

GENOMA DE INVERTEBRADOS MARINHOS: DESCOBERTA DE GENES ESSENCIAIS À PRODUÇÃO DE COMPOSTOS SULFATADOS BIOATIVOS EM DUAS ESPÉCIES DE ASCÍDIAS OCORRENTES NO MAR BRASILEIRO

Marine invertebrates genome: discovery of essential genes for the production of bioactive sulfated compounds in two ascidian species occurring in the Brazilian sea

Vanessa de Sousa Rizzo Valente¹ , Mauro Sérgio Gonçalves Pavão² 

Resumo: O *habitat* marinho é fonte incomensurável de recursos naturais para a prospecção de compostos bioativos. Nesse contexto, diferentes trabalhos já foram desenvolvidos, culminando com a descoberta de diversas moléculas com atividade farmacológica, como os polissacarídeos sulfatados. As ascídias são os invertebrados marinhos mais próximos filogeneticamente dos vertebrados, tendo em comum com eles diversas informações genéticas e estruturais. Além disso, são importantes fontes de moléculas bioativas, como os glicosaminoglicanos sulfatados (GAG), com uma extensa lista de propriedades farmacológicas, tais como: cicatrizante, antiviral, anticoagulante, antimetastático, antipirético e outras. Essas atividades variam conforme modificações estruturais pós-traducionais coordenadas por um conjunto de enzimas chamadas sulfotransferases. No presente estudo, as espécies de ascídia *Styela plicata* e *Phallusia nigra* tiveram seu genoma sequenciado pela primeira vez, permitindo a identificação inicial dos genes que codificam elementos da via de biossíntese de GAG. Essa descoberta poderá guiar estudos envolvendo o clonagem de genes de sulfotransferases, para a produção direcionada de polissacarídeos sulfatados de interesse farmacológico, assim como estudos de expressão desses genes diante de diferentes condições ambientais.

Palavras-chave: ascídia. Bioprospecção marinha. Genoma. *Styela plicata*. *Phallusia nigra*. Sulfotransferase. Glicosaminoglicanos sulfatados.

Abstract: The marine habitat is an immeasurable source of natural resources for prospecting bioactive compounds. In this context, different works have already been developed, culminating in the discovery of several molecules with pharmacological activity, such as sulfated polysaccharides. Ascidians are the marine invertebrates that are phylogenetically closest to vertebrates, having in common several genetic and structural information; in addition, they are important sources of bioactive molecules, such as sulfated glycosaminoglycans (GAGs), with an extensive list of pharmacological properties, such as healing, antiviral, anticoagulant, antimetastatic, antipyretic, and others. These activities vary according to post-translational structural modifications coordinated by a set of enzymes called sulfotransferases. In the present study, the ascidian species *Styela plicata* and *Phallusia nigra* had their genome sequenced for the first time, allowing the initial identification of the genes that encode elements of the GAGs biosynthesis pathway. This discovery may guide studies involving the cloning of sulfotransferase genes, for the targeted production of sulfated polysaccharides of pharmacological interest, as well as studies of the expression of these genes under different environmental conditions.

Keywords: Ascidian/sea squirt. Marine bioprospecting. Genome. *Styela plicata*. *Phallusia nigra*. Sulfotransferase. Sulfated glycosaminoglycans.

1. Auxiliar da Seção de Bioanálises, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Hospital Naval Marcílio Dias, Rio de Janeiro, RJ - Brasil. E-mail: vanessa.rizzo@marinha.mil.br

2. Professor titular do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo De Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ - Brasil. E-mail: mpavao@hucff.ufrj.br

1. INTRODUÇÃO

Os carboidratos são as biomoléculas mais abundantes na natureza, principalmente no ecossistema marinho, e desempenham tanto atividades no metabolismo energético e funções estruturais quanto funções como mediadores de sinalização em processos biológicos (HU; SEEBERGER; YIN, 2016). Um grupo importante desses carboidratos é constituído pelos glicosaminoglicanos (GAG) dermatam sulfato (DS), condroitim sulfato (CS), heparam sulfato (HS), heparina e ácido hialurônico, sendo este último o único GAG não sulfatado. Os GAG são compostos de unidades dissacarídicas em repetição, com diversas combinações de arranjos, além da possibilidade de inserção como cadeias laterais em proteínas, formando moléculas altamente complexas como os proteoglicanos (PAVÃO; VILELA-SILVA; MOURÃO, 2006). Os proteoglicanos sulfatados ocorrem em grande variedade de organismos vertebrados e principalmente de invertebrados marinhos, nos quais integram majoritariamente a matriz extracelular e a superfície celular nos tecidos conjuntivos (LODISH et al., 2000).

