em cada pico foram analisados por eletroforese em gel de agarose.

Eletroforese em gel de agarose - Os polissacarídeos sulfatados obtidos em cada extração ou purificados por cromatografia de troca iônica foram analisados por eletroforese em gel de agarose como descrito por DIETRICH & DIETRICH (1976). Brevemente, alíquotas contendo aproximadamente 15µg foram aplicadas em um gel de agarose 0,5% em tampão 0,05M 1,3-diaminopropano/acetato (pH 9,0) e submetidos a uma corrida eletroforética por 1 hora a 120V. Uma mistura de condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparina foi utilizada como padrão de GAG. Após eletroforese, os polissacarídeos foram precipitados no gel com uma solução de 0,1% de brometo de cetiltrimetilamônio por 12 horas e, em seguida, corados com azul de toluidina 0,1% em ácido acético/etanol/água (0,1: 5:5, v/v).

Eletroforese em gel de policrilamida - O peso molecular dos dermatans sulfatos encontrados nas diferentes espécies de ascídias foi estimado por eletroforese em gel de policrilamida. Cerca de 10µg das amostras de dermatam sulfato foram aplicadas num gel de policrilamida 7,5%, contendo 1mm de espessura, em barbital sódico 0,02M (pH 8,6). Após a corrida de 30 minutos a 100V, o gel foi corado com azul de toluidina 0,1%, em ácido acético 1% e descorado em solução de ácido acético 1%. Os resultados foram comparados aos padrões utilizados previamente por MOURÃO *et al* (1996).

Tratamento enzimático – Os polissacarídeos extraídos dos tecidos das acídias (~10µg) foram incubados com 0,05 U de condroitinase AC e ABC em 10µl de tampão etilenodiamino, a 37°C, por 12 horas. A degradação enzimática foi verificada por eletroforese em gel de agarose do material intacto e degradado.

Clivagem deaminativa com ácido nitroso – A clivagem deaminativa em pH 1,5 foi realizada de acordo com o método descrito por SHIVELY & CONRAD (1976). Brevemente, alíquotas contendo 20µg de polissacarídeos totais extraídos das

ascídias foram incubadas por 2 horas, em temperatura ambiente, com 5µl de HNO₂. A solução foi então neutralizada com 1M de Na₂CO₃. Os polissacarídeos intactos e degradados foram analisados por eletroforese em gel de agarose, como descrito anteriormente.

Dosagem de ácido urônico – A concentração de dermatam sulfato nas amostras foi estimada por seu conteúdo de ácido urônico, através do método de carbazol (BITTER & MUIR, 1962).

Análise dissacarídica do dermatam sulfato – Cerca de 300 µg de dermatam sulfato das espécies *H. momus* e *C. intestinalis* foram degradados com 0,05U de condroitinase ABC em tampão Etilenodiamino (pH 7,0), a 37°C, por 12 horas. A cada 12 horas, nova alíquota de 0,05U de enzima foi adicionada à solução, até a obtenção de um total de 0,2U de enzima. Os dissacarídeos formados foram recuperados em uma coluna de gel filtração Superdex 75 (Amersham Pharmacia Biotech), conectada a um sistema HPLC Shimadzu (Tóquio, Japão). A coluna foi equilibrada em solução aquosa de acetonitrila 20% (pH 3,5), em um fluxo de 0,5ml/min. Frações de 2ml foram coletadas e checadas quanto a sua absorbância (232nm). As frações contendo os dissacarídeos foram liofilizadas e analisadas em coluna de troca iônica Spherisorb-SAX (Sigma-Aldrich) de 25cm, conectada a um sistema HPLC. A coluna foi eluída com um gradiente linear (0-1M) de NaCl, em um fluxo de 0,5ml/min e a absorbância lida a 232nm. Para identificação dos dissacarídeos, o material analisado foi comparado, quanto à posição de sulfatação, com os dissacarídeos padrões citados a seguir: pico 1, α-ΔHexUA-GalNAc; pico 2, α-ΔHexUA-GalNAc(6S); pico 3, α-ΔHexUA-GalNAc(4S); pico 4, α-ΔHexUA(2S)-GalNAc(6S); pico 5, α-ΔHexUA-GalNAc(4S, 6S); pico 6, α-ΔHexUA(2S)-GalNAc(4S); pico 7, α-ΔHexUA(2S)-GalNAc(4S, 6S).

4. RESULTADOS

4.1. EXTRAÇÃO DOS GAGs DAS ASCÍDIAS

Os polissacarídeos sulfatados foram extraídos das espécies *Ciona intestinalis* e *Herdmania momus* e precipitados com diferentes concentrações de etanol. O conteúdo de polissacarídeos em cada precipitação foi o mesmo, independente da concentração de etanol, desta forma, o material das três precipitações foi agrupado para ambas espécies.

