

maria Ignez Moretto

Metabolismo Oxidativo em Mitocôndria de
Tecido Animal: Estudo comparativo.

Tese de Mestrado em Bioquímica
apresentada ao Instituto de
Bioquímica da Universidade Fe-
deral do Paraná.

Curitiba

1970

mària Ignez Moretto

Metabolismo Oxidativo em Mitocôndria de
Tecido Animal: Estudo comparativo.

Tese de Mestrado em Bioquímica
apresentada ao Instituto de
Bioquímica da Universidade Fe-
deral do Paraná.

Curitiba

1970

C O N T E Ú D O

| | |
|---------------------------------|----|
| Introdução....., pag. | 1 |
| Material e métodos..... | 4 |
| Resultados..... | 6 |
| Tabela I..... | 6 |
| Tabela II..... | 7 |
| Fotomicrografias eletrônicas.., | 8 |
| Fotomicrografias eletrônicas... | 9 |
| Discussão..... | 10 |
| Conclusões....., | 11 |
| Sumário....., | 12 |
| Agradecimentos....., | 12 |
| Referências..... | 13 |

O presente trabalho foi realizado com bolsa de estudos da Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES).

INTRODUÇÃO

"Desde 1780 existem experimentos de Lavoisier sobre a necessidade de oxigênio pelas substâncias vivas. Difícil torna-se especificar o primeiro a descrever as mitocôndrias como organelas distintas do citoplasma. Entre 1850 e 1890 muitos citologistas observaram elementos granulares e inclusões no citoplasma de diferentes células"(1). O trabalho de Regaud (2), publicado em 1908 expõe a idéia de que as mitocôndrias são formadas por fosfolipídeos e proteínas, teoria aceita por outros pesquisadores. Observações sobre oxidações biológicas foram feitas já em 1911 por Thunberg (3). Neste mesmo ano, Batelli e Stern (4) demonstraram que o citrato, succinato, fumarato e malato eram rapidamente oxidados por músculo de rã.

Em 1936, Potter e Elvehjen (5) introduziram a técnica do homogeneizado, pois até então, preparações de tecidos para estudo do consumo de oxigênio eram feitas apenas em fatias ou pedaços de tecidos. Martius e Knoop (6) também revelaram neste ano, o mecanismo da conversão de citrato em succinato. A maior parte do ciclo dos ácidos cítricos foi relatada em 1937 quando Krebs e Johnson (7) descreveram a formação do citrato a partir de oxaloacetato e piruvato.

Bensley e Hoerr (8) em 1934 e Bensley (9) em 1937 descreveram o isolamento de grânulos de fígado de cobaia referindo-se a eles como mitocôndrias. Claude (10) descreveu a separação de grânulos citoplasmáticos por centrifugação diferencial, tendo estudado suas estruturas e composição química, comparando-os com mitocôndrias.

O estudo da distribuição intracelular da succinato desidrogenase, citocromo oxidase, adenina trifosfatase e compostos do fósforo em tecido de rato normal foi feito em 1946 por Schneider (11). O autor verificou que a maior parte da atividade enzimática testada encontrava-se associada com os grandes grânulos.

Somente em 1948, quando Hogeboom, Schneider e Palla-de (12) usaram sacarose 0,38 M em lugar de água ou solução de cloreto de sódio para a dispersão das células de fígado, conseguiram através de centrifugação diferencial, isolar mitocôndrias com morfologia e propriedades de coloração semelhantes às intracelulares. Verificaram

que 65 a 82% da atividade de succinoxidase do homogeneizado original estava presente nestas partículas. Kennedy e Lehninger (13) imediatamente utilizaram o método para isolamento de mitocôndrias. Observaram em mitocôndrias isoladas a oxidação de intermediários do ciclo do ácido cítrico com velocidade compatível à do fígado intacto, assim como a ocorrência de fosforilação oxidativa. Verificaram que a velocidade de consumo de oxigênio produzida pela oxidação dos diferentes substratos era a seguinte: citrato > α -cetogluturato > endógeno.

Plaut e Plaut (14) estudaram o metabolismo oxidativo em mitocôndrias de coração de cobaia e o QO_2 obtido frente aos diferentes substratos segue a sequência: succinato > α -cetogluturato > malato > fumarato > acetato > piruvato > citrato = isocitrato.

No estudo de Lardy e Wellman (15) sobre a fosforilação oxidativa por mitocôndrias de fígado de rato observa-se a seguinte sequência para o QO_2 : succinato > citrato > glutamato > α -cetogluturato > malato > fumarato. No estudo realizado por Chappell e Perry (16) sobre a atividade respiratória de mitocôndrias de músculo esquelético de peito de pombo, os autores obtiveram QO_2 para succinato > α -cetogluturato > malato > fumarato > citrato. Montgomery e Webb (17) em 1956 fizeram estudo metabólico em mitocôndrias de coração de rato, obtendo a sequência para QO_2 : α -cetogluturato > oxaloacetato > succinato > malato > isocitrato > fumarato > citrato > piruvato > endógeno.