Entre as variações estruturais possíveis, a mais relevante nos carboidratos de invertebrados marinhos é a sulfatação, desempenhada por famílias especializadas de enzimas sulfotransferases (SULT) que promovem a transferência de um grupamento sulfato para uma posição específica, que pode ser em hidroxilas alifáticas ou aromáticas do açúcar aceptor, produzindo assim um derivado sulfatado (KUSCHE-GULLBERG; KJELLÉN, 2003). Algumas SULT reconhecem não apenas o tipo e a posição do monossacarídeo, mas também a estrutura dos resíduos vizinhos; no entanto, o *core* proteico onde as cadeias de GAG estão ligadas não determinam a especificidade dessa sulfatação (UCHIMURA et al., 2002). Essa inclusão contribui significativamente para promover a diversidade estrutural e funcional dos carboidratos, com conseqüente formação de novas moléculas, principalmente quando estão ancorados em proteínas (POMIN; MOURÃO, 2008). Além dos proteoglicanos, diversas glicoproteínas e glicolipídios contêm carboidratos sulfatados. O êxito na clonagem molecular dos genes de sulfotransferases permitiu a compreensão da função biológica dos polissacarídeos sulfatados (PS) em uma variedade de contextos, como em doenças humanas, incluindo deficiência hereditária, câncer, inflamação e infecção (HONKE; TANIGUCHI, 2002). Elevadas quantidades de PS de alto peso molecular, predominantemente formados por *L*-galactose sulfatada, estão

presentes em ascídias¹, tornando-as importantes fontes para a obtenção e estudo dessas moléculas (PAVÃO et al., 1989). Além disso, já foram atribuídos aos PS de invertebrados marinhos muitas propriedades biológicas como: anti-inflamatória (THOMSON et al., 2016), cicatrizante (RIZZO-VALENTE et al., 2022), anticoagulante, antitrombótica, reguladores da angiogênese e de estresse oxidativo, antitumoral e antiviral (VASCONCELOS; POMIN, 2018).

Trabalhos anteriores do nosso grupo identificaram polímeros de DS hipersulfatados com propriedades bioativas compondo a matriz extracelular das vísceras das ascídias *Styela plicata* e *Phallusia nigra* (GANDRA; CAVALCANTE; PAVÃO, 2000; PAVÃO, 2002). Sobre essa variação do perfil de sulfatação, sabe-se que a expressão dos PS pode ser influenciada pelo meio em que determinado organismo se encontra, estando sujeita a eventos externos. Já foi constatado que a intensidade da salinidade altera proporcionalmente a concentração da sulfatação dos polissacarídeos (AQUINO; GRATIVOL; MOURÃO, 2011); logo, é esperado que a expressão de enzimas sulfotransferases também sofra modulação. Análises inéditas (não publicadas) do nosso grupo demonstraram que o padrão de sulfatação (grau e posição) dos GAG de algumas espécies de ascídias tropicais difere daquele obtido de espécies ocorrentes nas águas da Antártica, sugerindo que as diferentes condições ambientais possam estar atuando no repertório dos PS. Assumindo a relevância da sulfatação na cadeia de carboidratos para a sua diversidade funcional, pesquisadores tentaram modificar essas moléculas quimicamente inserindo agentes sulfatadores (MEYER; PIROUÉ; ODIER, 1952), e uma das maiores dificuldades encontradas no processo foi a heterogeneidade do produto resultante dessa reação, considerando-se que a maioria dos polissacarídeos é insolúvel ou parcialmente solúvel nos solventes orgânicos utilizados no meio de reação (NAGASAWA et al., 1971). Dados a

¹ Ascídias são invertebrados marinhos do filo dos tunicados que compreendem aproximadamente três mil espécies (DEHAL et al., 2002) e podem viver em colônias ou solitárias, apresentando-se, durante a fase adulta, fixadas em substratos rochosos ou artificiais como ancoradouros e boias (GAB-ALLA, 2008). Nesta fase, alimentam-se de partículas em suspensão por meio do sistema digestivo tubular filtrante, similar a um sifão (fato responsável pelo nome popular de “esguicho-do-mar”); são, por esse motivo, também consideradas boas indicadoras biológicas de poluição. Podem habitar águas rasas e quentes com diferentes graus de salinidade e até mesmo a região Antártica, considerada um *habitat* extremo (SIMS, 1984). Algumas dessas espécies são bioinvasoras, sendo um problema nos ambientes marinhos e nas instalações de aquicultura, principalmente considerando-se a estratégia de dispersão através de incrustações nas embarcações (BLUM et al., 2007; SIMPSON; WERNBERG; MCDONALD, 2016).

importância biológica dos açúcares sulfatados e os obstáculos encontrados na sulfatação artificial de moléculas tão complexas, o amplo conhecimento de genes codificantes de enzimas sulfotransferases pode abrir um horizonte biotecnológico para a síntese em larga escala desses compostos sulfatados, especialmente para a produção de uma “biblioteca” de substâncias bioativas candidatas à utilização como fármacos.

