

ESTABILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS POR OSMÓLITOS

PROTEIN STABILIZATION BY OSMOLYTES

Yara Almeida VIANA¹; Mario da Silva GARROTE FILHO¹; Nilson PENHA-SILVA²

RESUMO: Os osmólitos constituem um grupo de solutos de baixo peso molecular envolvidos na estabilização protéica, em resposta a condições ambientais de estresse. Esses solutos, encontrados mesmo em organismos bastante distantes dentro da escala evolutiva, forçam as proteínas a se renovarem e a resistirem a desnaturação. Evidências sugerem que os osmólitos atuam modificando as propriedades do solvente em que a proteína encontra-se imersa, afetando desta forma as interações que a superfície da proteína estabelece com o solvente.

UNITERMOS: Estabilização, Osmólitos, Proteínas, Termodinâmica.

ASPECTOS GERAIS

As proteínas apresentam enorme diversidade de função e constituem as macromoléculas mais abundantes na natureza. O arcabouço que forma a maioria dos organismos vivos; os anticorpos; além de muitos transportadores e hormônios, são proteínas. As enzimas, que apresentam a habilidade de aumentar de maneira extraordinária a velocidade das reações químicas, constituem as biomoléculas mais especializadas dentro deste grupo (LEHNINGER; NELSON; COX, 1993).

Inúmeras condições de estresse ambiental, como calor, radicais livres e altas concentrações de sais, podem comprometer a atividade biológica dessas moléculas. O acúmulo de íons inorgânicos, como potássio, além de aminoácidos, como glutamato, prolina e glutamina, foi um dos mecanismos intracelulares inicialmente empregado para prevenir tais efeitos deletérios em procariotos (WELSH, 2000). Posteriormente, a ampla utilização de solutos coletivamente conhecidos como osmólitos tornou-se uma estratégia freqüentemente observada na natureza para assegurar a sobrevivência dos organismos nessas condições adversas (RHODES, 1987; SOMERO, 1986; YANCEY et al., 1982).

Os níveis intracelulares de osmólitos dependem do organismo, de sua disponibilidade no meio, e do tipo, severidade e duração do estresse osmótico (DIAMANT et al., 2001). Por essa razão, eles podem ser encontrados

em concentrações que variam de dezenas a centenas de milimolar.

Os osmólitos permitem que as proteínas mantenham suas atividades biológicas porque atuam como estabilizadores da estrutura protéica, sem, contudo, comprometer a eficiência de sua função dentro da célula (BOWLUS; SOMERO, 1979; YANCEY et al., 1982; YANCEY, 1985).

CLASSIFICAÇÃO DOS OSMÓLITOS

Estes solutos estabilizantes de ocorrência natural são quimicamente classificados em três grupos: (1) poliálcoois, como glicerol e sorbitol; (2) aminoácidos e seus derivados, como as metilaminas betaína e sarcosina; e (3) açúcares, como sacarose e trealose (YANCEY et al., 1982). No caso da betaína, é particularmente interessante observar que esse composto, derivado da colina, após sucessivas desmetilações dá origem à dimetilglicina, à metilglicina e à glicina (RODWELL, 1993), compostos que constituem uma família análoga de estabilizadores.

Considerando-se o aspecto funcional, há ainda uma outra classificação para estes solutos. Aqueles que exercem pequenos efeitos sobre a função protéica são classificados como solutos compatíveis. Já os osmólitos que combatem os efeitos que solutos deletérios têm sobre as proteínas são denominados solutos neutralizantes (BOROWITZA; BROWN, 1974; YANCEY et al., 1982).

¹ Pesquisadores associados ao Instituto de Genética e Bioquímica da UFU - Universidade Federal de Uberlândia.

² Professor titular do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU - Universidade Federal de Uberlândia.

Received: 20/07/04 Accept: 13/01/05

ATUAÇÃO DOS OSMÓLITOS

As altas pressões hidrostáticas a que muitos organismos estão submetidos são compensadas pelo acúmulo de osmólitos até concentrações de 300 mmol/kg de massa corporal, sendo que este acúmulo é proporcional à profundidade em que estes animais vivem (GILLET et al., 1997).