Yagi e Nagatsu (18) estudando o efeito das flavinas sobre a respiração de mitocôndrias de fígado de rato obtiveram a seguinte sequência para o QO_2 : succinato > α -cetogluturato > malato.

O estudo sobre as propriedades bioquímicas de mitocôndrias de músculo esquelético realizado por Azzone e Carafoli (19) mostrou que o QO_2 para mitocôndrias de peito de pombo segue a sequência: α -cetogluturato > oxaloacetato > succinato > piruvato > malato > fumarato > glutamato > citrato. Para músculo esquelético de rato: glutamato > piruvato > α -cetogluturato > succinato > citrato. Enquanto que para mitocôndria de fígado de rato: succinato > glutamato > α -cetogluturato > piruvato > fumarato > citrato > oxaloacetato.

Azzone et al. (20) verificaram a alta velocidade oxidativa do α -cetogluturato e glutamato em mitocôndrias de músculo esquelético humano, ao passo que os demais metabólitos do ciclo de Krebs, assim como o glicérol-1-fosfato foram oxidados lentamente. As reações se processavam em meio contendo inclusive hexoquinase, glicose e fosfato inorgânico.

O trabalho de Worcel e Erecinska (21) mostra que o

succinato é melhor oxidado por mitocôndrias de fígado de rato do que o piruvato, α -cetogluturato e malato. Borst (22) estudou a oxidação do glutamato em preparações mitocondriais de diferentes tecidos, tendo verificado que o glutamato era mais utilizado por coração de rato do que por músculo de peito de pombo ou fígado de rato. Observou ainda que em sarcossomas de coração de rato o QO_2 para o glutamato era maior do que para malato.

O QO_2 para o piruvato em mitocôndrias de rato segue a sequência: cérebro > fígado > músculo esquelético, a qual é observada no trabalho de Bellamy (23). Kiessling (24) estudando respiração mitocondrial mostrou que o piruvato é oxidado por mitocôndrias de rim > cerebelo > fígado > cérebro > músculo. Bacila et al. (25) mostram que o consumo de oxigênio por mitocôndrias de cérebro de rato segue a sequência: α -oxogluturato > succinato > glutamato > endógeno. Campello et al. (26) observaram que o succinato é melhor oxidado do que o glutamato em mitocôndrias de coração, cérebro e cerebelo de rato. Brandão et al. (27) mostram que o consumo de oxigênio em μl por hora, em mitocôndrias de coração de Strophocheilus oblongus segue a sequência malato > succinato > α -glicerofosfato > citrato > isocitrato > glutamato > α -cetogluturato > endógeno.

Deshpande et al. (28) utilizando microscopia eletrônica realizaram estudos morfológicos de mitocôndrias isoladas de coração de coelho. Estudos semelhantes com rim e fígado de rato foram feitos por Weinbach (29), de fígado de rat por Bahr e Zeitter (30), de cérebro de bovino por Stahl et al. (31) e de cérebro de rato por Bacila e Voss (32).

No presente trabalho foi realizado um estudo comparativo da oxidação de diversos substratos por mitocôndrias isoladas de rim, músculo esquelético, coração, cérebro, cerebelo, fígado e baço. Com finalidade de comparação estrutural e ao mesmo tempo controle de pureza, foram realizadas fotomicrografias eletrônicas das mitocôndrias isoladas.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento de mitocôndrias.

1. Mitocôndrias de fígado, cérebro e rim.- Ratos brancos, espécie Wistar, foram decapitados e os órgãos imediatamente removidos, dissecados e lavados em meio manito-sacarose (33) gelado. Os órgãos foram cortados em pequenos fragmentos, suspensos em meio de extração (manitol 0,21 M, sacarose 0,075 M, TRIS 0,01 M e EDTA 0,1 mM, sendo o pH final de 7,4) e homogeneizados em homogeneizador de Potter-Elvehjem. A suspensão assim obtida foi centrifugada a 1.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos. As mitocôndrias sedimentadas foram suspensas no mesmo meio, recentrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos e novamente lavadas. As mitocôndrias sedimentadas foram finalmente suspensas em meio de extração suficiente para uma concentração final de 15 mg/ml de proteína.