Analisando os polissacarídeos totais extraídos da *Ciona Intestinalis* é possível observar a presença de uma banda metacromática majoritária, de migração eletroforética similar ao dermatam sulfato padrão. Outras duas bandas mais sutis, migrando como condroitim sulfato e heparina padrões, foram também observadas. Uma quarta banda foi visualizada migrando abaixo da heparina (FIGURA 6A).

Os polissacarídeos totais de *Herdmania momus* migraram em três bandas de mesma intensidade metacromática: uma com a mesma mobilidade que condroitim sulfato de mamífero, outra migrando entre os padrões de dermatam sulfato e heparina e a última co-migrando com a heparina (FIGURA 6B).

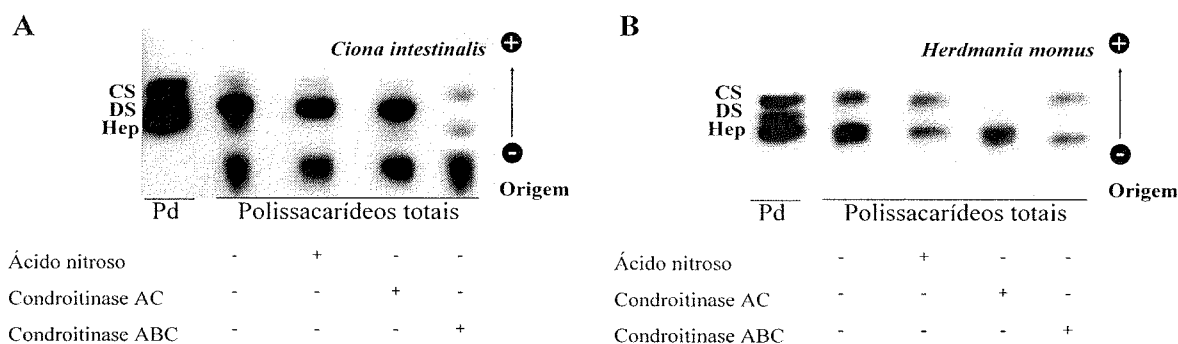


FIGURA 6 - GEL DE AGAROSE DOS POLISSACARÍDEOS TOTAIS DE *Ciona intestinalis* (A) E *Herdmania momus* (B) ANTES E DEPOIS DA INCUBAÇÃO COM ÁCIDO NITROSO E CONDRUITINASE AC E AB.

A fim de identificar especificamente os polissacarídeos extraídos das ascídias, as amostras foram submetidas a tratamento químico e enzimático. A clivagem deaminativa por ácido nitroso ocorre em polissacarídeos N-sulfatados ou N-livres, como é o caso de glicosaminoglicanos como a heparina e o heparam sulfato. Os tratamentos enzimáticos com as condroitinases AC e ABC promovem a degradação

de condroitim sulfato, sendo que, no tratamento com condroitinase ABC, há também a degradação de dermatam sulfato.

Na espécie *Ciona intestinalis*, foi observada a presença de dermatam sulfato e de um polissacarídeo N-sulfatado ou N-livre. O dermatam sulfato foi resistente à condroitinase AC e ao ácido nitroso, sendo degradado pela condroitinase ABC. A banda metacromática de migração similar à heparina, mostrou-se tratar de um polissacarídeo N-sulfatado ou N-livre, já que foi degradada no tratamento com ácido nitroso. Entretanto, as bandas que migraram acima do dermatam e abaixo da heparina não puderam ser identificadas, sendo resistentes aos três tratamentos realizados (FIGURA 6A).

Os três polissacarídeos presentes na ascídia *Herdmania momus* puderam ser identificados. A banda que migrou entre os padrões de dermatam e heparina foi degradada após o tratamento com condroitinase ABC, mas não com condroitinase AC ou com ácido nitroso, identificando-a como dermatam sulfato. A outra banda, localizada logo abaixo do dermatam sulfato, pode ser considerada um polissacarídeo N-sulfatado ou N-livre, já que foi degradada pelo ácido nitroso. A terceira banda, com migração superior ao dermatam sulfato, parece se tratar de um condroitim sulfato, já que foi degradado na presença de condroitinase AC e resistente ao tratamento com ácido nitroso (FIGURA 6B). Surpreendentemente, esta banda foi resistente ao tratamento com a condroitinase ABC, enzima que degrada condroitim e dermatam sulfato. Isto pode ter ocorrido devido a uma maior seletividade da enzima utilizada para dermatam sulfato como seu substrato, não degradando o condroitim sulfato.

4.1.2. PURIFICAÇÃO DO DERMATAM SULFATO DAS ASCÍDIAS

O dermatam sulfato foi purificado pela aplicação do material extraído de cada ascídia em uma coluna de troca iônica, Mono-Q/FPLC e eluição em um gradiente de NaCl (0,0–2,0M). As frações coletadas nestas cromatografias foram verificadas quanto à sua propriedade metacromática em DMB e os picos identificados então agrupados. O conteúdo polissacarídico de cada pico foi visualizado por eletroforese em gel de agarose.