Rãs, tartarugas e insetos são animais que hibernam em situações de frio intenso, o que é acompanhado por uma redução do metabolismo. Os fluidos corporais desses animais não congelam pelo acúmulo de osmólitos. Caso contrário, ter-se-ia uma situação incompatível com a vida (STOREY et al., 1996).

Organismos anidrobióticos são beneficiados com o acúmulo desses solutos estabilizantes, que mantêm viáveis tecidos que enfrentam estresse hídrico e que tenham uma concentração de água que pode até mesmo ser inferior à 0,1% (PANEK, 1996). Este efeito protetor é usualmente observado com solutos da classe dos carboidratos, que estabelecem ligações de hidrogênio com proteínas, de modo a dispensar a participação da água, que normalmente seria responsável por essas ligações.

Vários ensaios *in vitro* têm comprovado a ação protetora dos osmólitos.

A malato desidrogenase é protegida contra desnaturação a 44 °C por concentrações fisiológicas de betaína, trealose, prolina ou glicerol. Estes solutos promovem uma diminuição dos movimentos de grupos da proteína mesmo em temperaturas elevadas o suficiente para promover sua agregação e desnaturação (DIAMANT et al., 2001).

A incorporação de sacarose ou trealose a 1,5 mol.L⁻¹ aumenta consideravelmente a temperatura intermediária da transição de desnaturação térmica (T_m) da lisozima TAP2. O termo T_m vem do inglês **melting temperature**, que significa temperatura de fusão, pois corresponde à temperatura intermediária de transição entre o estado nativo, em que a proteína está enovelada, e o estado desenovelado, em que a proteína apresenta conformações completamente randômicas. A presença de um osmólito permite que, mesmo no estado desnaturado, a lisozima apresente α -hélices e preserve alguma estrutura terciária. A adição destes açúcares também diminui a taxa de agregação e a ocorrência de processos como racemização e desaminação nesta enzima (UEDA; MAKIKO; IMOTO, 2001). Uma baixa incidência destes eventos, além de uma reduzida ocorrência de reações oxidativas, também são observados para a holoenzima e para a apoenzima da álcool desidrogenase de levedura, na presença de solutos como

trealose, sacarose, sorbitol e manitol (MIROLIAEI; NEMAT-GORGANI, 2001).

A presença de glicerol, xilose e polietilenoglicol têm um pequeno efeito sobre a complexação da proteína repressora do triptofano (TR) com um segmento derivado do operon TRP EDCBA de *Escherichia coli*. De acordo com esses estudos, isso poderia ser justificado pelo aumento da estabilidade da proteína e conseqüente diminuição da sua flexibilidade. Entretanto, a análise da variação de energia livre envolvida na complexação dos três dímeros de TR ao seu opéron mostra que a presença de betaína interfere no grau de cooperatividade desta interação (BROWN et al., 1999).

O S PRO, um dos fragmentos que constitui a ribonuclease, é protegido contra desnaturação térmica pela adição de sarcosina, que promove uma elevação da temperatura de transição térmica desta enzima (T_m) de 35,3 °C para 53,5 °C. Na presença deste soluto, o S PRO também adquire uma estrutura mais compacta e menos susceptível à clivagem pela tripsina, ocorrendo inclusive proteção do fragmento S PRO 38-124, que normalmente seria clivado. De forma geral, a ligação dos fragmentos S PRO e S PEP, que constituem a ribonuclease, mostra-se mais forte na presença de sarcosina (RATNAPARKHI; VARADARAJAN, 2001).

Proteínas como a ribonuclease A, o citocromo C, a mioglobina e a lisozima, apresentam um aumento na temperatura de transição térmica com a adição de alguns osmólitos. Entretanto, a variação de energia livre de desnaturação dessas biomoléculas não é afetada, à temperatura de 25 °C, pela adição de tais solutos, o que naturalmente seria importante para não alterar o **turnover** dessas proteínas (ANJUM; RISHI; AHMAD, 2000).