2. OBJETIVOS

Este trabalho visa contribuir para a estratégia de ciência, tecnologia e inovação (CT&I) da Marinha do Brasil (MB) com a promoção do conhecimento e o aproveitamento sustentável dos recursos naturais das áreas marinhas, tendo realizado, de forma inédita, o primeiro sequenciamento dos genomas de duas espécies de ascídias presentes no mar brasileiro: *Styela plicata* e *Phallusia nigra*. Para tal, foram empregadas ferramentas gratuitas de bioinformática para a prospecção de genes relacionados à síntese de polissacarídeos sulfatados, que são fontes de importantes compostos cuja atividade farmacológica já é bem estabelecida na literatura.

3. METODOLOGIA

3.1. COLETA DAS ASCÍDIAS E EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Foi realizada a coleta das espécies de ascídias *Styela plicata* e *Phallusia nigra* por meio de mergulho livre, para a captura de exemplares adultos presentes em costões rochosos da região litorânea do Rio de Janeiro (Marina da Glória e Arraial do Cabo). Os espécimes foram conservados em álcool absoluto até o momento da dissecação e processamento. A coleta foi autorizada pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade — SISBIO (data de revalidação: 6 de dezembro de 2019). O DNA genômico foi purificado utilizando o QIAamp Fast DNA Tissue Kit (Qiagen), conforme as instruções do fabricante.

3.2. CONSTRUÇÃO DAS BIBLIOTECAS E SEQUENCIAMENTO DE DNA

As etapas de construção das bibliotecas e sequenciamento do DNA foram realizadas no Instituto René Rachou — Fiocruz

Minas, na Plataforma de Sequenciamento Illumina MiSeq. As bibliotecas de fragmentos de DNA foram construídas com 500 ng de DNA, utilizando o Kit Nextera™ DNA Flex Library Preparation, conforme instruções do fabricante. Ao fim do processo, foram obtidos dados de texto do sequenciamento.

3.3. CONTROLE DE QUALIDADE DO SEQUENCIAMENTO E MONTAGEM DOS GENOMAS

As leituras dos sequenciamentos foram submetidas à análise no programa Krona para a avaliação da presença de DNA contaminantes de outras espécies. O controle de qualidade estatístico dos dados pós-sequenciamento foi realizado no programa FastQC. As sequências contaminantes e as de baixa qualidade foram excluídas utilizando o programa Trimmomatic. Dada a inexistência de genoma completo de mesma espécie para utilização como referência na montagem dos genomas de *S. plicata* ou de *P. nigra*, a estratégia *de novo* (sem o mapeamento a uma referência) foi utilizada. Na plataforma Galaxy (disponível em <https://usegalaxy.eu/>), o programa SPAdes foi utilizado para a montagem do rascunho dos genomas. O controle estatístico das montagens foi realizado com o *software* Quast.

3.4. ANOTAÇÃO DOS GENOMAS E PROSPECÇÃO DE GENES DE INTERESSE

A etapa inicial de identificação de genes ortólogos nos genomas foi realizada com o *software* BUSCO e os genes completos (e parciais) foram anotados com o programa AUGUSTUS. Os transcritos gerados com o BLASTx foram submetidos à anotação funcional no programa Blast2GO e no <http://pantherdb.org/>, nos quais foram classificados de acordo com as seguintes categorizações funcionais (<http://www.geneontology.org/>): componentes celulares, função molecular e processos biológicos.

4. RESULTADOS

4.1. PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO DNA GENÔMICO

O sequenciamento apresentou taxa de contaminação com DNA de bactérias e vírus ambientais inferior a 1% dos dados totais do sequenciamento, e após o emprego de ferramentas

de processamento houve ganho na qualidade estatística dos dados, permitindo melhor montagem do genoma (Figura 1).

4.2. MONTAGEM DO GENOMA

Os dados dos sequenciamentos foram depositados na base de dados *Sequence Read Archive* (SRA) do National Center

for Biotechnology Information (NCBI) sob os registros SRR14343895 e SRR14344226, referentes às espécies *S. plicata* e *P. nigra*, respectivamente. As montagens dos genomas nucleares parciais, incluindo as anotações, foram registradas com os códigos SUB9691794 e SUB9691905, correspondentes à *S. plicata* e à *P. nigra*, respectivamente. As métricas