2. Mitocôndrias de coração, cerebelo e baço.- Ratos brancos, espécie Wistar, foram decapitados e os órgãos imediatamente removidos, dissecados e lavados em meio de extração preconizado por Voss et al. (33). Os órgãos foram homogeneizados como anteriormente, adotando-se para estes órgãos o esquema de centrifugação fracionada sugerida por Ozawa et al. (34). O homogeneizado foi centrifugado primeiramente a 600 x g por 8 minutos. O sobrenadante foi em seguida centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos. O sedimento foi suspenso em meio de extração manitol-sacarose e centrifugado a 5.000 x g por 10 minutos. As mitocôndrias sedimentadas foram finalmente suspensas em meio de extração, em volume suficiente para uma concentração de proteína de 15 mg/ml.

3. Mitocôndrias de músculo esquelético.- Ratos brancos, espécie Wistar, foram decapitados, os músculos dissecados e lavados em meio de extração gelado e finalmente cortados em pequenos fragmentos. As mitocôndrias de músculo esquelético foram isoladas pelo método de Chappell e Perry (35) e o meio de extração continha: TRIS 0,05 M; KCl 0,1 M; EDTA 0,001 M; MgSO₄ 0,005 M e ATP 0,001 M, e o pH final era 7,4. Após a homogeneização, a suspensão foi centrifugada a 600 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi centrifugado a 8500 x g por 10 minutos. Esta operação foi repetida mais uma vez. O sedimento obtido foi suspenso em meio de extração suficiente para uma concentração de proteína equivalente a 15 mg/ml.

Tôdas as operações de isolamento de mitocôndria fo realizadas a 0°C e as centrifugações em centrífuga refrigerada Sorvall RC-2.

4. Microscopia eletrônica.— Alíquotas de cada suspensão mitocondrial foram fixadas em ácido ósmico 1%/tampão veronal (36). As inclusões foram feitas em crystic-araldite (37) e coloração por citrato de chumbo (38) e acetato de uranila (39). Os cortes foram feitos em ultra microtomo Sorvall Porter-Blum MT-2. Tôdas as eletromicrografias foram obtidas com Microscópio Eletrônico Phillips EM-300 do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná.

5. Determinação do consumo de oxigênio.— O consumo de oxigênio por mitocôndrias de fígado, cérebro, rim, coração, cerebelo, baço e músculo esquelético de rato utilizando-se como substratos o succinato, α -cetogluturato, α -glicerofosfato, L-malato, piruvato, DL-isocitrato, citrato, L-glutamato, oxaloacetato, fumarato e acetato, foi determinado pelo método clássico do respirômetro de Warburg.

O meio de reação (33) utilizado em tôdas as determinações continha: manitol 0,025 M; TRIS 0,01 M; EDTA 0,2 mM; KCl 0,01 M e fosfato inorgânico 0,005 M (pH final 7,4). As determinações de proteína foram feitas pelo método de Lowry et al. (40).

Todos os produtos químicos utilizados no presente trabalho eram pró-análise.

R E S U L T A D O S1. Determinação do consumo de oxigênio

Os dados da Tabela I e II mostram o consumo de oxigênio por mitocôndrias de baço, fígado, cerebelo, rim, coração, cérebro e músculo esquelético, utilizando-se diversos substratos.

TABELA I

consumo de oxigênio por mitocôndrias de Tecido de rato

| SUBSTRATOS | Baço | Fígado | Cerebelo | Rim | Coração | Cérebro | Músculo esquelético |
|-------------------|------------------------------|--------|----------|------|---------|---------|---------------------|
| | QO ₂ (30 minutos) | | | | | | |
| Succinato | 11,7 | 16,7 | 19,7 | 33,6 | 21,7 | 32,8 | 16,4 |
| α -cetogluturato | 7,7 | 5,6 | 2,3 | 10,8 | 12,3 | 5,9 | 9,1 |
| α -glicerofosfato | 8,5 | 2,9 | 14,8 | 9,5 | 2,8 | 16,9 | 12,4 |
| L-malato | 5,1 | 2,9 | 3,2 | 4,8 | 10,9 | 0,7 | 0,3 |
| DL-isocitrato | 4,4 | 6,1 | 4,1 | 11,7 | 11,7 | 3,1 | 14,9 |
| Citrato | 1,3 | 12,5 | 0,9 | 4,5 | 12,5 | 0,5 | - |
| L-glutamato | 2,9 | 3,1 | 2,9 | 4,0 | 9,5 | 3,2 | 1,1 |
| Oxaloacetato | 1,9 | - | - | 2,0 | 1,1 | 4,5 | - |
| Piruvato | 1,9 | 1,5 | 7,1 | 2,5 | 2,9 | 5,6 | 9,3 |
| Fumarato | 1,2 | 3,3 | 1,9 | 13,5 | 15,9 | 2,7 | - |
| Acetato | - | 0,8 | - | 1,5 | - | 0,3 | - |

Sistema: 2ml de meio de reação (33); 0,5ml de suspensão mitocondrial 0,5ml de NaOH 20% colocado no poço central; 100 μmoles de substrato. Temperatura: 37°C. Fase gasosa: ar atmosférico, 100 agitações por minuto. Proteína: 15 mg/ml. Os dados são as médias de cinco experiências.