A N-óxido trimetilamina (TMAO) interfere na ação da proteína TAU, que, associada aos microtúbulos, atua no processo de nucleação, polimerização e manutenção durante a reunião de tubulina, inclusive na presença de agentes caotrópicos (TSENG; GRAVES, 1998). Recentemente, a associação de L-prolina a esta chaperonina química, com conhecida capacidade de induzir estruturas secundárias e terciárias, revelou a habilidade em promover uma maior regularidade na estrutura cristalina da proteína básica da mielina, que normalmente é considerada como uma proteína desestruturada (HILL et al., 2002).

O gene supressor de tumor p53, um dos reguladores centrais da resposta ao DNA danificado, mostrou ser capaz de induzir o acúmulo de ceramidas, compostos que apresentam múltiplas atividades biológicas, que incluem controle do ciclo celular, apoptose e

capacidade de responder ao estresse desnaturante de proteínas pela sua ação como osmólito (DBAIBO, 1997).

É particularmente interessante observar que o uso de um tipo de osmólito orgânico não é delineado pela posição filogenética do organismo. Glicina e betaína são usados por invertebrados marinhos, eubactérias e plantas halofílicas, mas também são encontrados nos rins de mamíferos, o que consiste numa verdadeira convergência evolutiva (SOMERO, 1986). Fields (2001) sugere inclusive que a utilização de solutos estabilizantes pelos organismos para prevenir efeitos deletérios sobre as suas estruturas protéicas é altamente benéfica, porque permite que eles possam adaptar-se a vários nichos térmicos e colonizar novas áreas com mais facilidade, alterando os níveis destes aditivos.

A atividade osmorregulatória também está bastante caracterizada em mamíferos. Na medula renal, onde as concentrações de uréia, um agente com reconhecida habilidade de desenovelar proteínas, é bastante alta, ocorre síntese de sorbitol e glicerofosforilcolina, além de acúmulo de inositol e betaína (GARCIA-PEREZ; BURG, 1990).

A forma recombinante do interferon- α humano, quando submetida à inativação térmica, tem a meia vida da sua atividade antiviral bastante aumentada quando colocada na presença de albumina sérica bovina, monossacarídeos, aminoácidos e polióis. Entretanto, na ausência destes aditivos, é observado um decaimento exponencial da sua atividade antiviral (ŠEBEKA *et al.*, 2001).

In vitro, embriões de mamíferos desenvolvem-se melhor em meio hiperosmótico pela adição de osmólitos (DAWSON; BALTZ, 1997). *In vivo*, em ratos, há uma variação no perfil destes solutos ao longo do desenvolvimento (MILLER; HANSON; YANCEY, 2000).

Uma das mais recentes e interessantes descobertas relacionadas à ação dos osmólitos refere-se a sua influência na ação das chaperoninas, regulando desta forma a homeostase das proteínas. Betaína e glicerol ativam a chaperona LS (GroEL + GroES) de *E. coli* em 30 a 40% durante o enovelamento de malato desidrogenase termicamente desnaturada associada à GroEL. Além disso, na ausência da GroES, o enovelamento ocorre doze vezes mais rápido com a adição de glicerol a 3,8 mol.L⁻¹ (DIAMANT *et al.*, 2001). Segundo Bolen e Baskakov (2001), a presença destes solutos estabilizantes asseguraria o enovelamento adequado destas biomoléculas mesmo quando elas não estão submetidas a condições de estresse.

MECANISMO DE AÇÃO

A desnaturação de uma proteína, em determinadas circunstâncias, é um processo reversível. Isso significa que os estados nativo e desnaturado estão em equilíbrio. Esse equilíbrio é afetado pela alteração de estabilidade de um desses estados, ou de ambos. E a estabilidade será tanto maior, quanto menor for o conteúdo energético. Sabendo-se disso, seria de se esperar que um osmólito promovesse a estabilização de uma proteína pela redução do conteúdo energético do estado nativo ou aumentando o conteúdo energético do estado desnaturado. Entretanto, ao contrário do que possa parecer, o mecanismo de estabilização dos osmólitos envolve um aumento do conteúdo energético desses dois estados, só que em diferentes proporções (LEE, 2000).