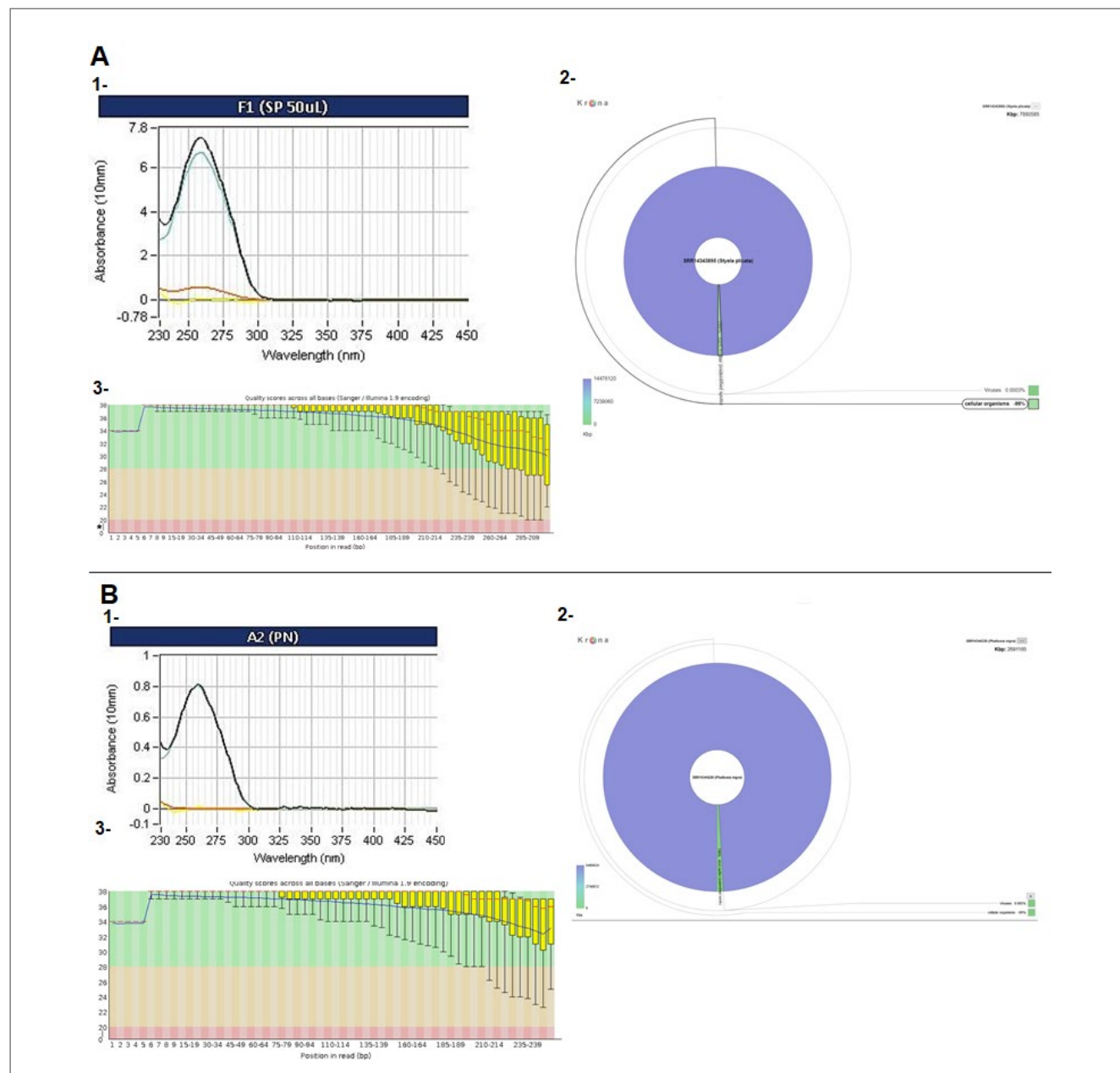


Figura 1. Purificação de DNA e análises pós-sequenciamento. (1) Gráfico de purificação de DNA genômico. (2) Análise de contaminação do DNA sequenciado (presença de DNA contaminantes em verde; total de dados, em lilás); (3) Pontuação estatística da qualidade *Phred* dos dados sequenciados (faixa verde = pontuação ≥ 30). (A) *Styela plicata*; (B) *Phallusia nigra*.

de qualidade referentes à quantidade e ao tamanho de *contigs* obtidos são mostradas na Figura 2.

4.3. ANOTAÇÃO DO GENOMA E PROSPECÇÃO DE GENES DE SULFOTRANSFERASES

No genoma de *P. nigra*, foram identificadas 19 sequências de proteínas envolvidas na biossíntese de HS/heparina, 24 que apresentaram similaridade com proteínas envolvidas na biossíntese de KS e 28 participantes da biossíntese de CS/DS. Além disso, foram identificadas 31 sequências de proteínas que atuam no processo de degradação de GAG. No genoma de *S. plicata*, foram identificadas 68 sequências proteicas envolvidas na biossíntese de CS/DS, 53 atuantes

na biossíntese de KS e 67 participantes da via de biossíntese de HS/heparina. Entre as sequências envolvidas na biossíntese de DS, foram identificados 12 membros putativos de dermatam SULT no genoma de *P. nigra* e 42 no genoma de *S. plicata*, além de 61 sequências de proteínas participantes da via de degradação de GAG.

Os genes identificados foram distribuídos segundo a função molecular, o tipo de processo biológico do qual participam e a sua classe proteica, revelando a presença, em maior proporção, de genes codificantes de proteínas ligantes de cálcio e de enzimas participantes da interconversão de metabólitos, grupo do qual fazem parte as transferases em geral (Figura 3).