Entre os polissacarídeos extraídos da espécie *Ciona intestinalis*, três picos distintos foram formados (FIGURA 7A). O pico 1 (P1) é caracterizado apenas pela presença do polissacarídeo que migrou abaixo da heparina. No pico 2 (P2), pequena quantidade de dermatam sulfato ocorre concomitantemente com os glicanos de migração eletroforética similar a heparina e condroitim sulfato padrões. O dermatam sulfato foi isolado no pico 3 (P3) (FIGURA 7B).

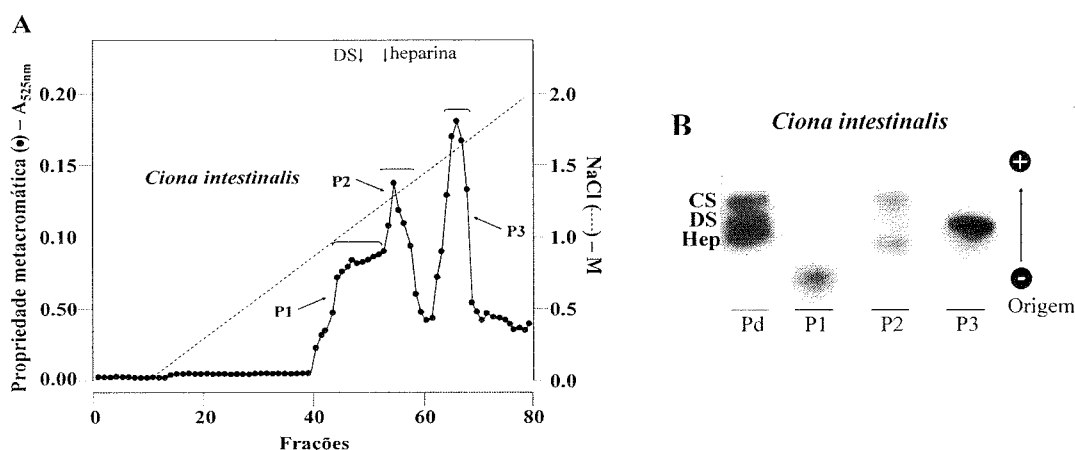


FIGURA 7- (A) PURIFICAÇÃO DO DS DE *Ciona intestinalis* EM COLUNA DE TROCA IÔNICA MONO Q-FPLC. (B) GEL DE AGAROSE INDICANDO O DS PURIFICADO NO PICO 3.

Na espécie *Herdmania momus*, os polissacarídeos eluíram em apenas dois picos (FIGURA 8A). No primeiro, foram observados o polissacarídeo N-sulfatado ou N-livre e o condroitim sulfato, enquanto no segundo, o dermatam sulfato estava purificado (FIGURA 8B).

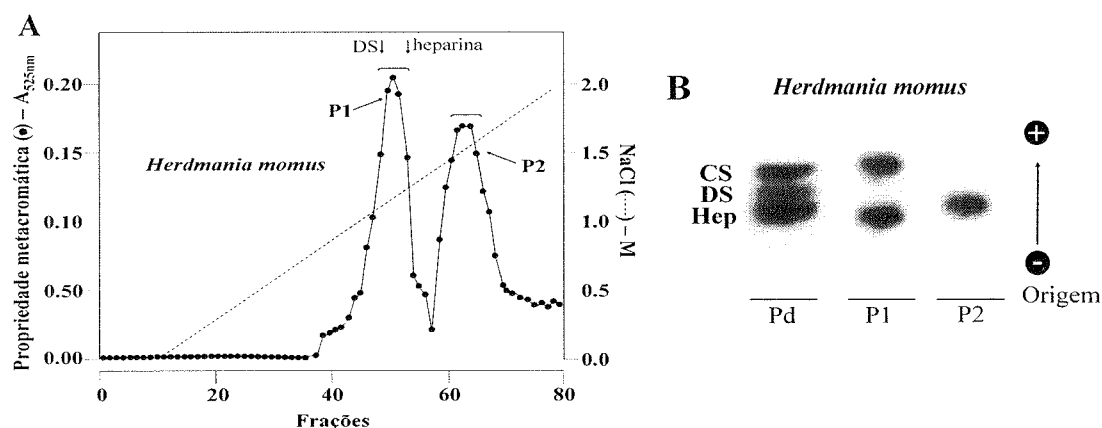


FIGURA 8- (A) PURIFICAÇÃO DO DS DE *Herdmania momus* EM COLUNA DE TROCA IÔNICA MONO Q-FPLC. (B) GEL DE AGAROSE INDICANDO O DS PURIFICADO NO PICO 2.