A interação entre um osmólito e uma proteína é geralmente desfavorável. Por isso são preferencialmente excluídos da superfície da mesma, resultando na formação de uma camada de hidratação ao redor da proteína. Essa camada é constituída por moléculas de água altamente organizadas, que possuem uma mobilidade menor, pois não podem se mover tão livremente como as demais moléculas de água que constituem o solvente aquoso. A manutenção da organização das moléculas de água da camada de hidratação requer energia. E quanto mais extensa for a camada de hidratação, o que por sua vez está relacionado com o número de moléculas de água que a constituem, maior será o conteúdo de energia envolvido em sua manutenção (TIMASHEFF, 2002; TIMASHEFF; ARAKAWA, 1989).

Os osmólitos atuam tanto sobre o estado nativo, quanto sobre o desnaturado. Entretanto, a superfície da proteína exposta ao solvente é maior no estado desnaturado do que no estado nativo. Na proteína desnaturada há a formação de uma camada de hidratação mais extensa, que envolve um maior conteúdo de energia livre por mol de proteína (potencial químico). Portanto, o potencial químico do estado desnaturado será maior do que o do estado nativo. Isso favorece o deslocamento do equilíbrio em direção ao estado nativo, que dessa forma é estabilizado. Esse é o princípio de atuação dos osmólitos, e é denominado de efeito solvofóbico (GEKKO; TIMASHEFF, 1981; BOLEN; BASKAKOV, 2001).

Acredita-se que os osmólitos também promovam um aumento da polaridade do solvente, fortalecendo o efeito hidrofóbico, que é o principal responsável pela estabilidade do estado nativo. Esse efeito é decorrente de interações desfavoráveis entre grupamentos apolares da estrutura da proteína com um solvente aquoso polar. Essas interações são desfavoráveis porque envolvem

aumento da energia livre, pois esses grupamentos apolares, para serem solvatados, requerem a formação ao seu redor de uma camada de hidratação constituída por moléculas organizadas de água. Tanto o efeito hidrofóbico, quanto o efeito solvofóbico, se baseia no mesmo princípio, o qual consiste em promover a desestabilização de uma proteína para, desse modo, estabilizá-la, pois ambos os efeitos baseiam-se em interações desfavoráveis (BOLEN; BASKAKOV, 2001).

A intensificação do efeito hidrofóbico pela presença de osmólitos pode ser constatada por estudos sobre a estabilidade do complexo formado entre o íon benzamidínio e a tripsina bovina. Esses estudos mostraram que a presença de glicerol torna ainda mais desfavorável o contato do anel benzênico do íon benzamidínio com o solvente, conforme mostram cálculos de energia livre. Com isso, a inclusão desse íon nos sítios hidrofóbicos da enzima com os quais interage seria favorecida (VIANA, 2003). Isso sugere que a presença do osmólito promoveria uma alteração da constante dielétrica do solvente, tornando-o mais polar. Outras propriedades do solvente também poderiam ser alteradas (SAUNDERS *et al.*, 2000).

Simulações de dinâmica molecular mostraram que a uréia, ao interagir com uma esfera hidrofóbica promove o deslocamento de moléculas de água da camada de

hidratação. Com isso, há uma redução da quantidade de energia livre necessária para a manutenção dessa camada, levando a uma redução do potencial químico do estado desnaturado, que então seria estabilizado, em detrimento do estado nativo. Isso favoreceria o processo de desnaturação (TSAI; GERSTEIN; LEVITT, 1996).

Os osmólitos também são eficazes em permitir que o estado nativo suporte elevações de temperatura acima das quais normalmente a proteína seria desnaturada. Diamant e colaboradores (2001) mostraram que o aumento na viscosidade do solvente determinado pela presença do osmólito apresenta uma correlação positiva com o efeito de termoproteção da proteína.

CONCLUSÕES

Os osmólitos constituem um grupo de solutos que indiscutivelmente contribuem para estabilizar a estruturas protéicas dos seres vivos, sem contudo comprometer a função destas biomoléculas dentro da célula. A ação osmorregulatória envolve mudanças nas propriedades do solvente, afetando desta forma as interações que a proteína estabelece com o meio em que se encontra. Na presença dos osmólitos, o estado nativo da proteína torna-se energeticamente mais favorável que o estado desenovelado.