O isolamento dessas sulfotransferases associadas ao Complexo de Golgi ainda é um desafio considerando-se fato

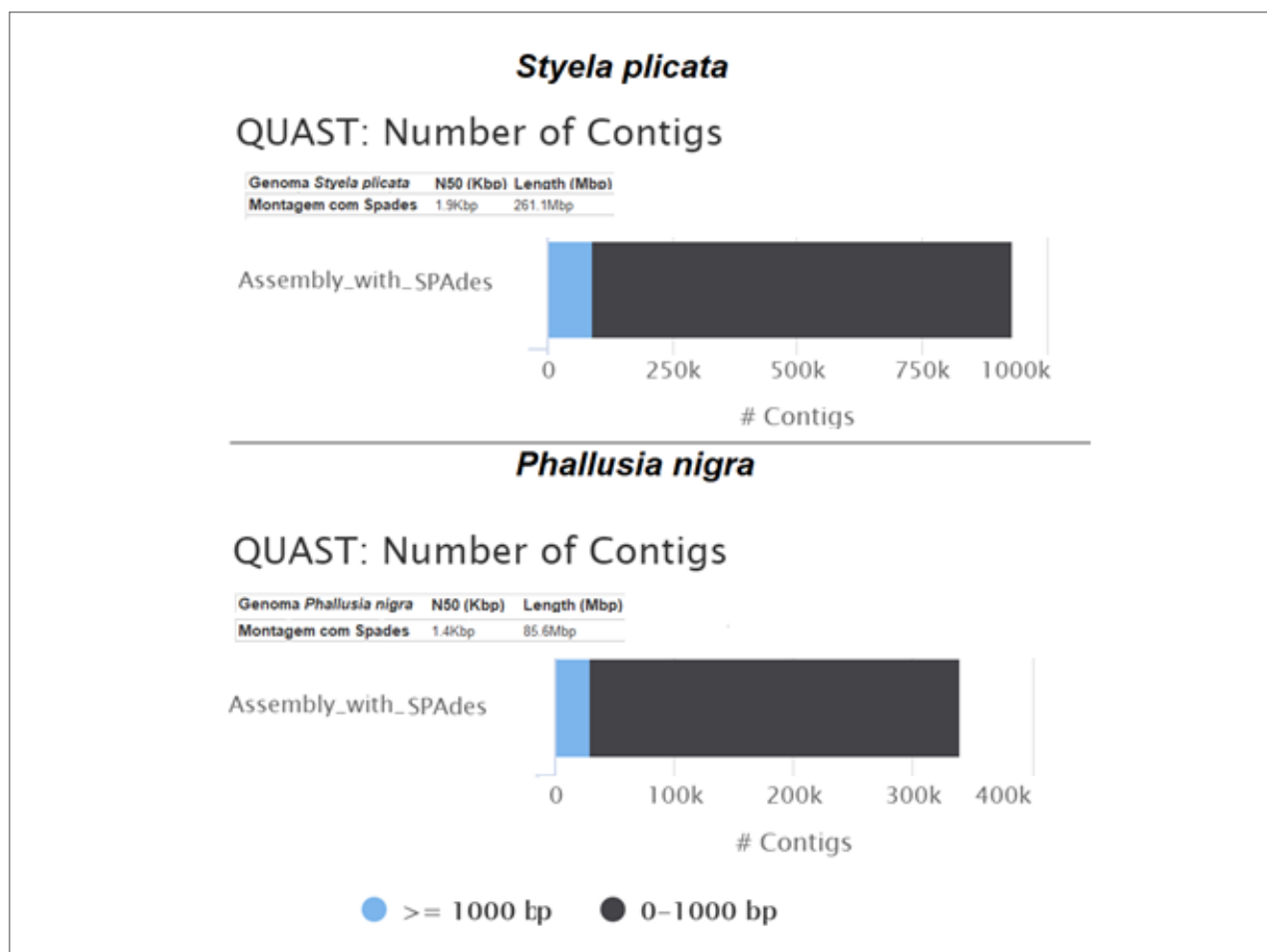


Figura 2. Tamanho dos genomas das espécies *Styela plicata* e *Phallusia nigra*. As montagens utilizando o programa SPAdes permitiram a obtenção de genomas parciais com sequências de 261,1 milhões de pares de bases (Mbp) e 85,6 Mbp das espécies *S. plicata* e *P. nigra*, respectivamente.