TABELA II

Consumo de oxigênio por mitocôndrias de tecido de rato

| SUBSTRATOS | Baço | Fígado | Cerebelo | Rim | Coração | Cérebro | Músculo esquelético |
|-------------------|------------------------------|--------|----------|------|---------|---------|------------------------|
| | CO ₂ (60 minutos) | | | | | | |
| Succinato | 22,2 | 30,5 | 39,5 | 66,0 | 42,0 | 65,4 | 32,6 |
| α -cetogluturato | 15,2 | 11,2 | 5,2 | 22,6 | 26,0 | 11,0 | 20,6 |
| α -glicerofosfato | 14,8 | 10,0 | 26,0 | 19,0 | 5,7 | 30,9 | 22,2 |
| L-malato | 6,9 | 5,4 | 4,2 | 8,0 | 17,2 | 1,5 | 1,7 |
| DL-isocitrato | 6,5 | 8,0 | 6,0 | 17,8 | 15,2 | 4,2 | 23,0 |
| Citrato | 2,1 | 22,6 | - | 6,8 | 21,2 | 1,2 | - |
| L-glutamato | 3,6 | 7,2 | 4,0 | 5,8 | 17,3 | 5,4 | 1,7 |
| Oxaloacetato | 3,3 | - | - | 2,6 | 1,7 | 7,3 | - |
| Piruvato | 3,0 | 3,6 | 12,9 | 3,8 | 5,6 | 10,0 | 1,0 |
| Fumarato | 2,9 | 14,2 | 4,0 | 20,8 | 25,3 | 4,6 | - |
| Acetato | - | 1,0 | - | 2,0 | - | 1,2 | - |

Sistema: idêntico ao da tabela I.

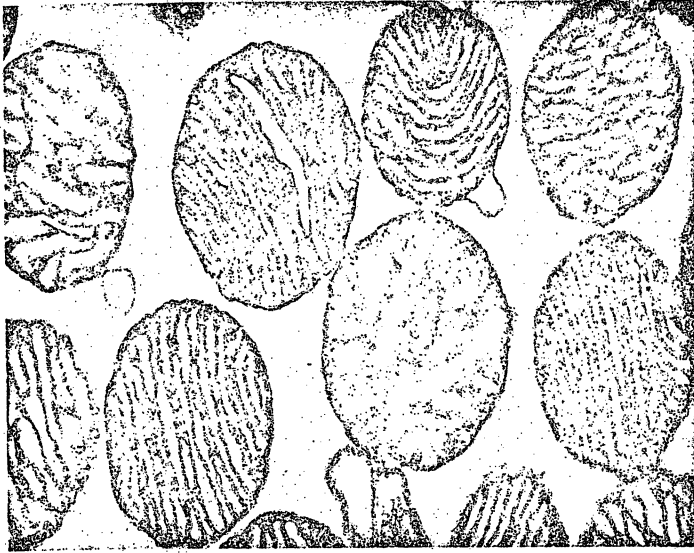


Fig. 5 - Mitocôndrias de coração
(31.120 x)

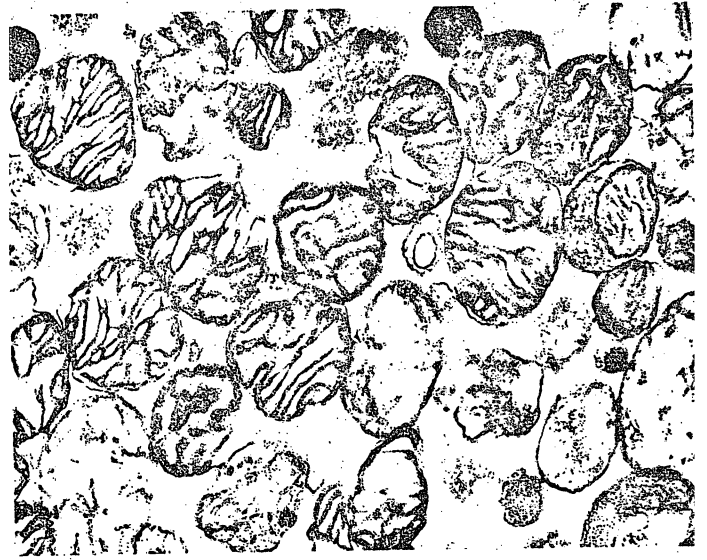


Fig. 6 - Mitocôndrias de cé
rebro (31.120 x)