ABSTRACT: Osmolytes comprise a group of solutes with low molecular weight involved in the protein stabilization against environmental stress conditions. These solutes, encountered even in organisms that are very far in the evolutionary scale, force proteins to fold and resist to denaturation. Evidences suggest that osmolytes act modifying the properties of the solvent in which the protein is immersed, affecting in this way the interactions that the protein surface establish with the solvent.

UNITERMS: Osmolytes, Proteins, Stabilization, Thermodynamic.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANJUM, F.; RISHI, V.; AHMAD, F. Compatibility of osmolytes with Gibbs energy of stabilization of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1476, n.1, p. 75-84, Jan. 2000.

BOLEN, D. W.; BASKAKOV, I. V. The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 310, n. 5, p. 955-963, July 2001.

BOROWITZA, L. J.; BROWN, A. D. The salt relations of marine and halophilic species of the unicellular green alga *Dunaliella*: the role of glicerol as a compatible solute. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 96, n. 1, p. 37-52, Mar. 1974.

BOWLUS, R. D.; SOMERO, G. N. Solute compatibility with enzymes function and structure: rationales for selection of osmotic agents and end-products or anaerobic metabolism in marine invertebrates. **Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 208, n. 2, p. 137-152, May 1979.

BROWN, M. P.; GRILLO, A. O.; BOYER, M.; ROYER, C. A. Probing the role of water in tryptophan repressor-operator complex. **Protein science**, New York, v. 8, n. 6, p. 1276-1285, June 1999.

DAWSON, K. M.; BALTZ, J. M. Organic osmolytes and embryos: substrates of the Gly and β Transport systems protect mouse zygotes against the effect of raised osmolarity. **Biology of Reproduction**, New York, v. 56, n. 6, p. 1550-1558, June 1997.

DBAIBO, G. S. Regulation of stress response by ceramide. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 25, n. 2, p. 557-561, May 1997.

DIAMANT, S.; ELIAHU, N.; ROSENTHAL, D.; GOLOUBINOFF, P. Chemical chaperones regulate molecular chaperones *in vitro* and in cells under combined salt and heat stresses. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 43, p. 39586-39591, Oct. 2001.

FIELDS, P. A. Review: Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, Oxford, v. 129, n. 2-3, p. 417-431, June 2001.

GARCIA-PEREZ, A.; BURG, M. B. Importance of organic osmolytes for osmoregulation by renal medullary cells. **Hypertension**, Dallas, v. 16, n. 6, p. 595-602, Dec. 1990.

GEKKO, K.; TIMASHEFF, S. N. Mechanism of protein stabilization by glicerol: preferential hydration in glicerol-water mixtures. **Biochemistry**, Washington, v. 20, n.16, p. 4667-4676, Aug. 1981.

GILLETT, M. B.; SUKO, J. R.; SANTOSO, F. O.; YANCEY, P. H. Elevated levels of trimethylamine oxide in muscles of deep-sea gadiform teleosts: a high pressure adaptation. **Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 279, n. 4, p. 386-391, Nov. 1997.

HILL, C. M.; BATES, I. R.; WHITE G. F.; ROSS HALLET, F.; HARAUZ, G. Effects of osmolyte trimethylamine-N-oxide on conformation, self association, and two-dimensional crystallization of myelin basic protein. **Journal of Structural Biology**, San Diego, v. 139, n.1, p. 13-26, July 2002.

LEE, J. C. Biopharmaceutical formulation. **Current opinion in Biotechnology**, London, v. 11, n.1, p. 81-84, Feb. 2000.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. An introduction to proteins. In: _____. **Principles of biochemistry**. New York: Worth, 1993. chap. 6, p. 134-159.

MILLER, T. J.; HANSON, R. D.; YANCEY, P. H. Developmental changes in organic osmolytes in prenatal Y posnatal rat tissues. **Comparative Biochemistry and Physiology-Part A**, New York, v. 125, n.1, p. 45-56, Jan. 2000.