Após a purificação, o dermatam sulfato de cada espécie foi comparado quanto suas propriedades eletroforéticas, com o respectivo polissacarídeo de ascídias já estudadas, pertencentes às mesmas ordens.

Tanto os dermatam sulfatos das espécies da ordem Stolidobranchia (*Styela plicata* e *Herdmania momus*) como da Phlebobranchia (*Phallusia nigra* e *Ciona intestinalis*), apresentaram similar mobilidade quando comparados entre si. Os polissacarídeos das espécies mais primitivas migraram entre os padrões de dermatam e heparina, enquanto os das mais evoluídas, igualmente ao dermatam padrão (FIGURA 9).

Em relação ao peso molecular, nenhum padrão foi verificado entre os polissacarídeos analisados. O dermatam sulfato de *H. momus* e *C. intestinalis* migraram em torno de $\sim 7 \text{MM} \times 10^{-4}$, enquanto os das outras espécies, entre 4 e $5 \text{MM} \times 10^{-4}$. A banda referente ao dermatam de mamífero migrou pouco acima de $5 \text{MM} \times 10^{-4}$ (FIGURA 10).

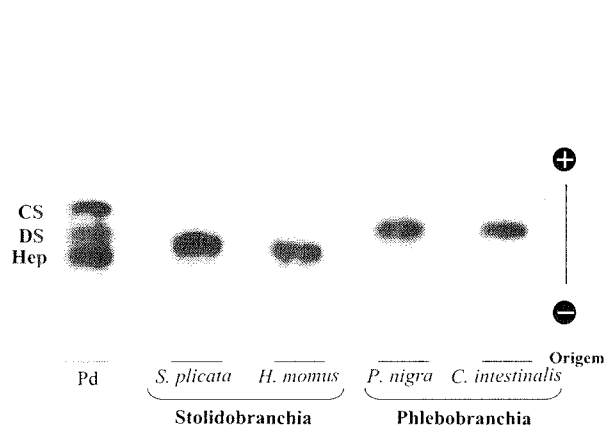


FIGURA 9- GEL DE AGAROSE COMPARANDO O DS PURIFICADO DAS ASCÍDIAS PERTENCENTES ÀS ORDENS STOLIDOBRANCHIA E PHLEBOBRANCHIA.

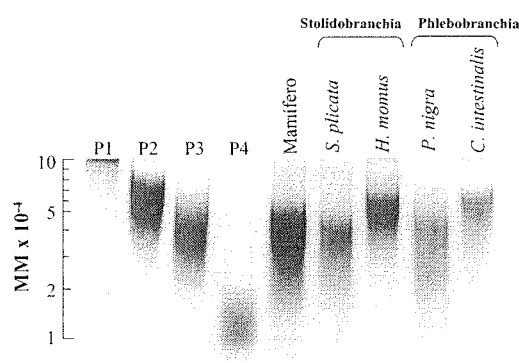


FIGURA 10- GEL BARBITOL COMPARANDO O PESO MOLECULAR DO DS PURIFICADO DAS ASCÍDIAS E DE MAMÍFEROS.

4.3. CARACTERIZAÇÃO DO DERMATAM SULFATO DAS ASCÍDIAS

O conteúdo dissacarídico do dermatam sulfato extraído e purificado de cada ascídia foi identificado por análise em coluna de troca iônica forte, após clivagem por condroitinase ABC. Os dissacarídeos foram eluídos em gradiente de NaCl e seu perfil de eluição comparado com de padrões de dissacarídeos comerciais (FIGURA 11).

O dermatam sulfato da ascídia *Ciona intestinalis* é composto, majoritariamente, por dois dissacarídeos, um formado por ácido hexurônico-2-sulfatado e N-acetilgalactosamina-6-sulfatada (~ 36%) (pico 4 da FIGURA 12A) e o outro por ácido hexurônico não sulfatado e N-acetilgalactosamina-4-sulfatada (~ 31%) (pico 3 da FIGURA 12A). Ainda outro dissacarídeo composto por ácido-hexurônico não sulfatado e N-acetilgalactosamina-6-sulfatada (~ 25%) (pico 2 da FIGURA 12A) está presente neste polímero. Dissacarídeos não sulfatados ou trissulfatados foram detectados em proporções bem inferiores. Estes dados podem ser melhor observados na tabela 1.