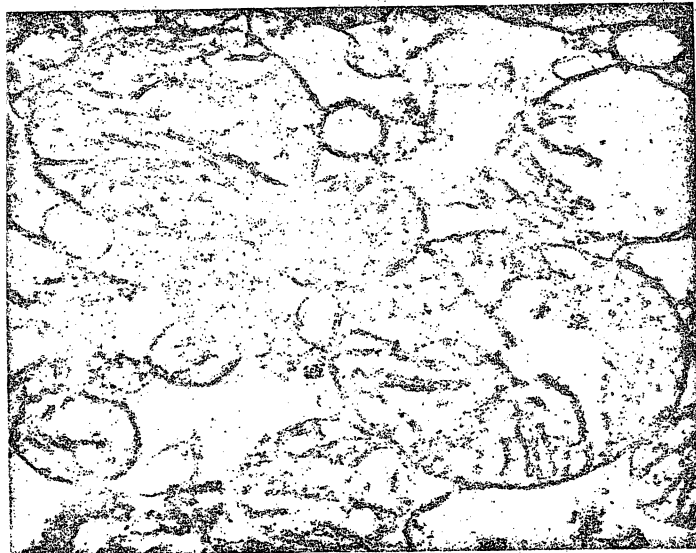


Fig. 7 - Mitocôndrias de músculo
esquelético (31.120 x)

2. Microscopia eletrônica -

As figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 mostram fotomicrografias eletrônicas de mitocôndrias isoladas de baço, fígado, cerebello, rim, coração, cérebro e músculo esquelético.

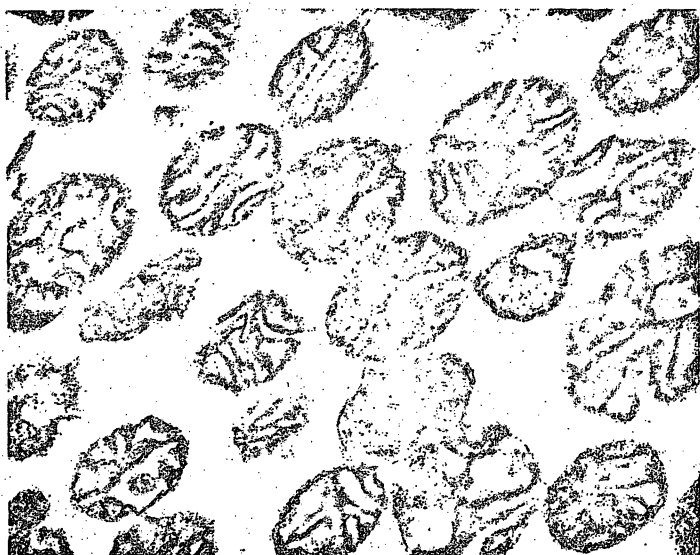


Fig. 1 - Mitocôndrias de baço
(31.120 x)

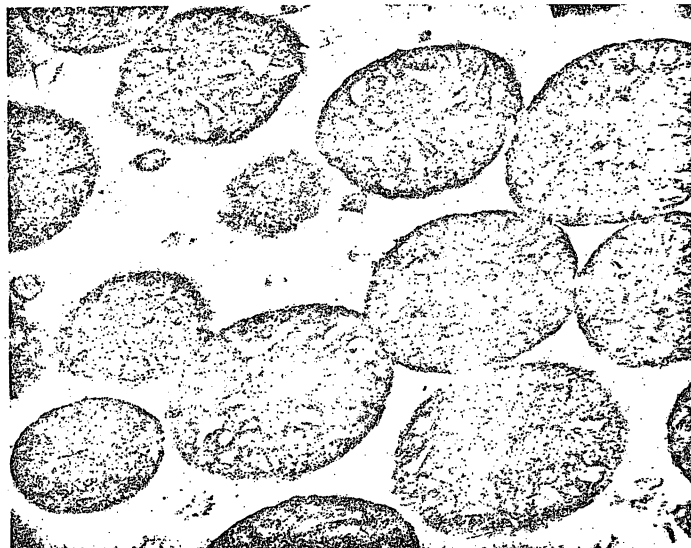


Fig. 2 - Mitocôndrias de fígado (31.120 x)