MIROLIAEI, M.; NEMAT-GORGANI. Sugars protect native and apo yeast alcohol dehydrogenase against irreversible thermoinactivation. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 29, n. 8-9, p. 554-559, Nov. 2001.

PANEK, A. D. Trehalose metabolism-new horizons in technological applications. **Brazilian Journal o Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 28, n. 2, p. 169-181, Feb. 1996.

RATNAPARKHI, G. S.; VARADARAJAN, R. Osmolytes stabilize Ribonuclease S by stabilizing its fragments S protein and S peptide to compact folding-competent states. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 276, n. 31, p. 28789-28798, Aug. 2001.

RODWELL, V. W. Biosynthesis of the nutritionally nonessential amino acids. In: MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. (Ed.) **Harper's biochemistry**. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1993. p. 287-292.

RHODES, D. Metabolic response to stress. In: DAVEIS, D. D (Ed.). **The biochemistry of plants: a comprehensive treatise**. New York: Academic, 1987. p. 201-204.

SAUNDERS, A. J.; DAVIS-SEARLES, P. R.; ALLEN, D. L.; PIELAK, G. J.; ERIE, D. A. Osmolyte induced changes in protein conformational equilibria. **Biopolymers**, New York, v. 31, n. 4, p. 5278-5283, Apr. 2000.

ĐEBĚCA, H. K.; STARKUVIENĖ, B.; REPĐIENĖ, O. V.; PAULIUKONIS, A. A.; BUMELIS, V. A. Comparative effects of stabilizing additives on the rates of heat inactivation of recombinant human interferon α -2b in solution. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 50, n. 2, p. 117-127, May 2001.

SOMERO, G. N. Protons, osmolytes and fitness of internal milieu for protein function. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 251, n.2, p. R197-R213, Aug. 1986.

STOREY, K. B.; MOSSER, D. D.; DOUGLAS, D. N.; GRUNDY, J. E.; STOREY, J. M. Biochemistry bellow 0 °C: nature's frozen vertebrates. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 3, p. 283-307, Mar. 1996.

TIMASHEFF, S. N. Thermodynamics binding and site occupancy in the light of the Schellman exchange concept. **Biophysical Chemistry**, Amsterdam, v. 101-102, p. 99-111, Dec. 2002.

TIMASHEFF, S. N.; ARAKAWA, T. Stabilization of protein structure by solvents. In: CREIGHTON, T. E. (Ed.). **Protein structure: a practical approach**. Oxford: IRL, 1989. p. 331-345.

TSAI, J.; GERSTEIN, M.; LEVITT, M. Keeping the shape but changing the charges: a simulation study of urea and its iso-steric analogs. **The Journal of Chemical Physics**, New York, v. 104, n. 23, p. 9417-9430, June 1996.

TSENG, H. C.; GRAVES, D. J. Natural methylamine osmolytes trimethylamine N-oxide and betaine, increase TAU-induced polymerization of microtubules. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 250, n. 3, p. 726-730, Sept. 1998.

UEDA, T.; MAKIKO, N.; IMOTO, T. Aggregation and chemical reaction in hen lysozyme caused by heating at pH 6 are depressed by osmolytes, sucrose and trehalose. **The Japanese Biochemical Society**, Tokyo, v. 130, n. 4, p. 491-496, Oct. 2001.

VIANA, Yara Almeida. **Entalpia de Van't Hoff e energia livre de Gibbs para associação de tripsina bovina com o íon benzamidínio sob concentrações crescentes de glicerol**. 2003. 44 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2003.

WELSH, D. T. Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 24, n. 3, p. 263-290, July 2000.

YANCEY, P. H. Organic osmotic effectors in cartilaginous fishes. In: GILLES, R.; GILLES-BAILLIEN, M. (Ed.). **Transport process, ionic- and osmoregulation**. New York: Springer-Verlag, 1985. p. 424-436.

YANCEY, P. H.; CLARK, M. E.; HAND, S. C.; BOWLUS, R. D.; SOMERO, G. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. **Science**, Washington, v. 21, n. 4566, p. 1214-1222, Sept. 1982.