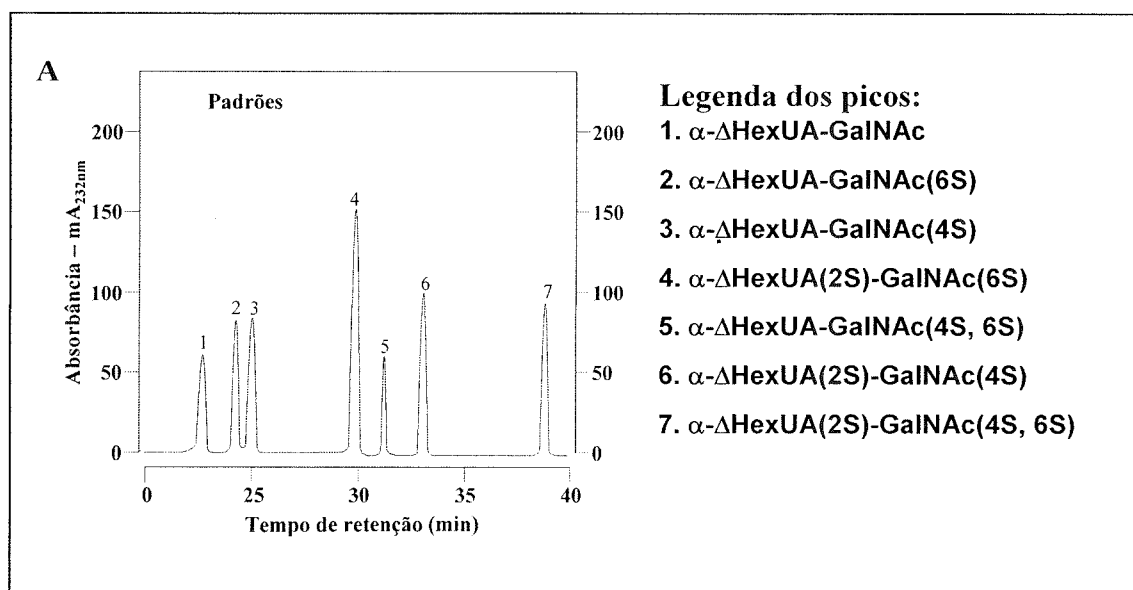


FIGURA 11- ANÁLISE DOS DISSACARÍDEOS PADRÕES EM COLUNA DE TROCA IÔNICA FORTE SAX-HPLC.

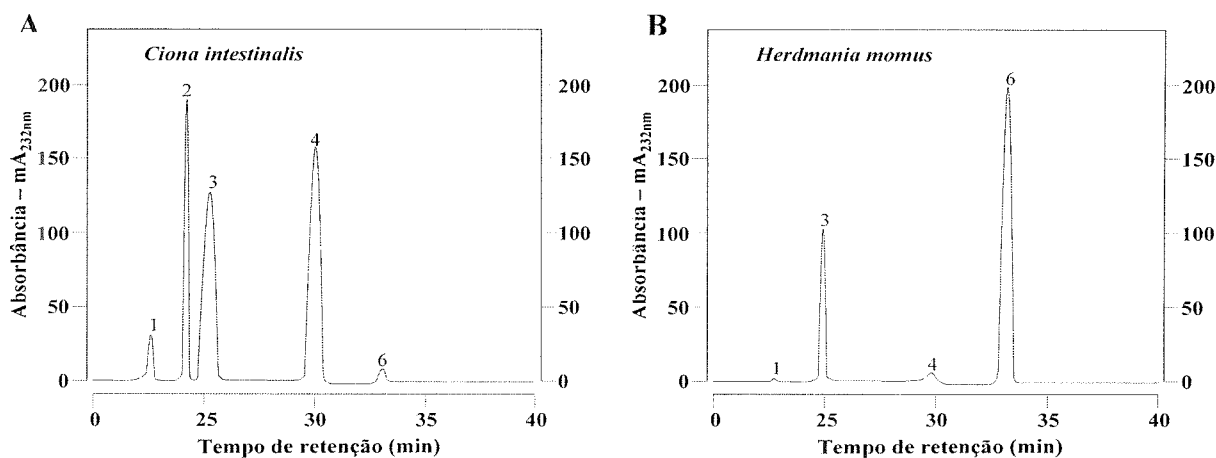


FIGURA 12- ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DISSACARÍDICA DO DS PURIFICADO DE *Ciona intestinalis* (A) E *Herdmania momus* (B) EM COLUNA DE TROCA IÔNICA FORTE SAX-HPLC.

O conteúdo dissacarídico de dermatam sulfato da ascídia *Herdmania momus* apresentou grande homogeneidade. Aproximadamente 81% das unidades são compostas de ácido hexurônico-2-sulfatado e N-acetilgalactosamina-4-sulfatada (pico 6 da FIGURA 12B), sendo 18% compostas por ácido hexurônico não sulfatado e N-acetilgalactosamina-4-sulfatada (pico 3 da FIGURA 12B).

TABELA 1- COMPOSIÇÃO DISSACARÍDICA DO DS DAS ASCÍDIAS E DE MAMÍFERO (%)
(^aPICOS PADRÕES EM ORDEM DE ELUIÇÃO, ^bPAVÃO *et al.*, 1998 E ^cPAVÃO *et al.*, 1995).