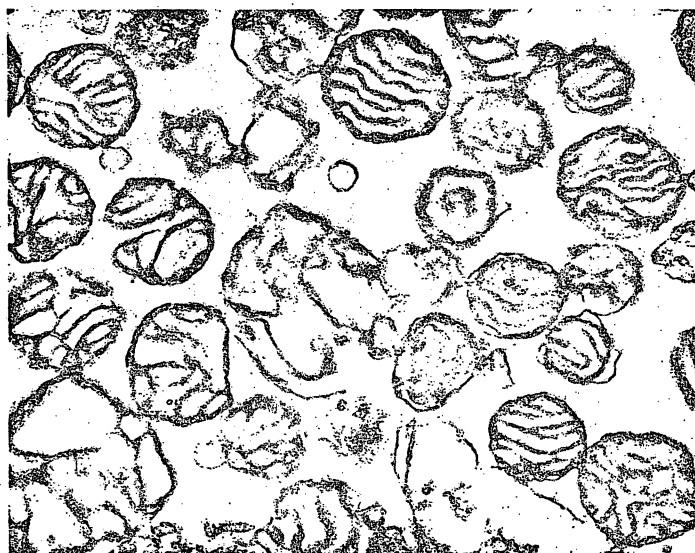


Fig. 3 - Mitocôndrias de cerebello
(31.120 x)

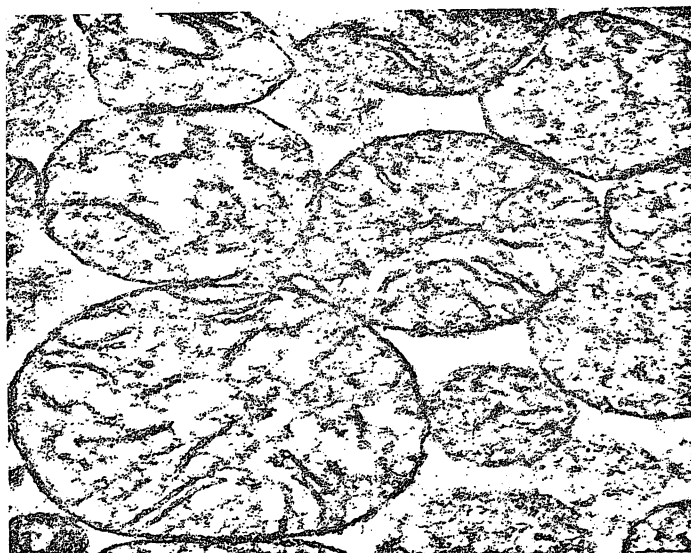


Fig. 4 - Mitocôndrias de rim
(31.120 x)

DISCUSSÃO

A localização intramitocondrial do ciclo do ácido cítrico foi descrito em 1949 por Kennedy e Lehninger (13). Desde esta época, inúmeros trabalhos relativos à oxidação de substratos por mitocôndrias, foram realizados. Entretanto, difícil torna-se compará-los com o presente trabalho, devido à diversidade dos sistemas de reação.

Estudo detalhado das Tabelas I e II, mostra que o succinato é o substrato melhor oxidado por mitocôndrias dos tecidos estudados, estando de acôrdo com a maioria dos trabalhos compulsados na literatura (14,15,16,18,19,21,26). Em contraposição, o acetato não é utilizado por mitocôndrias dos vários tecidos estudados, provàvelmente devido à baixa permeabilidade da membrana mitocôndrial à êsse substrato (44); êste resultado está em desacôrdo com os dados obtidos por Plaut e Plaut (14).

Torna-se interessante salientar que dos tecidos estudados apenas mitocôndrias de coração oxidam relativamente pouco o α -glicerofosfato ($QO_2 = 5,7/60$ minutos). Talvez esta pequena oxidação de α -glicerofosfato por mitocôndria de tecido cardíaco possa ser explicada pela baixa concentração de desidrogenase do α -glicerofosfato (28,41). Além de succinato, mitocôndrias de coração de rato oxidam rapidamente o α -cetogluturato, malato, isocitrato, citrato, glutamato e fumarato. Plaut e Plaut (14) não conseguiram obter oxidação de citrato e isocitrato, enquanto que, os resultados de Montgomery e Webb (17) e Borst (22) são semelhantes aos apresentados na Tabela II.

Com exceção da alta oxidação de α -cetogluturato por mitocôndrias de cérebro de rato observada por Bacila et al. (25) a seqüência dos demais substratos assemelha-se à do presente trabalho.

Os substratos melhor oxidados por mitocôndrias de fígado de rato foram o succinato > citrato > fumarato > α -cetogluturato. Êsses resultados são semelhantes aos de Kennedy e Lehninger (13), Lardy e Wellman (15), Yagi e Nagaysu (18).

Apenas succinato > isocitrato > α -glicerofosfato α -cetogluturato foram os substratos oxidados por mitocôndrias de músculo esquelético. Êstes dados são diferentes dos encontrados na literatura (16,19,20), principalmente no que concerne à alta oxidação de isocitrato por mitocôndrias de músculo esquelético.