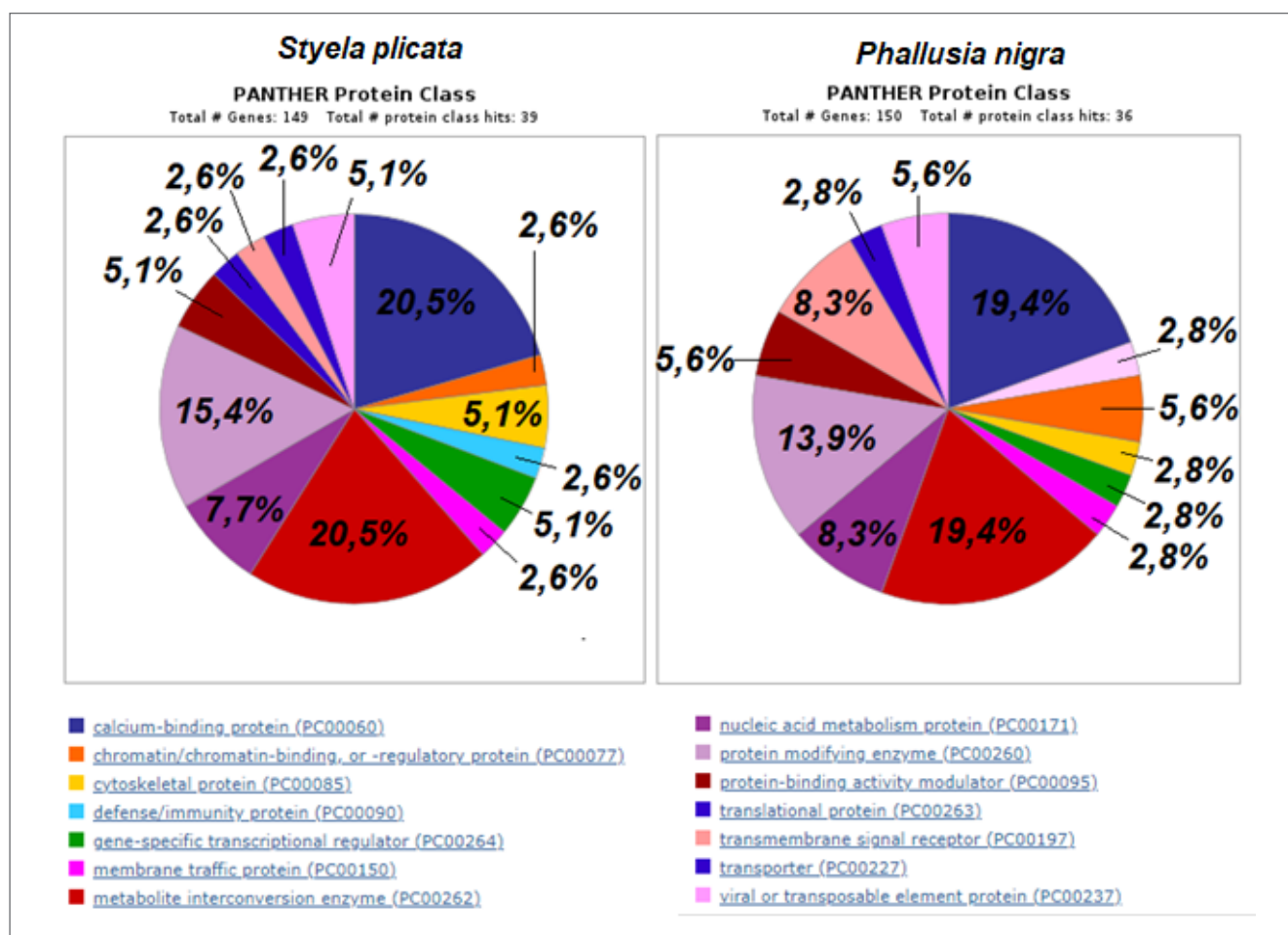


Figura 3. Categorização funcional dos genes identificados em *Styela plicata* e *Phallusia nigra*.

de elas serem expressas em pequena quantidade como proteínas de membrana. Independentemente disso, algumas sulfotransferases de células humanas já foram purificadas (ITO; HABUCHI, 2000) e seus DNA complementares clonados com base na sequência de aminoácidos das enzimas isoladas (BRANDAN; HIRSCHBERG, 1988; HASHIMOTO et al., 1992). Vale ressaltar que essas clonagens só foram possíveis em razão da disponibilidade de informações genéticas relativas ao genoma humano em bancos de dados públicos (HONKE; TANIGUCHI, 2002).

5. CONCLUSÕES

Este estudo comprovou que as SULT compreendem uma grande família de genes que contém várias enzimas distintas.

É consenso entre a comunidade científica que heterogeneidade dos GAG é atribuída ao grau e posição do grupamento sulfato ao longo de sua cadeia; logo, sua disposição está diretamente ligada à sua função (KOZLOWSKI et al., 2011). A quantidade dos genes encontrados corroborou os estudos que mostram que a variabilidade está relacionada à afinidade e à especificidade aos diferentes substratos existentes (ADAMS; MCDONALD, 1979).

Por meio deste estudo, desenvolvido em colaboração entre a MB e instituições externas à MB, foram contemplados objetivos elencados no Planejamento Estratégico da Marinha, como a cooperação com o desenvolvimento nacional pela promoção do conhecimento e do aproveitamento sustentável dos recursos naturais das áreas marinhas. Essa parceria interinstitucional profícua já articulou inúmeras linhas de pesquisa, incluindo a prospecção das

águas antárticas visando à obtenção e análise de polissacarídeos sulfatados de espécies marinhas ocorrentes em *habitats* extremos, além da determinação das atividades biológicas dessas moléculas. Este trabalho também se revelou um projeto piloto para a montagem do genoma de duas espécies fontes de compostos de interesse farmacológico, por intermédio do desenvolvimento de um protocolo de pré-processamento, montagem de genoma e validação por métricas de qualidade e de anotação que pode ser aplicado a outras espécies. Além disso, foi possível realizar uma análise de genômica comparativa, sobretudo utilizando informações públicas para a anotação de genes e a infraestrutura

de servidores de bioinformática gratuitos ao usuário, destacando-se o baixo orçamento associado ao expressivo volume de dados produzidos.