Picos ^a	Dissacarídeos	Stolidobranchia			Phlebobranchia		Mamífero ^b
		<i>H. pyriformis</i> ^b	<i>S. plicata</i> ^b	<i>H. momus</i>	<i>P. nigra</i> ^c	<i>C. intestinalis</i>	
1	α - Δ HexUA-GalNAc	-	-	0,25	1,1	5,61	-
2	α - Δ HexUA-GalNAc(6S)	1	1	-	21,4	25,35	5
3	α - Δ HexUA-GalNAc(4S)	29	28	18,46	-	30,77	80
4	α - Δ HexUA(2S)-GalNAc(6S)	-	5	0,54	76,6	36,1	-
5	α - Δ HexUA-GalNAc(4S, 6S)	-	-	-	-	-	8
6	α - Δ HexUA(2S)-GalNAc(4S)	70	66	80,76	-	2,17	7
7	α - Δ HexUA(2S)-GalNAc(4S,6S)	-	-	-	0,9	-	-

Na tabela 1, pode ser visualizada uma comparação da composição dissacarídica do dermatam sulfato de diferentes espécies de ascídias das ordens Stolidobranchia e Phlebobranchia, bem como de mamíferos. Pode-se notar que, no dermatam das ascídias da ordem Stolidobranchia (*Halocynthia pyriformis*, *Styela plicata* e *Herdmania momus*) há um conteúdo muito pequeno de dissacarídeos contendo sulfatação na posição 6 da N-acetilgalactosamina, representando de 0,5 a 5% do polímero, enquanto unidades sulfatadas na posição 4 representam quase a totalidade da molécula. Já no conteúdo dissacarídico do dermatam sulfato extraído das ascídias da ordem Phlebobranchia (*Phallusia nigra* e *Ciona intestinalis*), pode-se observar a predominância de unidades sulfatadas na posição 6 da N-acetilgalactosamina e algum conteúdo de dissacarídeos sulfatados na posição 4.

5. DISCUSSÃO

Polímeros de dermatam sulfato, extraídos de duas espécies de ascídias separadas evolutivamente, foram purificados e caracterizados quanto à posição de seus grupos sulfatos. Analisando a composição das unidades dissacarídicas destes polissacarídeos é possível verificar a existência de padrões de sulfatação distintos para cada ordem estudada.

A semelhança entre os polissacarídeos das espécies pertencentes à mesma ordem, pôde ser verificada quando estes foram analisados, lado a lado, quanto suas propriedades eletroforéticas. Tanto os dermatans sulfatos das espécies da ordem Stolidobranchia (*Styela plicata* e *Herdmania momus*) como da Phlebobranchia (*Phallusia nigra* e *Ciona intestinalis*), apresentaram bandas metacromáticas migrando de forma similar quando comparados entre si (FIGURA 9).

O dermatam sulfato da ascídia considerada filogeneticamente mais evoluída, pertencente à ordem Phlebobranchia, *Ciona intestinalis*, apresenta 36% de seus dissacarídeos compostos por ácido hexurônico-2-sulfatado e N-acetilgalactosamina-6-sulfatada e apenas 2% por ácido hexurônico-2-sulfatado e N-acetilgalactosamina-4-sulfatada. Nos outros dois dissacarídeos encontrados, apenas a galactosamina possui grupos sulfatos, sendo 25% no C-6 e 30% C-4 (TABELA 1). Resultados semelhantes foram verificados em PAVÃO *et al.* (1995), onde a análise dissacarídica do dermatam sulfato de outra espécie de ascídia, *Phallusia nigra*, também da ordem Phlebobranchia, revelou que 76% de suas unidades eram compostas por ácido hexurônico-2-sulfatado e N-acetilgalactosamina-6-sulfatada e 21% por ácido hexurônico não sulfatado e N-acetilgalactosamina-6-sulfatada. Entretanto, ao contrário do dermatam de *Ciona intestinalis*, nenhuma unidade de ácido hexurônico não sulfatado e N-acetilgalactosamina-4-sulfatada foi detectada.

Os dissacarídeos da ascídia mais primitiva, da ordem Stolidobranchia, *Herdmania momus*, são compostos principalmente (80%) por ácido hexurônico-2-sulfatado e N-acetilgalactosamina-4-sulfatada, contendo uma menor fração (18%) formada por ácido hexurônico não sulfatado e N-acetilgalactosamina-4-sulfatada. Dissacarídeos não sulfatados ou disulfatados nas posições C-2 e C-6 do ácido idurônico e da galactosamina, respectivamente, foram detectados em proporções

bem inferiores (TABELA 1). Estes resultados, mais uma vez, coincidiram com as análises dissacarídicas realizadas em espécies da ordem Stolidobranchia, por PAVÃO *et al.* (1998). Os dermatans sulfatos das ascídias *Styela plicata* e *Halocynthia pyriformis* também apresentam, na sua maioria, seus dissacarídeos compostos por ácido hexurônico-2-sulfatado e N-acetilgalactosamina-4-sulfatada (66 e 70%) e ácido hexurônico não sulfatado e N-acetilgalactosamina-4-sulfatada (28 e 29%).