No que concerne a utilização dos substratos por mitocôndrias de rim observou-se que o succinato > α -cetoglutarato > fumarato > α -glicerofosfato > isocitrato foram os substratos melhor oxidados, entretanto, Kiessling (24) observou satisfatória utilização de piruvato por mitocôndrias de rim e cerebelo. No presente trabalho, mitocôndrias de cerebelo somente utilizaram de maneira significativa o succinato > α -glicerofosfato > piruvato. Com relação ao piruvato há identidade de resultados com os obtidos por Kiessling (24).

Somente succinato, α -cetoglutarato e α -glicerofosfato foram os substratos utilizados por mitocôndrias de baço de rato. Acreditamos ser esta a primeira vez que se obtém dados de metabolismo oxidativo em mitocôndrias de baço, desde de que, não conseguimos obter dados relativos ao assunto com a revisão bibliográfica realizada.

Das preparações de mitocôndria isolada aqui apresentadas somente as de fígado, rim e coração retiveram todas as características morfológicas das mitocôndrias "insitu". Mudanças de forma e algumas vezes "swelling", acompanhadas de vacuolação e rearranjo das cristas foram as alterações verificadas nas preparações mitocondriais de baço, cérebro, cerebelo e músculo esquelético isoladas pelos métodos utilizados no presente trabalho. Aparentemente, estas modificações se devem ao meio de extração utilizada, fato já demonstrado por Desphande et al (28) em excelente trabalho de isolamento de mitocôndrias de coração de coelho com diversos meios de extração. Entretanto, apesar das alterações observadas, acreditamos serem estas preparações morfológicamente superiores às apresentadas por outros autores (29, 30, 31, 32, 42). As fotomicrografias eletrônicas de mitocôndrias de coração apresentadas por Whittaker (43) são idênticas as do presente trabalho.

CONCLUSÕES

1. Succinato, α -glicerofosfato e α -cetoglutarato foram os substratos utilizados por mitocôndrias de baço, coração, fígado, cérebro, cerebelo, rim e músculo esquelético.
2. A utilização de acetato e oxaloacetato por mitocôndrias isoladas dos tecidos animais estudados foi insignificante.
3. Malato, glutamato, isocitrato, citrato e fumarato foram bem oxidados por mitocôndrias de coração; oxidação similar ocorreu com citrato e fumarato em fígado, e com fumarato em rim.

4. piruvato foi discretamente utilizado por todos os tecidos com exceção de músculo esquelético;
5. acreditamos que pela primeira vêz são apresentados dados de metabolismo oxidativo em mitocôndrias de baço, sendo o succinato, α -cetogluturato e α -glicerofosfato os substratos melhor utilizados;
6. Das preparações de mitocôndrias isoladas somente as de fígado, rim e coração apresentaram características normais; as demais apresentaram algumas alterações no que concerne a mudanças de forma e algumas vêzes "swelling" discreto.

SUMÁRIO

Foi determinado o consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de baço, fígado, cerebelo, rim, coração, cérebro e músculo esquelético de rato, frente a diversos intermediários: succinato, α -cetogluturato, α -glicerofosfato, malato, isocitrato, citrato, glutamato, oxaloacetato, piruvato, fumarato e acetato. Fotomicrografias eletrônicas das mitocôndrias isoladas dos diversos tecidos são apresentadas.

AGRADECIMENTOS

Aos componentes da Divisão de Bioquímica do Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas e do Instituto de Bioquímica, da Universidade Federal do Paraná, bem como ao seu DD. Diretor, Prof. Milton Giovannoni, pela colaboração prestada na execução desta tése.

Ao Prof. Annibal de Paiva Campello, pela orientação que nos possibilitou realizar o presente trabalho. Ao Sr. Robin Hofmeister pelo exaustivo trabalho de microscopia eletrônica.