A abordagem desenvolvida para estas análises permitiu a reconstrução de uma quantidade de sequências suficiente para identificar e anotar um grande número de genes, inclusive os codificantes de glicosaminoglicano-sulfotransferases, além da identificação de importantes sequências participantes da biossíntese de diversos compostos bioativos; ainda que uma pequena porção tenha permanecido não classificada em razão da escassez de sequências depositadas de espécies próximas nas bases de dados genéticos.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, J. B.; MCDONALD, D. Enzymic synthesis of steroid sulphates. XII. Isolation of dehydroepiandrosterone sulphotransferase from human adrenals by affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 567, n. 1, p. 144-153, mar. 1979. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(79\)90181-5](https://doi.org/10.1016/0005-2744(79)90181-5)
- AQUINO, R. S.; GRATIVOL, C.; MOURÃO, P. A. S. Rising from the sea: Correlations between sulfated polysaccharides and salinity in plants. *PLoS One*, v. 6, n. 4, e18862, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018862>
- BLUM, J. C.; CHANG, A. L.; LILJESTHRÖM, M.; SCHENK, M. E.; STEINBERG, M. K.; RUIZ, G. M. The non-native solitary ascidian *Ciona intestinalis* (L.) depresses species richness. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 342, n. 1, p. 5-14, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2006.10.010>
- BRANDAN, E.; HIRSCHBERG, C. B. Purification of rat liver N-heparan-sulfate sulfotransferase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 263, n. 5, p. 2417-2422, fev. 1988. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)69223-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)69223-3)
- DEHAL, P.; SATOU, Y., CAMPBELL, R. K., CHAPMAN, J., DEGNAN, B., DE TOMASO, A., DAVIDSON, B., DI GREGORIO, A., GELPKE, M., GOODSTEIN, D. M., HARAFUJI, N., KENNETH E. M. HASTINGS, HO, I., HOTTA, K., HUANG, W., KAWASHIMA, T., LEMAIRE, P., MARTINEZ, D., MEINERTZHAGEN, I. A., ... ROKHSAR, D. S. The draft genome of *Ciona intestinalis*: Insights into chordate and vertebrate origins. *Science*, v. 298, n. 5601, p. 2157-2167, 2002. <https://doi.org/10.1126/science.1080049>
- GAB-ALLA, A. Distribution of the sea squirt *Ecteinascidia thurstoni* Herdman, 1890 (Ascidiacea : Perophoridae) along Suez Canal and Egyptian Red Sea Coasts. *Oceanologia*, v. 50, n. 2, p. 239-253, 2008.
- GANDRA, M.; CAVALCANTE, M.; PAVÃO, M. Anticoagulant sulfated glycosaminoglycans in the tissues of the primitive chordate *Styela plicata* (Tunicata). *Glycobiology*, v. 10, n. 12, p. 1333-1340, dez. 2000. <https://doi.org/10.1093/glycob/10.12.1333>
- HASHIMOTO, Y.; ORELLANA, A.; GIL, C.; HIRSCHBERG, C. B. Molecular cloning and expression of rat liver N-heparan sulfate sulfotransferase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 267, n. 22, p. 15744-15750, ago. 1992. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)49598-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)49598-7)
- HONKE, K.; TANIGUCHI, N. Sulfotransferases and sulfated oligosaccharides. *Medicinal Research Reviews*, v. 22, n. 6, p. 637-654, nov. 2002. <https://doi.org/10.1002/med.10020>
- HU, J.; SEEBERGER, P. H.; YIN, J. Using carbohydrate-based biomaterials as scaffolds to control human stem cell fate. *Organic & Biomolecular Chemistry*, v. 14, n. 37, p. 8648-8658, out. 2016. <https://doi.org/10.1039/C6OB01124A>
- ITO, Y.; HABUCHI, O. Purification and characterization of N-acetylgalactosamine 4-sulfate 6-O-sulfotransferase from the squid cartilage. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 44, p. 34728-34736, nov. 2000. <https://doi.org/10.1074/jbc.M909633199>
- KOZŁOWSKI, E. O.; LIMA, P.C., VICENTE, C.P.; LOTUFO, T.; BAO, X.; SUGAHARA, K.; PAVÃO, M.S.G. Dermatan sulfate in tunicate phylogeny: Order-specific sulfation pattern and the effect of [→4IdoA(2-Sulfate)β-1→3GalNAc(4-Sulfate)β-1→] motifs in dermatan sulfate on heparin cofactor II activity. *BMC Biochemistry*, v. 12, n. 1, p. 29, 2011. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-12-29>
- KUSCHE-GULLBERG, M.; KJELLÉN, L. Sulfotransferases in glycosaminoglycan biosynthesis. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 13, n. 5, p. 605-611, out. 2003. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2003.08.002>
- LODISH, H.; BERK, A.; KAISER, C. A.; KRIEGRE, M.; BRETSCHER, A.; PLOEGH, H.; AMON, A.; MARTIN, K. C. *Molecular Cell Biology*. 4. ed. Nova York: W. H. Freeman and Company, 2000.
- MEYER, K. H.; PIROUÉ, R. P.; ODIER, M. E. Les dérivés sulfatés de l'acide chondroïtine-sulfurique et leur action anticoagulante. Sur les polysaccharides aminés IV. *Helvetica Chimica Acta*, v. 35, n. 2, p. 574-588, 1952. <https://doi.org/10.1002/hlca.19520350223>