Os estudos de glicosaminoglicanos em ascídias revelaram que o dermatam sulfato extraído das ascídias mais primitivas (*Halocynthia pyriformis*, *Styela plicata* e *Herdmania momus*) é constituído quase na sua totalidade por unidades dissacarídicas sulfatadas na posição 4 da N-acetilgalactosamina. Por outro lado, as espécies mais evoluídas (*Phallusia nigra* e *Ciona intestinalis*), apresentam predominância de grupos sulfatos na posição 6 da N-acetilgalactosamina. Estes resultados apóiam a hipótese de que uma sulfotransferase específica para o carbono 6 da galactosamina tenha surgido mais recentemente o processo evolutivo dos Urocordados.

Desta forma, como 30% das unidades dissacarídicas de dermatam sulfato de *Ciona intestinalis* são compostas por ácido hexurônico não sulfatado e N-acetilgalactosamina-4-sulfatada e 2% por ácido hexurônico-2-sulfatado e N-acetilgalactosamina-4-sulfatada, sugere-se que esta espécie seja mais primitiva que a *Phallusia nigra*, a qual não contém nenhum grupo sulfato na posição 4 da galactosamina.

No caso das ascídias pertencentes à ordem mais primitiva, espera-se que a espécie *Styela plicata* esteja filogeneticamente mais próxima à ordem Phlebobranchia, pelo fato de possuir algum conteúdo dissacarídico com sulfatação no carbono 6 da galactosamina.

Dermatans sulfatos de espécies da ordem Aplousobranchia não puderam ser caracterizados, pois esta é composta apenas por espécies colônias, das quais não é possível separar a túnica das vísceras. Entretanto, de acordo com a hipótese apresentada por SWALLA (2004), esta ordem é considerada a mais primitiva pelo fato de não possuir indivíduos solitários. Sendo assim, espera-se que o dermatam sulfato desta ordem seja composto exclusivamente por unidades dissacarídicas com grupos sulfatos posicionados no C-4 da galactosamina.

6- CONCLUSÃO

Os resultados das análises dissacarídicas dos dermatans sulfatos das ascídias mostraram que espécies mais primitivas, pertencentes à ordem Stolidobranchia, *Styela plicata*, *Halocynthia piriformes* e *Herdmania momus*, são compostas, principalmente, por dissacarídeos contendo sulfatação no carbono 4 da galactosamina, enquanto que em espécies mais evoluídas, da ordem Phlebobranchia, *Phallusia nigra* e *Ciona intestinalis*, apresentam, na sua maioria, dissacarídeos sulfatados na posição 6 da galactosamina, corroborando a hipótese que o aparecimento de uma sulfotransferase específica para o carbono 6 da galactosamina, em polímeros de dermatam sulfato, surgiu mais recentemente no processo de evolução dos tunicados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARNES, R.D. (1980) **Invertebrate Zoology**. 7. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1054p.

BITTER, T.; MUIR, H.M. (1962) A modified uronic acid carbazole reaction. **Anal. Biochem.**, v. 4, p. 330-334.

CHAKRABATI, B.; PARK, J.W. (1980) Glycosaminoglycans: structure and interaction. **J. Biol. Chem.**, v. 8, n. 3, p. 225-313.

CHENG, F.; HEINEGARD, D.; MALMSTROM, A.; SCHMIDTCHEN, A.; YOSHIDA, K.; FRANSSON, L.A. (1994) Patterns of uronosyl epimerization and 4-/6-O-sulphation in chondroitin/dermatan sulphate from decorin and biglycan of various bovine tissues. **Glycobiology**, v. 4, n. 5, p. 685-696.

COMPER, W.D.; LAURENT, T.C. (1978) Physiological function of connective tissue polysaccharides. **Physiol. Rev.**, v. 5, n.1, p. 255-315.

CONRAD, H.E. (1998) **Heparin Binding Proteins**. San Diego: Academic Press. 527p.

DIETRICH, C.P.; DIETRICH, S.M.C. (1976) Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Anal. Biochem.**, v. 70, n. 2, p. 645-647.

GITTENBERG, A (2002). Fotografia das espécies *Ciona intestinalis* e *Herdmania momus*. disponível em <<http://www.ascidians.com>> acesso em 15 mar, 2005.

LAHILLE, M.F. (1886) Sur la classification des Tuniciers. **C. R. Acad. Sci. Paris.**, v. 102, p. 1573-1575.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. (1995) **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier. 839p.