REFERÊNCIAS

1. Lehninger, A.L., The Mitochondria, W.A. Benjamin, N.York, 1964, p.1-4.
2. Regaud, C., C.R. Soc. Biol. 65:718 (1908). in Calude A., Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 9: 2163 (1941).
3. Thunberg, T., Skand. Arch. Physiol. 24: 23 (1911). in Greenberg, D.M. (Editor), Metabolic Pathways, v.1, N.York, Academic Press, 1960, p. 130-131.
4. Batteli, F. and Stern, L., Biochem. Z. 31: 478 (1911). in Greenberg, D.M. (Editor), Metabolic Pathways, v.1, N.York, Academic Press, 1960, p. 130-131.
5. Potter, V.R. and Elvehjem, C.A., J. Biol. Chem. 114:495 (1936).
6. Martius, C. and Knoop, F.Z., Physiol. Chem. Hoppe Seyler s 246: 1 (1937). in Greenberg, D.M. (Editor), Metabolic Pathway, v. 1, N.York, Academic Press, 1960, p. 130-131.
7. Krebs, H.A. and Johnson, W.A., Enzymologia 4: 148 (1937). in Greenberg, D.M. (Editor), Metabolic Pathways, v.1, N.York, Academic Press, 1960, p. 130-131.
8. Bensley, R.R. and Hoerr, N.L., Anat. Rec. 60:449 (1934). in Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 9: 263 (1941).
9. Bensley, R.R., Anat. Rec. 69: 341 (1937). in Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. 9: 263 (1941).
10. Claude, A., Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 9: 263 (1941).
11. Schneider, W.C., J. Biol. Chem, 165: 585 (1946).
12. Hogeboom, G.H., Schneider, W.C. and Pallade, G.E., J. Biol.Chem. 172: 519 (1948).
13. Kennedy, E.P. and Lehninger, A.L., J. Biol. Chem. 179: 957(1949).
14. Plaut, G.W. and Plaut, K.A., J.Biol. Chem. 199: 141 (1952).
15. Lardy, H. and Wellman, H., J. Biol. Chem. 195: 215 (1952).
16. Chappell, J.B. and Perry, S.V., Biochem. J. 55: 586 (1953).
17. Montgomery, C.H. and Webb, J.L., J. Biol. Chem. 221: 347 (1956).
18. Yagi, K. and Nagatsu, I., J. Biochem. 47: 630 (1960).
19. Azzone, G.F. and Carafoli, E., Exp. Cell. Res. 21: 447 (1960).
20. Azzone, G.F., Egg-Olofsson, O., Ernster, L., Luft, R. and Szabolcsi, G., Exp. Cell Res. 22: 415 (1961).
21. Worcel, A. and Erecinska, M., Biochim. Biophys. Acta 65: 27(1952).
22. Borst, P., Biochim. Biophys. Acta 57: 256 (1962).

23. Bellamy, D., *Biochem. J.* 82: 218 (1962).
24. Kiessling, K.H., *Exp. Cell Res.* 30: 569 (1963).
25. Bacila, M., Campello, A.P., Vianna, C.H.M., and Voss, D.O., *J. Neurochem.* 11: 231 (1964).
26. Campello, A.P., Vianna, C.H.M., Brandão, D., Voss, D.O., and Bacila, M., *Biochem. Pharmacol.* 13: 211 (1964).
27. Brandão, D., Niculitcheff, G.X., Voss, D.O., and Campello, A.P., *Exp. Parasit.* 26: 203 (1969).
28. Deshpande, P.D., Hickman, D.D. and Von Korff, R.W., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 11: 77 (1961).
29. Weinbach, E.C., *Anal. Biochem.* 2: 335 (1961).
30. Bahr, G.F. and Zeitler, E., *J. Cell Biol.* 15: 489 (1962).
31. Stahl, W.L., Smith, J.C., Napolitano, L.M., and Basford, R.E., *J. Cell Biol.* 19: 293 (1963).
32. Bacila, M. e Voss, D.O., *An. Acad. Bras. Ciências*, 39: 169 (1957).
33. Voss, D.O., Campello, A.P. and Bacila, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 4: 48 (1961).
34. Ozawa, K., Seta, K., Takeda, H., Ando, K., Handa, H., and Araki, C., *Journal of Biochemistry* 59: 501 (1966).
35. Chappell, J.B. and Perry, S.V. *Nature* 173: 1094 (1954).
36. Pallade, G.E., *J. exp. Med.* 95: 285 (1952).
37. Weig, D.R. e Kisielius, J., *Ciência e Cultura (S. Paulo)* 20 (3): 657 (1968).
38. Reynolds, E.S., *J. Cell Biol.* 17: 208 (1963).
39. Watson, M.D., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4: 475 (1958).
40. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., *J. Biol. Chem.* 193: 265 (1951).
41. Green, D.E., *Biochem. J.* 30: 629 (1936).
42. Klingenberg, M. and Taff, E., in J.M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello and E.C. Slater (editors), *Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria* (BBA Library, vol. 7), Elsevier, Amsterdam, 1966, p. 180.
43. Whittaker, V.P., in J.M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello and E.C. Slater (editors), *Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria* (BBA Library, vol. 7), Elsevier, Amsterdam, 1966, p. 1.
44. Greville, G.D., in J.M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello and E.C. Slater (editors), *Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria* (BBA Library, vol. 7), Elsevier, Amsterdam, 1966, p. 86.