- NAGASAWA, K.; TOHIRA, Y.; INOUE, Y.; TANOURA, N. Reaction between carbohydrates and sulfuric acid: Part I. Depolymerization and sulfation of polysaccharides by sulfuric acid. *Carbohydrate Research*, v. 18, n. 1, p. 95-102, 1971. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)80261-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)80261-X)
- PAVÃO, M. S. G. Structure and anticoagulant properties of sulfated glycosaminoglycans from primitive Chordates. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 74, n. 1, p. 105-112, mar. 2002. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652002000100007>
- PAVÃO, M. S. G.; ALBANO, R. M.; LAWSON, A. M.; MOURÃO, P. A. S. Structural heterogeneity among unique sulfated L-galactans from different species of ascidians (tunicates). *Journal of Biological Chemistry*, v. 264, n. 17, p. 9972-9979, jun. 1989. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)81755-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)81755-0)
- PAVÃO, M. S. G.; VILELA-SILVA, A. C.; MOURÃO, P. A. S. Biosynthesis of chondroitin sulfate: from the early, precursor discoveries to nowadays, genetics approaches. *Advances in Pharmacology*, v. 53, p. 117-140, 2006. [https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(05\)53006-0](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(05)53006-0)
- POMIN, V. H.; MOURÃO, P. A. S. Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans. *Glycobiology*, v. 18, n. 12, p. 1016-1027, 2008. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwn085>
- RIZZO-VALENTE, V. S.; FUSCO, M. A.; CRUZ, R. M. M. L.; SANTOS, R. A.; SILVA, L. S.; ESCALEIRA, R. C.; SCHULZ, D. F.; BARROSO, S. P. C.; MIRANDA, B. L.; SANTOS, D. Z.; GREGÓRIO, M. L.; GUERRA, R. J. A.; PAVÃO, M. S. G. Effects of dermatan sulfate from marine invertebrate *Styela Plicata* in the wound healing pathway: a natural resource applied to regenerative therapy. *Marine Drugs*, v. 20, n. 11, p. 676, out. 2022. <https://doi.org/10.3390/md20110676>
- SIMPSON, T. S.; WERNBERG, T.; MCDONALD, J. I. Distribution and Localised Effects of the Invasive Ascidian *Didemnum perlucidum* (Monniot 1983) in an Urban Estuary. *PLoS One*, v. 11, n. 5, e0154201, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154201>
- SIMS, L. L. Osmoregulatory capabilities of three macrosympatric stolidobranch ascidians, *Styela clava* Herdman, *S. plicata* (Lesueur), and *S. montereyensis* (Dall). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 82, n. 2-3, p. 117-129, 1984. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(84\)90098-4](https://doi.org/10.1016/0022-0981(84)90098-4)
- THOMSON, D.; PANAGOS, C. G.; VENKATASAMY, R.; MOSS, C.; ROBINSON, J.; BAVINGTON, C. D.; HOGWOOD, J.; MULLOY, B.; UHRÍN, D.; SPINA, D.; PAGE, C. P. Structural characterization and anti-inflammatory activity of two novel polysaccharides from the sea squirt, *Asciella aspersa*. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, v. 40, p. 69-79, out. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2016.05.001>
- UCHIMURA, K.; KADOMATSU, K.; NISHIMURA, H.; MURAMATSU, H.; NAKAMURA, E.; KUROSAWA, N.; HABUCHI, O.; EL-FASAKHANY, F.M.; YOSHIKAI, Y.; MURAMATSU T. Functional analysis of the chondroitin 6-sulfotransferase gene in relation to lymphocyte subpopulations, brain development, and oversulfated chondroitin sulfates. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 2, p. 1443-1450, jan. 2002. <https://doi.org/10.1074/jbc.m104719200>
- VASCONCELOS, A. A.; POMIN, V. H. Marine carbohydrate-based compounds with medicinal properties. *Marine Drugs*, v. 16, n. 7, p. 233, jul. 2018. <https://doi.org/10.3390/md16070233>