LYON, M.; GALLAGHER, J.T. (1998) Bio-specific sequences and domains in heparan sulphate and the regulation of cell growth and adhesion. **Matrix Biol.**, v.17, n.7, p. 485–493.

MATTHYSSE, A.G.; DESCHET, K.; WILLIAMS, M.; MARRY, M.; WHITE, A.R.; SMITH, W.C. (2004) A functional cellulose synthase from ascidian epidermis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.101, n. 4, p. 986-991.

MOURÃO, P.A.S.; PEREIRA, M.S.; PAVÃO, M.S.G.; MULLOY, B.; TOLLEFSEN, D. M.; MOWINCKEL, M. C.; ABILDGARD, U. (1996) Structure And Anticoagulant Activity Of A Fucosylated Chondroitin Sulfate From Echinoderm: Sulfated Fucose Branches On The Polysaccharide Account For Its High Anticoagulant Activity. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 39, p. 23973-23984.

ORENSTEIN, N.S.; GALLI, S.J.; DVORAK, A.M.; SILBERT, J.E.; DVORAK, H.F. (1978) Sulfated glycosaminoglycans of Guinea pig basophilic leucocytes. **J. Immunol.**, v.121, n. 2, p. 586-592.

PAVÃO, M.S.G.; MOURÃO, P.A.S.; MULLOY, B.; TOLLEFSEN, D.M. (1995) A Unique Dermatan Sulfate-Like Glycosaminoglycan From Ascidian: Its Structure And The Effect Of Its Unusual Sulfation Pattern On Anticoagulant Activity. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 52, p. 31027-3103.

PAVÃO, M.S.G.; AIELLO, K.R.M.; WERNECK, C.C.; SILVA, L.C.F.; VALENTE, A.P.; MULLOY, B.; COLWELL, N.S.; TOLLEFSEN, D.M.; MOURÃO, P.A.S. (1998) Highly Sulfated Dermatan Sulfates From Ascidians. Structure Versus Anticoagulant Activity Of These Glycosaminoglycans. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 43, p. 27848-27857.

ROCHA, R.M. **Ascídias coloniais do canal de São Sebastião, SP: aspectos ecológicos**. São Paulo, 1988. 133f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

ROCHA, S (2001) Comparação da estrutura de um adulto e de uma larva de ascídia. disponível em <<http://curlygirl.no.sapo.pt>> acesso em: 15 nov. 2005.

RODRIGUES, S.A.; ROCHA, R.M.; LOTUFO, T.M.C. (1997) **Guia Ilustrado para a Identificação das ascídias do estado de São Paulo**. São Paulo: IBUSP/FAPESP. 190p.

ROSENBERG, L.C.; CHOI, H.U.; JOHNSON, T.L.; PAL, S.; WEBBER, C.; REINER, A.; POOLE, A.R. (1985) Isolation of dermatan sulfate proteoglycans from mature bovine articular cartilages. **J. Biol. Chem.**, v. 10, n. 10, p. 6304-6313.

RUOSLAHTI, E. (1989) Proteoglycans in cell regulation. **J. Biol. Chem.**, v. 264, n. 23, p. 13369-13372.

SELLECK, S.B. (2000) Proteoglycans and pattern formation: sugar biochemistry meets developmental genetics. **Trends Genet.**, v. 16, n. 5, p. 206-212.

SHIVELY, J.E.; CONRAD, H.E. (1976) Nearest neighbor analysis of heparin: identification and quantitation of the products formed by selective depolymerization procedures. **Biochemistry**, v. 15, n. 18, p. 3943-3950.

STRYER, L. (2004) **Bioquímica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1000p.

SWALLA, B. J. (2000). Dezenho esquemático mostrando a filogenia dos urocordados. disponível em <<http://faculty.washington.edu/bjswalla/phylo.php>> acesso em: 12 nov. 2005.

SWALLA, B.J. (2004) Procurement and culture of ascidian embryos. **Methods Cell Biol.**, v. 74, p.115-41.

TROWBRIDGE, J.M.; GALLO, R.L. (2002) Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan. **Glycobiology**, v. 12, n. 9, p. 117-125.

VIEIRA, R.P.; MULLOY, B.; MOURÃO, P.A. (1991) Structure of a fucose-branched chondroitin sulfate from sea cucumber. Evidence for the presence of 3-O-sulfo-beta-D-glucuronosyl residues. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 21, p. 13530-13536.

YAMAGUCHI, M. (1975) Growth and reproductive cycles of marine fouling ascidians *Ciona intestinalis*, *Styela plicata*, *Botrulloides violaceus* and *Leptoclinum mitsukurii* at Abaratsubo – Moroiso Inlet (Central Japan). **Mar. Biol.**, v. 29, n.5, p. 253-259.